

Биол.-ж. Армении, № 1. (43). 1990

УДК 517.352.315

ВЛИЯНИЕ ИОННОЙ СИЛЫ СРЕДЫ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ВИРУСОВ С МЕМБРАНАМИ ЭРИТРОЦИТОВ

А. М. КОРХМАЗЯН, В. А. СТЕПУШКИН*, Г. Б. МЕЛИКЯН

Ереванский физический институт ГКАЗ СССР

*Институт вирусологии им. Д. Н. Ивановского АМН СССР, Москва

Установлено, что ионная сила среды влияет на характер связывания вирусов Сендай и гриппа с мембранами эритроцитов. В физиологических условиях связывание вирусов с мембранами имеет специфическую природу, в среде же с низкой ионной силой связывание неспецифично. В этом случае отсутствует агрегация эритроцитов вирусами даже в условиях наведенного длительного контакта клеток при диэлектрофорезе. Следствием неспецифического связывания, по-видимому, является и отсутствие вирус-индуцированного гемолиза в среде без ионов.

Հայտնաբերված է, որ միջազգային իրական հսժը ազդում է էրթթարոցդտների թաղանթների հետ Ռենդայն և գրիպի վիրոսաների կապման բույսթի վրա: Ֆիրդուլադիանս պայմաններում Ֆլյուլ վիրուսները կապվում են թաղանթների հետ յուրահատուկ նդանակով, իսկ ցածր իրականում ուր ունեցող լուծույթներում տնդի է անեևում ու յուրահատուկ փոխադնեցվություն: Արքիվի ղկարում րաջակայում է էրթթարոցդտների վիրուսային ազյուտինացիան՝ նույնակ բջիչների ստիպողական կոնտակտի պայմաններում դիէկիկաբոֆորեդի ժամանակ: Ու յուրահատուկ կապման հետևանք է նաև վիրուսային հնմուլիդի րաջակայությունը ցածր իրականում ունեցող լուծույթներում:

It has been shown that binding of Sendai and influenza viruses is affected by the ionic strength of solution. We have observed the specific binding of these viruses with membranes under physiological conditions and unspecific binding in low ionic strength solution. In the latter case there is no agglutination of erythrocytes by viruses under normal conditions and in dielectrophoresis experiment. Unspecific binding of viruses to erythrocytes in low ionic strength solution can explain the absence of virus-induced hemolysis.

Вирусопонная сила — мембраны эритроцитов.

Барьером для проникновения вирусов в клетку является клеточная мембрана, и специфичность взаимодействия вирусов с клеткой определяется расположенными на поверхности мембраны рецепторами. Изу-

Сокращения: ГАЕ—гематогенная единица

чение вирус-специфических рецепторов представляет большой интерес как с научной, так и с практической точки зрения в плане контроля и профилактики на первом этапе взаимодействия вирусов с клетками. Орто- и парамиксовирусы вызывают агглютинацию эритроцитов. Эта реакция была известна с 40-х годов и широко изучалась в 50—60-е годы [5]. Однако химическая структура рецепторов вируса на поверхности эритроцитов была установлена недавно. По данным разных авторов, такими рецепторами вируса Сендай являются гликопротеиды [10, 13] или ганглиозиды, имеющие концевую N-ацетилгалактозидную кислоту [11, 14]. Рецепторами вируса гриппа (классической чумы птиц) на поверхности эритроцитов также являются ганглиозиды [12]. Цель наших исследований заключалась в выявлении характера взаимодействия вирусов с рецепторами клеточных мембран в средах с различной ионной силой.

Материал и методика. Вирус гриппа классической чумы птиц (ГРВ штамм Вейбридж) титровали в аллантоиной полости куриных эмбрионов в течение 24 ч при 37° и вирус Сендай (HIV, штамм 960) в течение 72 ч. Вирусы концентрировали дифференциальным центрифугированием и очищали в градиенте плотности сахараозы, как указано [1]. 40-меченный вирус получали по описанному методу [3]. Титр геммагглютинирующей и гемолитической активности вирусов определяли стандартными методами [1]. Гемолиз эритроцитов в присутствии ГРВ проводили в Na-ацетатном буфере (pH 5,2), а в случае HIV — в NaCl (115 мМ) — триолеин (5 мМ) буфере pH 7,4 (HT-буфер). Для экспериментов в среде с низкой ионной силой препараты вирусов dialизовали 24 ч при 4° против изотонического раствора сахараозы, 5 мМ триолеин pH 7,4 (CT-буфер). Концентрацию белка в препаратах вирусов определяли по методу Лоурри [4].

