

УДК 576.34+576.858

ЦИТОЛОГИЯ

Я. Е. ХЕСИН, В. В. ТХОРЖЕВСКИЙ, Б. А. ЕРМАН, А. М. АМЧЕНКОВА,  
Ф. В. ВОРОНИНА

**ЦИТОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ И РАДИОАВТОГРАФИЧЕСКОЕ  
ИЗУЧЕНИЕ СИНТЕЗА РНК В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ЛЕЙКЕМИИ,  
ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ И РЕЗИСТЕНТНЫХ К ВИРУСУ КОКСАКИ ВЗ**

*(Представлено академиком В. Д. Тимаковым 29 V 1969)*

В. Д. Соловьеву и сотр. (10-12) путем воздействия на культуры клеток лейкемии Л-96 вирусом Коксаки ВЗ удалось получить перевиваемые клеточные линии, специфически резистентные к заражению гомологичным вирусом. Вирусологическое изучение этих клеток не выявило в них признаков вирусносительства, а также продукции веществ типа антител или интерферона (12). Было показано (7, 13), что РНК гомологичного вируса способна проникать в резистентные клетки и формировать в них инфекционный вирус, но РНК вируса полиомиелита, к которому эти клетки чувствительны, не проникает в них, если она облечена белковой оболочкой вируса Коксаки; это сближает феномен резистентности названных клеток с естественной нечувствительностью клеток к вирусу Коксаки. Цитохимические исследования (2, 3) позволили обнаружить в резистентных клетках своеобразные изменения обмена, выражающиеся, в частности, в снижении активности фосфатаз, работающих в щелочных зонах рН. Сопоставление данных, полученных при изучении этих клеток, с результатами цитохимического и морфологического исследования культур ретикулярных клеток, специфически резистентных к полиовирусной инфекции (1), позволило предположить, что в основе специфической противовирусной резистентности названных культур лежит инверсия обмена клеток, ведущая к выключению из их метаболизма определенных веществ, необходимых для адсорбции и внутриклеточного развития данного вируса (14).

Приводимые в настоящем сообщении опыты были поставлены с целью выяснить, на каком этапе прерывается развитие гомологичного вируса в специфически резистентных к инфекции Коксаки ВЗ клетках лейкемии Л-41, и получить количественные характеристики особенностей обмена РНК в этих клетках по сравнению с исходными, чувствительными к энтеровирусам клетками Л-96.

Культуры клеток Л-96 и Л-41 выращивали в пробирках Лейтона на пластинках покровного стекла ( $10^5$  кл/мл) в среде 199 с 10% бычьей сыворотки. На 2 сутки роста среду заменяли на такое же количество среды 199 с 2% сыворотки и либо с вирусом Коксаки ВЗ (1 ТЦД<sub>50</sub>/кл), либо без вируса. Через 30 мин.; 1; 2; 4; 6; 8 и 12—24 часа препараты фиксировали по Шабдашу и окрашивали нуклеиновые кислоты по Эйнарсону галлоцианином. Цитофотометрию проводили методом сканирования (фотографический вариант). Площади цитоплазмы, ядрышек и ядер определяли путем планиметрии, вычисляя объем названных структур и находя общее содержание РНК (или для ядра — нуклеиновых кислот) в каждой из них порознь по способу, описанному нами ранее (8, 9). Полученные цифровые данные подвергали вариационно-статистической обработке на электронно-вычислительной машине Урал-1. В другой серии опытов клетки через часовые интервалы после заражения обрабатывали 15 мин. актиномицином D (5  $\mu$ г/мл), на 1 час помещали в среду с уридином-Н<sup>3</sup> (1  $\mu$ С/мл), фикси-

ровали в смеси Карнуа, 1 час обрабатывали 5% раствором трихлоруксусной кислоты при 4°, покрывали эмульсией типа Р, экспонировали 3 недели, проявляли, фиксировали, докрашивали метиленовым синим и подсчитывали число зерен серебра над ядром и цитоплазмой, подвергая полученные данные обычной вариационно-статистической обработке.

