

УДК 576.858.6

ВИРУСОЛОГИЯ

Академик АМН СССР В. М. ЖДАНОВ, Б. А. ЛАПИН, А. Ф. БЫКОВСКИЙ,
А. Д. АЛЬТШТЕЙН, Л. А. ЯКОВЛЕВА

БИОФИЗИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛЕЙКОВИРУСА, ПАССИРУЕМОГО НА ОБЕЗЬЯНАХ

В ранее опубликованных работах был описан экспериментальный лейкоз обезьян павианов, гамадрилов (¹⁻⁴) и макаков бурых (⁵⁻⁷), вызванный введением им материалов от людей, больных острым и хроническим миелолейкозом.

Заболевание поддерживается в пассажах на подростках и взрослых павианах и макаках прививкой им крови или бесклеточных материалов.

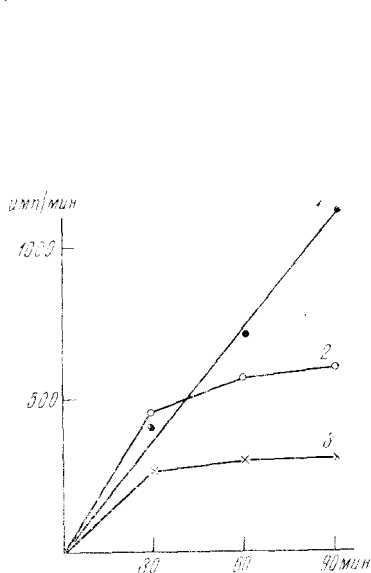


Рис. 2

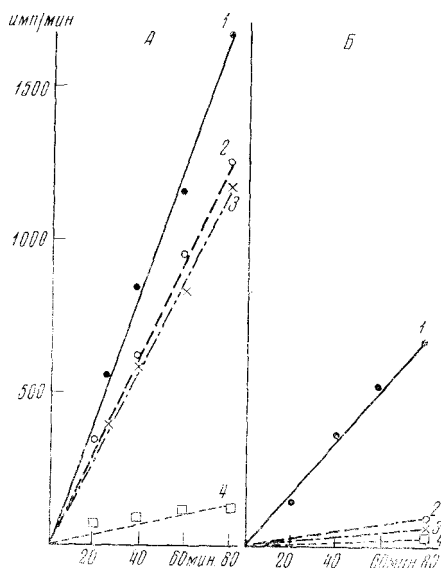


Рис. 3

Рис. 2. Кинетика обратнотранскриптазной реакции с вирионами лейковируса по включению Н³ДТТФ в кислотно-нерастворимую фракцию. 1 — полная инкубационная смесь, 2 — добавлен N-десметилрифампицин (100 мкг/мл), 3 — добавлена панкреатическая рибонуклеаза (50 мкг/мл)

Рис. 3. Кинетика обратнотранскриптазной реакции с экстрактами лейкоцитов от больных (А) и здоровых (Б) животных. 1 — полная инкубационная смесь, 2 — добавлен актиномицин D, 3 — добавлен рифампицин, 4 — без трех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов

В осадках плазмы крови после ультрацентрифугирования, в почках и кровяных органах, а также в культурах клеток лейкоцитов при электронной микроскопии обнаруживаются вирусные частицы типа «С».

В непрямой реакции иммунофлюоресценции с антисыворотками к материалам людей, больных лейкозом, обнаруживался новый, по-видимому, вирус-индуцированный антиген на поверхности лейкоцитов больных обезьян. Антиген не обнаруживался при использовании антисывороток к крови здоровых людей и здоровых обезьян, а также с антисыворотками к клеткам мышей, больных лейкозом. Этот антиген не обнаруживался также

у здоровых обезьян. В настоящем сообщении представлены некоторые биофизические и биохимические характеристики вируса.