В работе использовали кровь I группы здоровых доноров. Эритроциты дважды отмывали изотоническим буфером. В случае проведения экспериментов в среде с низкой ионной силой две последние отмывки проводили CT-буфером. Обработку 1%-ной суспензии эритроцитов нейраминидазой из *Vibrio cholerae* (Горький, СССР) проводили в течение 2 ч при 37° в концентрации 0,25 Мг/мл в HT-буфере. После этого эритроциты дважды отмывали соответствующим буфером и исследовали гемолитическую активность и связывание вирусов. Связывание вируса Сендай с эритроцитами определяли по титру вируса в надосадочной жидкости после инкубации его с эритроцитами и центрифугирования. В случае вируса гриппа эритроциты инкубировали со смесью радиоактивного и «холодного» вирусов и измеряли радиоактивность надосадочной жидкости.

Дополнительное исследование геммагглютинации под действием HIV в CT-буфере проводили при помощи диэлектрофореза, обеспечивающего контакт эритроцитов [16]. Напряжение подавали с генератора ГЗ-7А, наблюдения осуществляли микроскопом Биолан-М.

Измерение нейраминидазной активности вируса Сендай проводили по описанному методу [1]. Для изучения влияния ионной силы раствора вирус инкубировали с растворимым галогенсодержащим белком фетуином в CT-буфере (контрольный эксперимент проводили в HT-буфере).

Результаты и обсуждение. Эксперименты на модельных системах показали, что взаимодействие вирусов гриппа и Сендай с ганглиозидами не зависит от ионной силы раствора, т. е. электростатические эффекты не влияют на связывание вирусов с соответствующими рецепторами [2]. Нами была проверена специфичность связывания тех же вирусов с эритроцитами в растворах с низкой ионной силой. Зависимость связывания вируса Сендай с эритроцитами от концентрации его в CT-буфере линейна в исследованном диапазоне концентраций, что

свидетельствует о неспецифическом характере взаимодействия (отсутствие насыщения). В этих условиях с эритроцитами связывается около 50% вируса, что при высоких его концентрациях дает большее связывание, чем в физиологических условиях (рис. 1А). В последнем случае форма кривой зависимости свидетельствует о специфическом характере связывания вируса с эритроцитами.

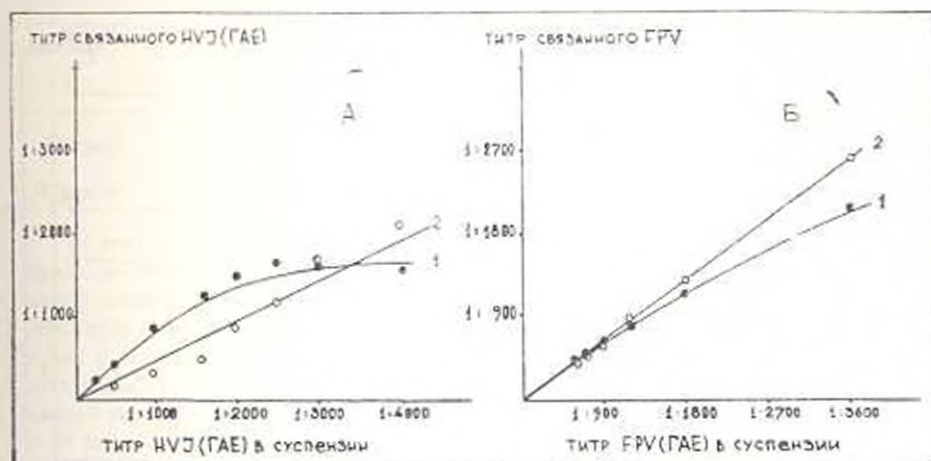


Рис. 1. Связывание вирусов Сендай (рис. 1А) и ^{14}C -меченого вируса гриппа (рис. 1Б) с эритроцитами в физиологических условиях (●, кривая 1) и в изотоническом растворе сахарозы (○, кривая 2). 1—А—после инкубации эритроциты с HNV (1 час, 1°C) в СТ- и НТ-буферах, суспензию клеток осаждали, отбирали супернатант и определяли титр вируса в нем, разбавляя последовательно НТ-буфером. 1Б—эритроциты инкубировали со смесью радиоактивного и «холодного» вирусов FPV. Связывание определяли по радиоактивности надосадочной жидкости. Затем, зная удельную радиоактивность препарата, пересчитывали количество связанного вируса в ГАЕ.

Примерно такая же ситуация была выявлена нами при изучении связывания вируса гриппа с эритроцитами в среде с нормальной и низкой ионной силой (рис. 1Б). В буфере с низкой ионной силой связывание вируса составляет 50–60% независимо от концентрации его в инкубационной среде, что указывает на неспецифический характер связывания. В НТ-буфере вирус специфически связывался с эритроцитами.