Как видно на рис. 1, цитоплазма и ядрышки исходных клеток Л-96, как контрольных, так и зараженных, более богаты РНК, чем соответствующие структуры клеток Л-41; такие же соотношения отмечаются и в содержа-

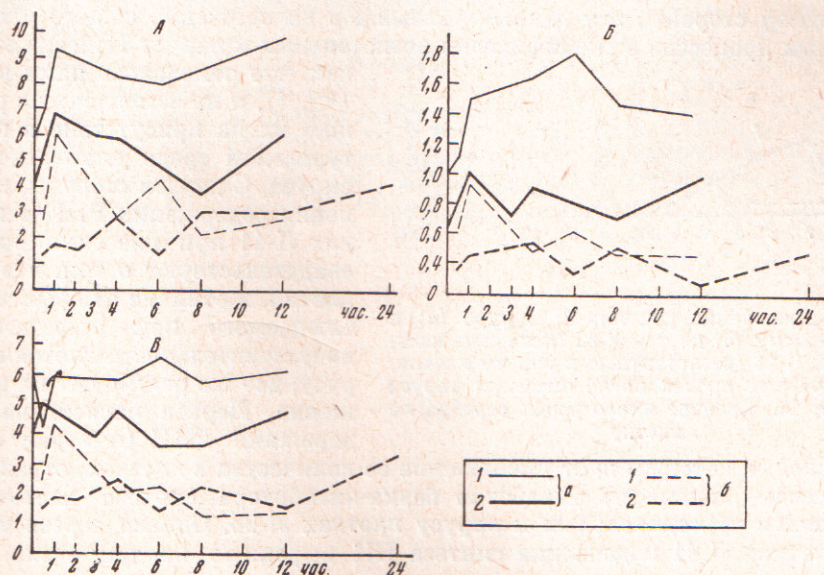


Рис. 1. Содержание РНК (усл. ед.) в контрольных (а) и зараженных вирусом Коксаки ВЗ (б) клетках Л-96 (исходные клетки, 1) и Л-41 (специфически резистентные к вирусу Коксаки ВЗ клетки, 2) на разных сроках после смены среды и внесения вируса. А — РНК в цитоплазме, Б — РНК в ядрышках, В — РНК в ядрах

нии нуклеиновых кислот (НК) в их ядрах. Более высокий уровень содержания НК в неинфицированных клетках по сравнению с зараженными не следует принимать во внимание, так как по условиям эксперимента динамика содержания НК в первых культурах изучалась не одновременно со вторыми. Вскоре после смены культуральной среды содержание НК в неинфицированных клетках нарастает, достигая максимума к 1 часу, после чего постепенно возвращается к исходному уровню. Исключением является содержание РНК в цитоплазме исходных клеток Л-96, где оно повышается до 6 часа, и в их ядрах, где содержание НК в первые 30 мин. опыта падает. Это, по-видимому, отражает индивидуальные колебания реакции отдельных культур на смену среды.

Увеличение содержания РНК во всех названных структурах инфицированных клеток Л-96 к 1 часу опыта также является реакцией на смену среды, но, судя по усилению включения уридина-Н<sup>3</sup> на этом сроке (рис. 2) и по последующему быстрому снижению содержания РНК к 4 часу опыта, в этой реакции примешивается также выработка мРНК, связанной с синтезом так называемых «ранних» белков, включая ингибитор собственно клеточных синтетических процессов (4-6, 15). Подъем содержания РНК к 6 часу опыта и снижение его после указанного срока (см. рис. 1), равно как падение интенсивности включения уридина-Н<sup>3</sup> в ядро и активизация включения его в цитоплазму (см. рис. 2), связаны с внутриклеточным размножением РНК-содержащего вируса и выходом его из клеток. Ранее

мы<sup>(8)</sup> наблюдали аналогичные колебания содержания РНК в клетках HEp-2, инфицированных вирусом Коксаки В1.

В специфически резистентных к вирусу Коксаки В3 клетках Л-41 аналогичные колебания в содержании РНК имеют меньший размах и в значительной мере запаздывают: первый пик отмечается лишь к 4, а второй — к 8 часу опыта. В это время нарастает включение уридина-Н<sup>3</sup> в кардиолазму; скорость же включения уридина-Н<sup>3</sup> в цитоплазму, в отличие от того, что наблюдается в исходных клетках Л-96, до 6 часа опыта не изменяется.

