

Я. Е. ХЕСИН, Д. С. АРХАНГЕЛЬСКИЙ

**ИССЛЕДОВАНИЕ СИНТЕЗА ВИРУСНОГО АНТИГЕНА
В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК, ЗАРАЖЕННЫХ АДЕНОВИРУСОМ
И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМ ПРЕПАРАТОМ ЕГО ДНК**

(Представлено академиком В. Д. Тимаковым 3 XI 1975)

В развитии современных вирусологических исследований особое значение приобретает необходимость непосредственного обнаружения под микроскопом и определения мест локализации продуктов взаимодействия вируса с клеткой, в частности вирусспецифического антигена, индуцированного инфекционным агентом. Для этой цели наиболее точным методом служит люминесцентный анализ с применением флуоресцирующих антител⁽¹⁾. Это в равной степени относится и к аденовирусам, на модели которых в общих чертах установлены закономерности динамики формирования вирусспецифического антигена при заражении клеток цельным вирусом⁽²⁻⁴⁾. Что же касается синтеза вирусного антигена, индуцированного биологически активным препаратом ДНК аденовируса, то данные по этому вопросу отсутствуют.

Изложенное послужило отправным моментом для сравнительного изучения динамики формирования вирусного антигена, индуцированного аденовирусом 3 серотипа и препаратом аденовирусной ДНК⁽⁵⁾, в различных по чувствительности клеточных культурах. Целевая направленность работы определялась актуальностью и новизной изучения вопросов вирусспецифического процесса на уровне инициации инфекции изолированным геномом вируса.

Опыты поставлены на культурах клеток HeLa, HEp-2 (высокочувствительных), Fl, RN, Vero (менее чувствительных), ФЭК (малочувствительных) и ПЭС (нечувствительных к аденовирусу).

Клетки культивировали на полосках покровных стекол в пробирках со средой, состоящей из равных объемов среды 199 и 0,5% гидролизата лактальбумина с 10% бычьей сыворотки. После формирования клеточного пласта (48—72 часа) культуры заражали 100 ТЦД₅₀ на 1 мл вируса и вирусной ДНК. Покровные стекла с зараженными и интактными культурами исследовали через каждые 3 часа в течение первых суток, затем с интервалом в 12 час. до 5 суток. Препараты фиксировали в охлажденной смеси 96° этилового спирта и ацетона в течение 10 мин. на холоду, апплицировали ФИТЦ-глобулинами по ранее описанной методике⁽⁶⁾ и микроскопировали.

Для характеристики динамики синтеза вирусспецифических антигенов и количественного учета вовлеченных в процесс клеток определяли индекс иммунофлуоресценции (ИФ) путем подсчета числа клеток с аденовирусным антигеном из 100 просмотренных в клеточном пласте.

В результате проведенных исследований показано, что в процессе роста и размножения клеточные элементы вследствие аутофлуоресценции светились бледно-серым цветом. Аналогичная флуоресценция наблюдалась и в препаратах культур клеток, апплицированных гомо- и гетерологичными к аденовирусу ФИТЦ-глобулинами. Тотчас после внесения в культуры вируса при просмотре в люминесцентном микроскопе отмечалось незначительно усиленное свечение клеток по сравнению с контролем. Оно было

сходно у всех культур, но, судя по индексу флуоресценции, более активно реагировали клетки HeLa, а менее активно — клетки ФЭК. Свечение постепенно затухало и исчезало по истечении 30 мин. — 2 час. от начала инфицирования клеток HeLa и ФЭК соответственно. При заражении культур препаратом ДНК свечение в эти сроки не выявилось.

По-видимому, такая «сверххраняя» флуоресценция при нативновиральной инфекции обусловлена адсорбцией вируса на цитоплазматических мембранах. Отсутствие аналогичного свечения в этот же срок в культурах, апплицированных препаратом ДНК, вполне коррелирует с сущностью реакции иммунофлуоресценции. Дальнейшие наблюдения за инфицированными культурами показали, что специфическая флуоресценция, указывающая на образование вирусных белковых субстратов, регистрировалась при инфекции, индуцированной препаратом ДНК, в клетках HeLa и HEp-2 через 2 часа (ИФ 28 и 20), в клетках FI и RH — через 3 часа (ИФ 18 и 16), в клетках Vero — через 4 часа (ИФ 16), в клетках ФЭК — через 6 час. (ИФ 10), а в клетках ПЭС — через 12 час. (ИФ 60). При инфицировании аденовирусом эти показатели были равны в клетках HeLa и HEp-2 6 час. (ИФ 25 и 23), в клетках FI и RH 7—9 час. (ИФ 57 и 56), в клетках Vero и ФЭК 9—12 час. (ИД 50 и 35), а в клетках ПЭС антиген не обнаружен. Свечение было матовым и равномерно распределялось в основном в ядрах клеток, а иногда в перинуклеарной зоне цитоплазмы. Из сравнения приведенных данных четко видно различие во времени образования раннего аденовирусного антигена в клеточных культурах, зараженных аденовирусом и препаратом его ДНК.

Наши данные коррелируют с результатами, полученными другими авторами при исследовании внутриклеточной локализации и динамики накопления аденовирусного антигена с помощью метода флуоресцирующих антител (^{7, 8}).

Структурный вирусный белок в культурах клеток HeLa и HEp-2 появлялся в ядрах к 6 часу инкубирования при инфекции, вызванной препаратом ДНК (ИФ 30 и 28), и к 12 часу — при аденовирусной (ИФ 60) инфекции. Первоначально это были очень мелкие зеленоватые гранулы, количество которых нарастало синхронно с процессом развития инфекции. Как видно из приведенных данных, время появления специфического антигена и места его локализации в клетках HeLa и HEp-2 были в основном идентичны, лишь незначительно отличались индексы флуоресценции указанных культур.

