

МИКРОБИОЛОГИЯ

[Е. И. ТУРЕВИЧ] и А. А. АВАКЯН

ПРИРОДА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ВКЛЮЧЕНИЙ

**ЭЛЕМЕНТАРНЫЕ ТЕЛЬЦА И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ ВКЛЮЧЕНИЯ
ОСПО-ВАКЦИНЫ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ В ФАЗО-КОНТРАСТНОМ
МИКРОСКОПЕ**

(Представлено академиком Е. Н. Павловским 15 VI 1950)]

Фазо-контрастный метод микроскопирования, представляя возможность вести длительное наблюдение над живыми клетками и получать четкие резко контрастные картины тонких деталей строения клеток, может быть с успехом использован при изучении ультравирусов. До сих пор нет еще единого взгляда на природу внутриклеточных включений, а также и на соотношение клеточных включений и элементарных телец при различных вирусных заболеваниях, что объясняется, главным образом, несовершенством методов исследования, применявшихся до сих пор (^{5, 6}). Многих вирусологов занимает вопрос, представляют ли включения типа Гуарниери клеточные колонии элементарных телец, в которых происходит размножение и накопление вируса, или же включения типа Гуарниери не связаны с развитием вируса и их следует рассматривать как отложения продуктов клеточной реакции на вирус?

Принимая во внимание вышеуказанные преимущества фазо-контрастного метода микроскопии, мы решили применить его для освещения вопроса о природе телец Гуарниери.

Материал и метод. Роговица глаза кролика, после скарификации, заражалась оспенным детритом. Материалом для заражения служили образцы оспенного детрита, полученные из 8 различных институтов СССР (пользующихся в большинстве случаев различной по происхождению и свойствам штамм-лимфой). Для исследования брался соскоб роговицы через 12, 24, 48 и 72 часа после заражения.

Мы пользовались цейссовским фазо-контрастным (дающим позитивные изображения) микроскопом на штативе Люмипан с панкратическим конденсором. Фотосъемки производились с объективом ph-90 и окуляром К. 20. Исследование и фотографирование проводилось как в фазовом контрасте, так и в темном поле и в обычном светлом поле. Материал изучался в живом и неокрашенном виде методом раздавленной капли под покровным стеклом. Контролем служили параллельно приготовленные из того же материала препараты, окрашенные кармином по Кульчицкому, а также препараты, окрашенные по Туревичу и по Манну.

Собственные наблюдения. После заражения скарификацией роговицы глаза кролика вирусом оспо-вакцины вскоре развивался очаговый процесс, имеющий тенденцию захватывать все новые и новые участки клеток. Со второго же дня после заражения в соскобах

роговицы можно было обнаружить клетки с различной степенью пораженности, начиная от начальных стадий изменения и кончая клеточным распадом. Как видно на микрофотограммах, с помощью фазо-контрастного микроскопа легко удается видеть многие детали строения клеток роговицы. В их цитоплазме хорошо видны зерна различной величины и формы. Хорошо видно ядро, различается ядерная мембрана, ядрышко и другие детали ядра. Оказалось нетрудно обнаружить и внутриклеточные вирусные включения.

При наблюдении в фазо-контрастном микроскопе тельца Гуарниери имеют различную величину и форму, начиная от мелких округленных телец и кончая крупными овальными и полуулунными формами. Последние обычно огибают ядро с двух сторон (см. рис. 1). Границы включений очерчены ясно, причем вокруг

телец можно видеть узкую светлую зону, напоминающую вакуоль. Последнее не наблюдается при исследовании в окрашенных фиксированных препаратах. Фазо-контрастный микроскоп выявляет неодинаковое строение обнаруживаемых включений. Мелкие, круглой формы включения компактны, выделяются темным оттенком; в них не удается различать какого-либо строения. Крупные включения имеют более рыхлое строение, они состоят из крупных, различной величины зерен. Нередко встречаются включения волокнисто-сетчатого строения.