С одной стороны, эти данные указывают на снижение общего уровня обменных процессов в специфически резистентных к вирусу Коксаки клетках,

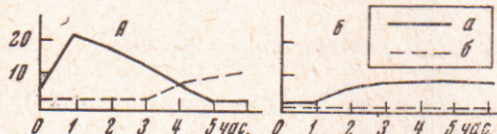


Рис. 2. Включение уридина-Н<sup>3</sup> в ядра (а) и в цитоплазму (б) клеток Л-96 (исходные клетки, А) и Л-41 (резистентные к вирусу клетки, Б) на разных сроках после внесения вируса Коксаки В3. Среднее число зерен серебра на клетку

та), вслед за которым идет уменьшение ее количества в клетках, отражает, по-видимому, процессы выработки белка-ингибитора синтеза клеточных НК, как и в чувствительных к вирусу клетках Л-96. Однако в резистентных клетках Л-41 подавление синтеза НК выражено не так резко, как в клетках Л-96; инфекция далее не развивается, и постепенно восстанавливается прежний уровень клеточного метаболизма.

Таким образом, в наших опытах взаимодействие вируса с резистентными к нему клетками Л-41 протекает своеобразно, отличаясь от известных типов взаимодействия вируса как с естественно резистентными, так и с чувствительными к нему клетками. В специфически резистентных к вирусу Коксаки клеточных культурах гомологичный вирус обуславливает изменения клеточного обмена, выражающиеся в появлении первого («раннего») пика синтеза РНК, хотя и со значительной задержкой. Далее жизнедеятельность клетки нормализуется, и синтез компонентов вируса в цитоплазме отсутствует. Следовательно, внутриклеточное развитие вируса прерывается на ранних этапах, не достигая полной депротеинизации, и вторичное нарастание содержания РНК в клеточных структурах не сопровождается синтезом вирусной РНК в цитоплазме и цитопатическими изменениями клеток.

Интересно отметить, что обработка инфицированных клеток — как Л-96, так и Л-41 — актиномицином D (5 мкг/мл) в течение 1 часа (что полностью снимает синтез НК собственно клетки) перед перенесением в среду с уридином-Н<sup>3</sup> почти нацело устраняет включение метки в ядро. Это свидетельствует о том, что выработка мРНК для вирусного ингибитора синтеза клеточных НК кодируется не вирусным, а клеточным геномом, что было недавно отмечено для других систем вирус — клетка И. Г. Баландиным и др. (4).

Институт эпидемиологии и микробиологии  
им. Н. Ф. Гамалеи  
АН СССР  
Москва

Свердловский научно-исследовательский  
институт вирусных инфекций

Поступило  
26 V 1969

## ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> А. М. Амченкова, Н. Е. Гулевич, В кн.: Морфология цитопатогенного действия вирусов, Симп. инст. морфол. человека АМН СССР, 8 (1963). <sup>2</sup> А. М. Амченкова, Н. Е. Гулевич, Вопросы вирусол., 13, № 1, 67 (1968). <sup>3</sup> А. М. Амченкова, Г. П. Советова, Вопр. вирусол., 13, № 5, 560 (1968). <sup>4</sup> И. Г. Баландин, А. А. Лушников и др., В кн.: Общая вирусология, Конфер. Инст. вирусологии им. Ивановского АМН СССР, № 8 (18), 11 (1968). <sup>5</sup> А. Г. Букринская, А. К. Гительман, Г. К. Воркунова, Вопр. вирусол., 9, № 5, 569 (1964). <sup>6</sup> А. Г. Букринская, Е. А. Владимирцева и др., В кн.: Структура и функция клеточного ядра, 1967, стр. 168. <sup>7</sup> Н. Е. Гулевич, Изучение механизма клеточного иммунитета к энтеровирусам. Докторская диссертация, М., 1968. <sup>8</sup> Б. А. Ерман, Е. Ю. Бронницкая, В. В. Тхоржевский, Acta virol., 12, № 2, 183 (1968). <sup>9</sup> Б. А. Ерман, В. С. Сергеева, Цитология, 9, № 6, 707 (1967). <sup>10</sup> В. Д. Соловьев, Вопр. вирусол., 9, № 5, 580 (1964). <sup>11</sup> В. Д. Соловьев, Н. Е. Гулевич, Acta virol., 4, № 4, 220 (1960). <sup>12</sup> В. Д. Соловьев, Н. Е. Гулевич, В кн.: IX Междунар. конгресс по микробиологии, симп., 1966, стр. 407. <sup>13</sup> В. Д. Соловьев, Т. И. Криспини и др., Acta virol., 11, № 1, 67 (1967). <sup>14</sup> Я. Е. Хесин, А. М. Амченкова и др., В кн.: Специфическая профилактика инфекционных болезней. Симп. Молд. ИЭМГ, Кишинев, 44, 1966. <sup>15</sup> J. E. Darnell, M. Girard et al., In: Molecular Biology of Viruses, N. Y.—London, 1967, p. 375.