Несколько иную картину наблюдали в культурах клеток FI, зараженных нативным вирусом и препаратом аденовирусной ДНК. Так, структурный антиген при инфекции, вызванной ДНК, выявлялся через 7 час. (ИФ 75), а при аденовирусной инфекции — через 15 час. (ИФ 57). Кроме того, были обнаружены различия в характере свечения вирусных белков. Антиген определялся в виде рыхло связанных субстратов неправильной формы в отличие от гранулярных включений, которые наблюдали в клетках HeLa и HEp-2. Однако через 9—15 час. от начала инфицирования в отдельных клетках FI можно было обнаружить скопление вирусного антигена в виде округлых полиморфных гранул, густо заполняющих увеличенное ядро.

В культурах клеток RH и Vero структурный белок при инфекции, вызванной ДНК, выявлялся через 9 час. (ИФ 72 и 70). При аденовирусной инфекции антиген определяли в клетках RH через 18 час. (ИФ 57), а в клетках Vero — через 21 час (ИФ 52). Антиген конденсировался в виде гранул, несколько укрупненных, но в меньшем количестве по сравнению с клетками HeLa и HEp-2.

В клетках ФЭК структурный антиген выявлялся при инфекции, индуцированной ДНК, через 12 час. (ИФ 12) и максимально накапливался к 96—120 час. Структурный антиген при аденоинфекции выявлялся через 24 часа (ИФ 40). Наибольшее его количество отмечалось на третьи сутки

после заражения (ИФ 50), однако интенсивность свечения никогда не достигала той степени, которую мы наблюдали в ранее исследованных культурах. К 96 час. число клеток, содержащих вирусный антиген, постепенно падало (ИФ 38), и на 6–7 сутки флуоресцирующие очаги не обнаруживались. Полученные результаты свидетельствуют о том, что аденовирус 3 серотипа в клетках малочувствительной культуры ФЭК вызывал abortивную инфекцию. Аналогичные результаты были получены во всех работах, выполненных на этих культурах и обобщенных в обзоре (⁹).

Особый интерес представляют клетки ПЭС, в которых при заражении аденовирусом структурный антиген не обнаруживался на протяжении всего срока исследования. В то же время при их заражении препаратом ДНК синтез структурного антигена происходит в общих чертах так же, как и в остальных культурах. Отличительным признаком являлось то, что вирусный антиген продолжал накапливаться в клетках, пораженных ранее. В остальных клетках антиген не выявлялся. Такое явление дает основание полагать, что в клетках ПЭС, зараженных препаратом ДНК, индуцируется синтез аденовируса одной генерации.

Дальнейший процесс формирования белковых структур по характеру и месту расположения антигенных комплексов практически не имел различий во всех взятых в опыт культурах, за исключением культур ФЭК и ПЭС, об особенностях формирования антигена в которых сказано выше. В ядрах накапливался вирусный антиген в виде гранул и их конгломератов. Основным отличием было время появления антигенных комплексов и индексы флуоресценции. Наиболее яркой была картина иммунофлуоресценции в культурах HeLa и HEp-2. В клетках Fl, RH, Vero репродукция специфического белка происходила, судя по нарастанию интенсивности иммунофлуоресценции, в более замедленном темпе, хотя форма и места расположения вирусных антигенов повторяли в основном характер аналогичных образований в клетках HeLa и HEp-2. Видимо, механизм процесса формообразования вирусного антигена является идентичным для всех клеточных линий, которые мы исследовали.

Кинетика синтеза белков и локализация мест синтеза в клетках при инфекции, индуцированной ДНК, существенно не отличаются от того, что найдено при аденовирусной инфекции, за исключением большего в количественном отношении насыщения нуклеоплазмы специфическим белком и укороченного инкубационного периода. Характерной особенностью действия аденовирусной ДНК является более высокая тропность ко всем взятым в опыт культурам клеток, чем это наблюдается при действии нативного вируса. Формирование вирусспецифического антигена индуцируется аденовирусной ДНК в равной степени в клетках культур, чувствительных, малочувствительных или нечувствительных к действию нативного вируса.

Институт эпидемиологии и
микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
3 XI 1975

Институт микробиологии и вирусологии
Академии наук КазССР
Алма-Ата

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ A. H. Coons, Gen. Cytochem. Methods, № 1, 399 (1958). ² J. Chuat, I. Peries et al., C.R., v. 263, 12 (1966). ³ M. Ito, J. Melnick, H. Mayor, J. Gen. Virol., v. 1, 2 (1967). ⁴ Л. К. Масленникова, Ф. С. Носков, Тр. Ин-та эпидемиол. и микробиол. им. Пастера, т. 35 (1968). ⁵ Д. С. Архангельский, Здравоохр. Казахстана, № 6, 53 (1973). ⁶ Д. С. Архангельский, В сб.: Респираторные вирусы и клетка, «Наука», 1969, стр. 60. ⁷ W. C. Russel, K. Hayashi et al., J. Gen. Virol., v. 1, 4, 495 (1967). ⁸ Н. С. Дяченко, Компоненты аденовирусов, их свойства и распределение в инфицированной клетке. Автореф. докт. дисс., Киев, 1974. ⁹ M. Green, Ann. Rev. Biochem., v. 39, 701 (1970).