Наряду с описанными типичными тельцами Гуарниери нам удалось при помощи фазо-контрастного микроскопа увидеть включения, явно отличающиеся как по своему строению, так и по форме от телец Гуарниери. Эти особые образования имеют обычно различную форму и величину; самые малые из них состоят из нескольких мелких зерен, а крупные достигают размеров телец Гуарниери. Для них характерно рыхлое строение, неровные края. Рассматривая под микроскопом края этих образований, можно видеть, что вся эта масса состоит из мелких, равномерных сферических зерен, в которых можно легко узнать по их величине и форме тельца Пашена. Мы полагаем, что эти образования не имеют отношения к настоящим тельцам Гуарниери и являются колониями или кучками элементарных телец (см. рис. 2).

Необходимо указать, что фазо-контрастный микроскоп выявляет в клетках роговицы много других зерен различной формы и величины, но опытный глаз без особого труда может различить среди них элементарные тельца. Это мелкие шаровидные образования, поразительно

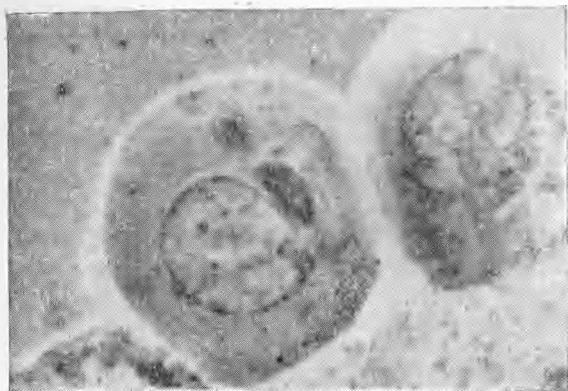


Рис. 1



Рис. 2

одинаковой величины; они располагаются или по одиночке, или в виде делящихся и парных форм. Иногда можно видеть короткие цепочки, состоящие из 3—4 экземпляров. Они заполняют клетку диффузно и вместе с тем могут образовать колонии. При нашем методе исследования — приготовление препаратов путем расщипывания ткани, при котором происходит разрушение некоторых клеток, — кучки элементарных телец встречались нам и вне клеток (см. рис. 3).

При наблюдении тех же участков препарата в темном поле (ср. рис. 2 — микрофото в фазовом контрасте и рис. 4 — в темном поле) легко можно убедиться, что описанные нами образования действительно являются скоплениями телец Пашена. Тельца же Гуарниери в темном поле неразличимы или трудно различимы и кажутся бесструктурными. Картины, наблюдавшиеся нами в фазо-контрастном микроскопе, совпадают с результатами исследования того же материала в окрашенных кармином препаратах.

Интересно отметить, что заражение детритом, приготовленным в Ашхабаде, серия 10, вызвало более регулярное образование включений в роговице глаза кролика, чем введение остальных семи штаммов,

причем у различных кроликов тельца Гуарниери имели различное строение: либо волокнисто-сетчатое, либо грубозернистое. У одного кролика наряду с процессом в роговице развился конъюнктивит. Соскоб роговицы глаза этого кролика был исследован через 72 часа после заражения. С помощью фазо-контрастного микроскопа удалось обнаружить много гнойных клеток, эпителиальные клетки были в состоянии некроза; в них имелось много крупных грубых включений с рыхлым строением, полуулунной формы.

Рис. 4

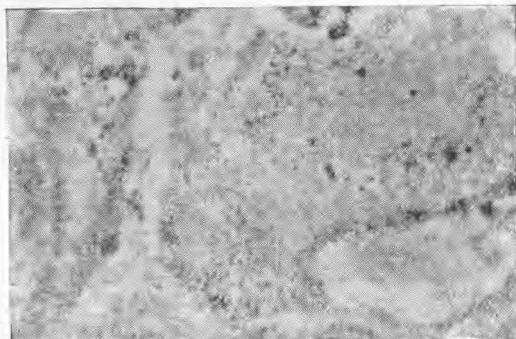


Рис. 3



В другом опыте мы заразили роговицу правого глаза кролика ашхабадской вакциной серии 10, а роговицу левого — вакциной, приготовленной в Институте имени Мечникова (Москва), серия 238. В этом случае при заражении московским штаммом внутриклеточные включения были обнаружены в значительно большем количестве, чем при заражении ашхабадским вирусом. Очевидно, интенсивность образования телец Гуарниери, а также их величина и форма подвержены значительной изменчивости.