Для выделения вируса использована гепариновая плазма, а в некоторых опытах — лейкоциты и селезенка четырех больных животных. Плазму освобождали от крупных взвешенных частиц центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 20 мин., затем пасаживали на ступенчатый градиент сахарозы 0,5–2,0 мол/л, приготовленный на трис-буфере (трис-HCl 0,01 моль/л pH 7,4 NaCl 0,15 мол/л, ЭДТА 10^{-3} мол/л) и центрифугировали в роторе SW 27,2 центрифуги Spinco L3 при 25 000 об/мин в течение 3 час. Материал с интерфазы собирали, разводили буферным раствором и вновь центрифугировали в линейном градиенте плотности сахарозы 20–60% в роторе SW 27,1 при 20 000 об/мин в течение 4–8 час. Область градиента с плотностью от 1,15 до 1,17 г/мл собирали, разводили буферным раствором и осаждали находящиеся здесь вирусы в титановом роторе при 45 000 об/мин в течение 2 час. и наличие вируса контролировали в электронном микроскопе. Для выделения вируса из тканей последние разрушали в гомогенизаторе Поттера, материал разводили в трис-буфере и клетки разрушали в гомогенизаторе Даунса, а затем материал обрабатывали как описано выше. Все процедуры проводили при 0–4°.

На рис. 1 представлены электронные микрофотографии вируса, выделенного из плазмы больных животных. Как видно, вирионы имеют округлую форму и диаметр 80–90 мμ (рис. 1а). При негативном контрастировании отчетливо выявляется мозаичная структура внешней оболочки вирионов (рис. 1б). После обработки препаратов детергентом обнаруживаются рибонуклеопротеиновые тяжи диаметром 6–8 мμ (рис. 1в, см. вкл. к стр. 224).

Для определения биохимической активности вируса были поставлены опыты на наличие в них обратной транскриптазы. Инкубационная смесь содержала в одном миллилитре: трис-HCl 50 μмоль pH 8,3, KCl 40, MgCl 26, дитиотреитол 2,5 μмоль.

неионный детергент NP 40 0,00125%, дезоксинуклеозидтрифосфаты ДАТФ, ДГТФ, ДЦТФ по 10 μмоль каждый, H^3 ДТТФ 10 μС (удельная активность 21 С/μмоль), вирус 100 μг. Инкубацию проводили при 37°.

На рис. 2 показана кинетика реакции с вирионами, выделенными из плазмы. Как видно из приведенных данных, реакция протекает линейно и тормозится в присутствии рибонуклеазы и N-деسمетилрифампицина. Сходные данные получены и при исследовании цитоплазматических экстрактов лейкоцитов, освобожденных от ядер и митохондрии (рис. 3). В отличие от лейкоцитов нормальных животных актиномицин D и рифампицин лишь слабо ингибируют реакцию. При отсутствии трех дезоксинуклеозидтрифосфатов реакция не протекает. В ряде опытов по окончании синтеза цуклеиновые кислоты были экстрагированы и осажжены этанолом для дальнейшего исследования.

При исследовании продуктов реакции в градиентах плотности сернокислого цезия (рис. 4) основная метка обнаруживается в фракциях

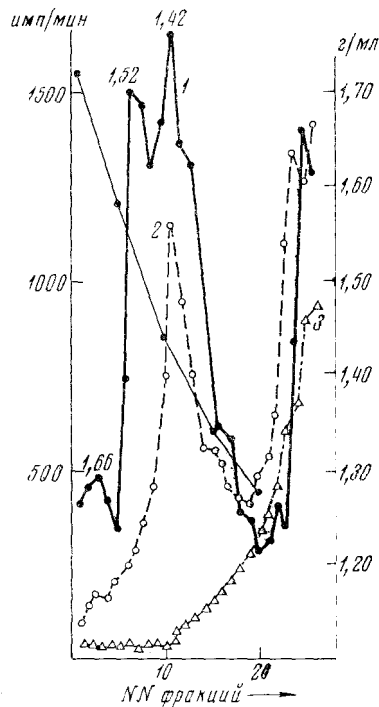


Рис. 4. Плотностное распределение продуктов обратной транскриптазной реакции после равновесного центрифугирования в градиенте плотности сернокислого цезия в роторе SW 50 центрифуги Spinco L3 при 40000 об/мин в течение 50 час.