Нами проведена оценка константы связывания обоих вирусов с эритроцитами в физиологической и безионной средах. Оценка осуществлялась графическим способом в координатах Лайнуивера-Берка. На рис. 2 приведен график зависимости связывания вируса Сендай в указанных координатах. Аналогичная картина получена и для вируса гриппа. Для приведения констант связывания к общепринятой размерности (M^{-1}) определяли содержание белка в вирусных препаратах: 1 ГАЕ содержит около $8 \cdot 10^{-5}$ мг/мл белка. Далее пересчитывали ГАЕ в моли вируса, как указано в работе [4]. При этом для вируса Сендай получается соотношение $1 \text{ ГАЕ} = 1,7 \cdot 10^{-13} \text{ M}$, а для вируса гриппа $1 \text{ ГАЕ} = 3,4 \cdot 10^{-13} \text{ M}$. Константа связывания HNV с эритроцитами в физиологической среде составляет $9 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, а FPV— $2,1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. В без-

ной среде константа связывания для обоих вирусов близка к нулю.

Следует отметить, что в среде с низкой ионной силой оба вируса неспособны агглютинировать эритроциты человека, вероятно, вследствие неспецифического связывания. Нами обнаружено также, что в

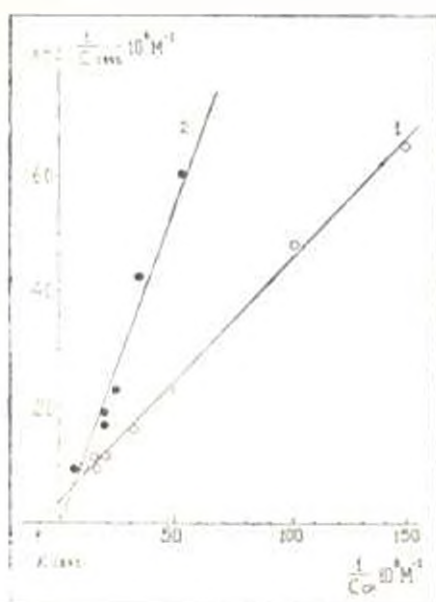


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость связывания вируса Сендай с эритроцитами от титра вируса в среде в физиологических условиях (прямая 1) и в сахарозном буфере (кривая 2) в координатах Лайнувер-Берка. Точка пересечения прямой 1 с осью абсцисс численно равна константе связывания HV_1 с мембранами эритроцитов.

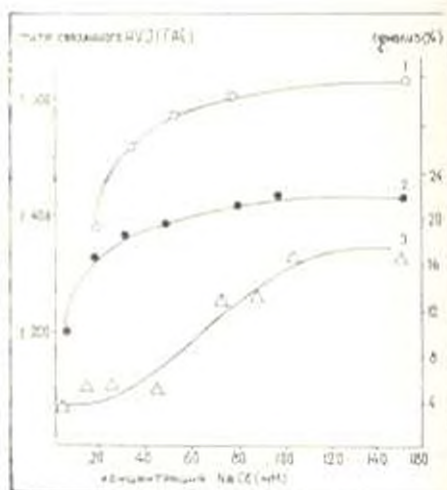


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость связывания вируса Сендай с эритроцитами и вирус-индуцированного гемолиза от ионной силы раствора. 1—связывание при титре вируса в разведении 1:500 ГАЕ; 2—связывание при 1:750 ГАЕ; 3—гемолиз в %. Вирус инкубировали с эритроцитами в растворах с различной концентрацией NaCl. Тоничность раствора доводили до 290 мОсм соответствующими добавками сахарозы. Гемолиз эритроцитов, инкубированных с вирусом в различных растворах, регистрировали после осаждения и ресуспендирования в HT-буфере.

среде с низкой ионной силой исследованные вирусы не обладают гемолитической активностью. Для изучения причины отсутствия агглютинации и гемолиза эритроцитов мы провели ряд экспериментов. Прежде всего мы показали, что предынкубация препаратов вирусов в СТ-буфере в течение 24 ч при 4° не влияет на исследуемые свойства вирусов. С другой стороны, непродолжительная предынкубация эритроцитов в СТ-буфере также практически не оказывает влияния на вирус-индуцируемый гемолиз в физиологических условиях. Таким образом, возможные изменения свойств вирусов и эритроцитов в среде с низкой ионной силой обратимы. Измеренная нами активность нейраминидазы вируса Сендай в физиологических условиях составила 0,03 МЕ/мл, а в СТ-буфере она была заметно ниже — 0,001 МЕ/мл.