На двух других кроликах мы провели еще одно наблюдение. Оба кролика были внутриожно заражены детритом, приготовленным в Тамбове — серия 5, и в Иркутске — серия 385. Через три дня эти кролики были повторно заражены в роговицу глаза другой вакциной,

Киев 262. Соскобы роговицы были исследованы через 48 часов после заражения. В этом случае нам удалось наблюдать много некротических клеток, лишенных ядер, в которых элементарные тельца находились в броуновском движении. Изредка встречающиеся включения имели необычную форму: они были различной величины, компактные, бесструктурные и лежали в явно контрастирующих вакуолях.

Интересно выяснить в дальнейшем влияние иммунологического фона на образование специфических телец Гуарниери при реинфекции.

Обсуждение результатов и заключение

Благодаря фазо-контрастному микроскопу мы могли обнаружить в живых клетках роговицы кроликов, зараженных вирусом оспо-вакцины, внутриклеточные включения типа Гуарниери, изучать их строение и сфотографировать их. В фазо-контрастном микроскопе были хорошо видны также неокрашенные элементарные тельца вируса вакцины, их кучки и колонии внутри клеток.

Фазо-контрастным методом микроскопии легко можно дифференцировать колонии и кучки элементарных телец от типичных телец Гуарниери. Проведенное нами изучение динамики развития внутриклеточных включений при вирусе вакцины через 12, 24, 48 и 72 часа после заражения показало, что элементарные тельца развиваются в протоплазме вне зависимости от телец Гуарниери.

От чего зависит образование и строение телец Гуарниери, пока ответить трудно. Возможно, имеют значение свойства штамма вируса, индивидуальные особенности реакций организма хозяина, в частности, его иммунобиологическое состояние и другие, пока мало изученные факторы. Когда наша работа была уже закончена, в печати появилась статья И. Ангуло, О. Ричардс и А. Рок (⁷). Они наблюдали в фазо-контрастном микроскопе (с негативным изображением) клеточные включения при желтой лихорадке, генерализованном герпесе, птичьей оспе и чуме собак. Эти исследователи использовали фиксированный материал в тонких срезах (4 μ). Контролем служили параллельные срезы, окрашенные гематоксилином с докраской эозином. Эти авторы показали, что с помощью фазо-контрастного микроскопа возможно обнаружить внутриклеточные включения при вышеуказанных вирусных инфекциях.

В упомянутой статье приведены микрофотоснимки препарата оспы птиц, на которых не удается обнаружить изображения элементарных телец вируса оспы птиц; в тексте статьи также ничего не сказано о возможности обнаружения элементарных телец. Повидимому, негативный фазо-контрастный микроскоп, которым пользовались Ангуло, Ричардс и Рок, не позволил им наблюдать такие детали, которые, как было показано нами, легко выявляются при наблюдении в позитивном фазо-контрастном микроскопе. Последний дает более четкие картины и правильное изображение объекта в светлом поле зрения. Вероятно, имеет значение также и то обстоятельство, что американские авторы исследовали фиксированные, а не нативные препараты.

Институт неврологии
Академии медицинских наук СССР

Поступило
27 V 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Генкель, Микробиология, **15**, 6, 527 (1946). ² В. С. Киктенко и Л. Н. Шустова, Сборн. научной информации, изд. отдела здравоохранения Советской Военной Администрации в Германии, **1**, 95 (1947). ³ М. А. Морозов, Врач. дело, **24—26**, 1449 (1934). ⁴ М. А. Морозов, Лабор. практика, **8** (1937). ⁵ Е. И. Туревич, Элементарные тельца и клеточные включения ультравирусов человека и животных. Диссертация, Москва, 1942. ⁶ Е. И. Туревич, Вопр. мед. вирусологии, **1**, 82 (1949). ⁷ J. Angulo, O. Richards and A. Roque, Journ. Bacteriology, **57**, 3, 297 (1949). ⁸ J. O. W. Bland и C. F. Robinow, Arch. Exp. Zellforsch., **22**, 454 (1938). ⁹ F. Himmelweit, Br. Journ. Exp. Path., **19**, 108 (1938).