градиента с плотностью 1,42 (ДНК) и 1,52 г/мл (РНК-ДНК-гибриды) и небольшая часть — во фракции с плотностью 1,66 г/мл (РНК с незначительным количеством гибридизированных участков).

Для выявления группо-специфических антигенов были использованы препараты селезенки больных животных. Концентрированные водно-солевые (физиологический раствор) экстракты ткани были исследованы в опытах иммунофлюоресценции с сывороткой против вируса мышинного лейкоза Раушера. Антигены мышинных лейкозов не были обнаружены в селезенке обезьян при четкой положительной реакции с контрольной тест-системой (селезенка мышей, зараженных вирусом Райшера).

На основании приведенных данных можно заключить, что экспериментальное заболевание обезьян ассоциируется с вирусом лейкоза, не относящимся к банальным мышинным вирусам. Для выяснения отношения вируса к возбудителю лейкоза человека требуются дополнительные исследования.

Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского
Москва

Институт экспериментальной патологии и терапии
Академии медицинских наук СССР
Сухуми

Поступило
30 V 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. А. Васильева, Б. А. Лапин и др., *Вопр. вирусол.*, 16, 312 (1971). ² Л. А. Яковлева, Б. А. Лапин и др., *Матер. симпозиума по проблемам лейкоза*, Рига, 1968. ³ Л. Я. Яковлева, Б. А. Лапин и др., *Матер. симпозиума Исследование путей распространения лейкоза и онкогенных вирусов*, Сухуми, 1972, стр. 104. ⁴ L. A. Yakovleva, In: *Comparative Leukemia Research*, Basel — N. Y., 1969, München — Paris, 1970, p. 761. ⁵ Б. А. Лапин, Л. А. Яковлева, *Вестн. АМН СССР*, № 5, 60 (1970). ⁶ Б. А. Лапин, Л. А. Яковлева и др., *Матер. симпозиума Исследование путей распространения лейкоза и онкогенных вирусов*, Сухуми, 1972, стр. 27. ⁷ B. A. Lapin, L. A. Yakovleva, In: *Pathology of Simian Primates*, Basel — N. Y., 1972, p. 725.

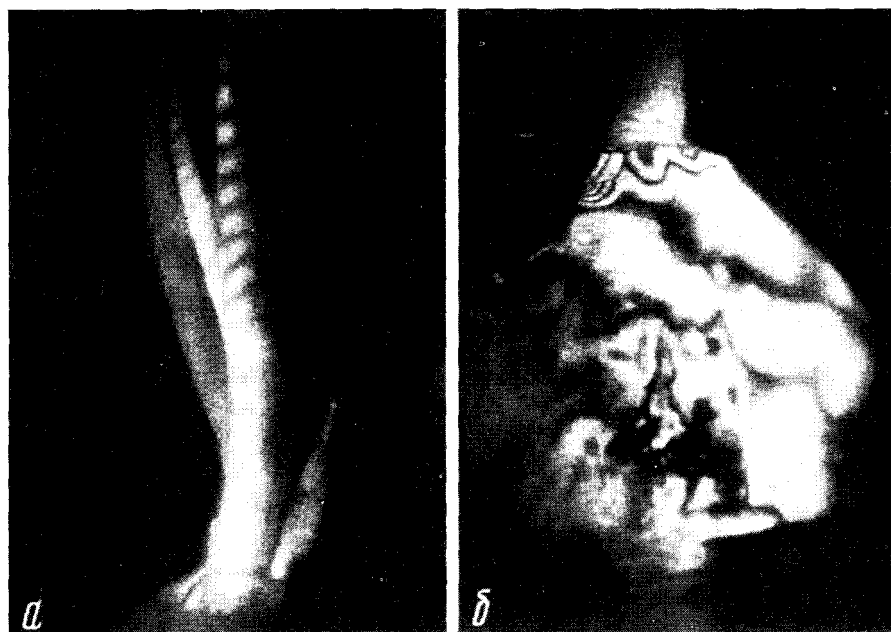


Рис. 2. Восстановленные интерферограммы стебля (а) и луковицы (б)

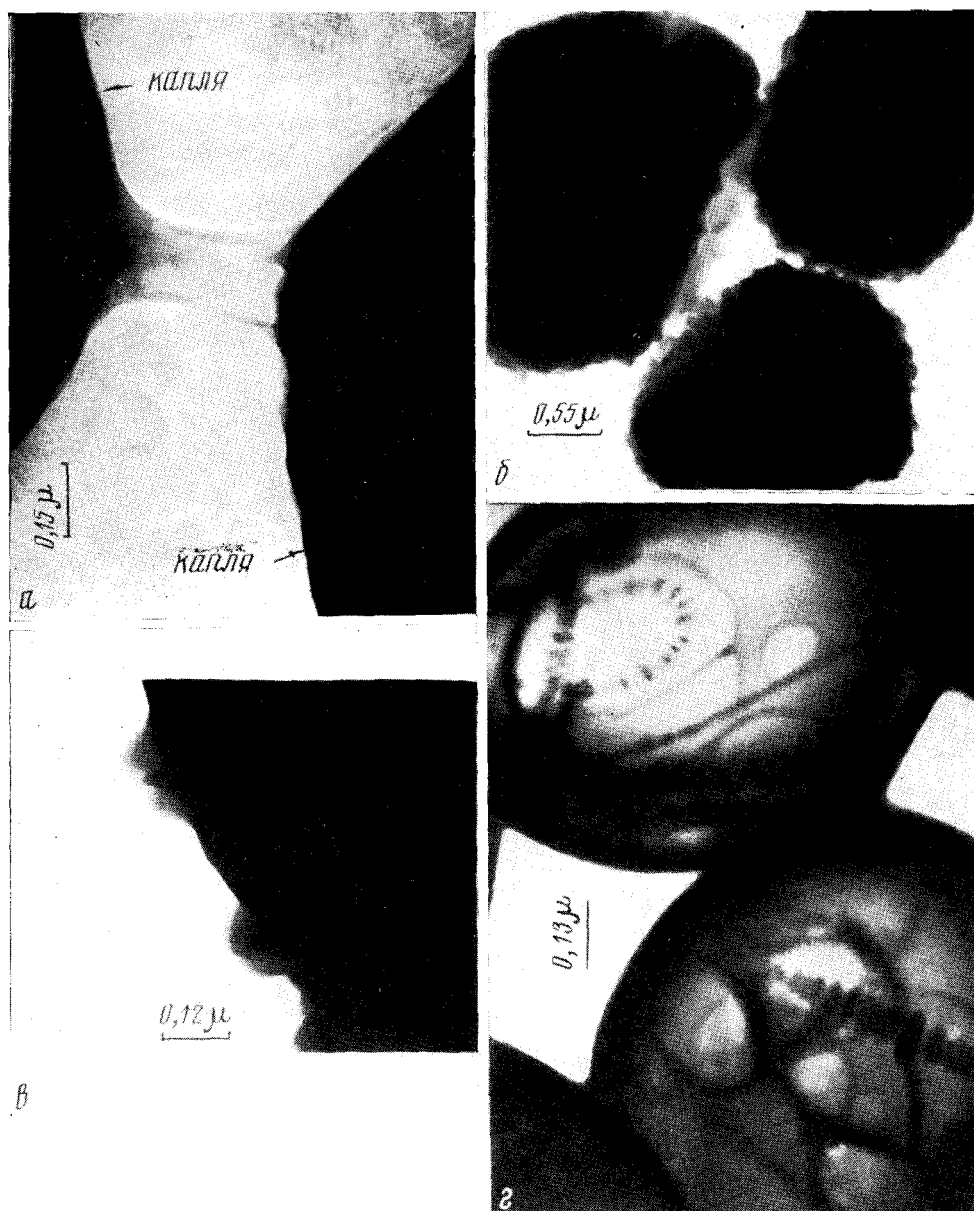


Рис. 1. Вид коацерватных капель в электронном микроскопе. а, б — гистон — ДНК — пероксидаза — прогаллол (пурпурогаллин); в — гистон — гуммиарабик — полифенолоксидаза — пирокатехин (о-хинон); г — гистон — ДНК — полифенолоксидаза — пирокатехин (о-хинон)