Предынкубация НВJ с эритроцитами в СТ-буфере с последующей отмывкой несвязавшегося вируса и ресуспендированием в ИТ-буфере снижала вирус-индуцируемый гемолиз в 3 раза по сравнению с контролем (табл. I). С другой стороны, если не отмывать несвязавшийся ви-

Величина индуцированного вирусами Сендай и гриппа гемолиза эритроцитов (в процентах) при различных вариациях ионной силы среды

Условия гемолиза

Вirus	I	II	III	IV	V	VI
Сендай	0	30	10	37	21	31
Гриппа	0	51	6	51	25	31

I—гемолиз в изотоническом сахарозном буфере; II—гемолиз в NaCl-трис буфере после отмывки несвязавшегося вируса; III—гемолиз после инкубации в сахарозе, осаждения, декантирования, надосадка с несвязавшимся вирусом и ресуспендирования в NaCl-трис буфере; IV—гемолиз после инкубации концентрированной суспензии эритроцитов с вирусом в соответствующей концентрации в физиологических условиях и последующего разведения в 50 раз NaCl-трис буфером; V—гемолиз после инкубации концентрированной суспензии эритроцитов в СТ буфере и последующего разбавления в 50 раз ИТ-буфером; VI—то же, что V, но с дополнительной инкубацией 30 мин при 4° после перевода в NaCl.

рус, то при переносе в NaCl гемолитическая активность практически не изменяется. На индуцируемый вирусом гриппа гемолиз инкубация эритроцитов в среде с низкой ионной силой действовала более выражено. Однако и в этом случае последующая инкубация в ИТ-буфере без отмывки вируса существенно увеличивала гемолитическую активность.

Для выявления роли сialосодержащих компонентов эритроцитарной мембраны в гемолизе, индуцированном вирусами в физиологических условиях и в растворе низкой ионной силы, клетки обрабатывали нейраминидазой. При этом выявлено резкое снижение вирус-индуцированного гемолиза в нормальных условиях. Однако после инкубации в СТ-буфере вирус гриппа, в отличие от НВJ, гемолизировал эритроциты, обработанные нейраминидазой. Так, в ИТ-буфере гемолиз снижался после обработки нейраминидазой с 67 до 3%, а в СТ-буфере, наоборот, возрастал с 0 до 12%.

Мы исследовали также влияние ионной силы раствора на связывание вируса Сендай и гемолиз эритроцитов (рис. 3). Количество связанного вируса существенно возрастает при увеличении концентрации NaCl с 5 до 40 мМ. В то же время процент гемолизированных эритроцитов резко возрастает лишь в диапазоне концентраций соли 60—100 мМ.

Нами изучена возможность агглютинации эритроцитов в изотоническом растворе сахарозы при наличии дополнительной сближающей силы между эритроцитами. Наложение переменного неоднородного электрического поля на эритроциты, в безионной среде (СТ-буфер) обеспечивало образование клеточных цепочек. В обычных условиях та-

кие цепочки обратимы, т. е. после выключения поля они распадаются. Введение вируса Сендай в диэлектрофорезную ячейку не вызывало «склеивания» эритроцитов и образования необратимых цепочек. Предынкубация эритроцитов (0,05%-ная суспензия) с вирусом в ИТ-буфере (100—200 ГАЕ) при 4° в течение 15—20 мин или при 4° 15 мин с последующей инкубацией при 37°C 20—30 мин также не приводила к необратимому склеиванию эритроцитов, агрегированных в диэлектрическом поле после перенесения в сахарозу. В случае инкубации при 37° вирус должен сливаться с эритроцитами и вирусные гликопротеиды должны необратимо встраиваться в эритроцитарную мембрану. Тем не менее из таких клеток не удается сформировать необратимые цепочки. Таким образом, в растворах с низкой ионной силой исследованные вирусы не способны агглютинировать эритроциты независимо от способа приведения их в контакт.

Проведенные исследования показали, что характер связывания вирусов Сендай и гриппа с эритроцитами различен в средах с низкой и высокой ионной силой. Полученные нами значения констант связывания H₁N₂ и GPV с эритроцитами в физиологических условиях ($9 \cdot 10^8$ и $2,4 \cdot 10^8$ M⁻¹ соответственно) близки по порядку величины к константам связывания, вычисленным на основании данных ряда авторов $6 \cdot 10^{10}$ [9], $1,1 \cdot 10^8$ [4], $2,7 \cdot 10^8$ M⁻¹ [15]. Эксперименты по связыванию вирусов с эритроцитами в среде с низкой ионной силой, напротив, свидетельствуют о неспецифическом связывании ($K \approx 0$ M⁻¹). В данном случае вирус должен взаимодействовать прежде всего с сialogликопротеидами эритроцитарной мембраны. Вероятно, связывание вируса с гликопротеидами в СТ-буфере, в отличие от ганглиозидов, не является специфическим. Точнее, можно предположить, что константы связывания с этими молекулами заметно ниже, чем с ганглиозидами.

Увеличение процента гемолиза эритроцитов, обработанных нейраминидазой, в присутствии вируса гриппа в СТ-буфере свидетельствует, по-видимому, об ингибирующем влиянии сialogликопротеидов эритроцитов. Для осуществления гемолитической активности вирус должен непосредственно взаимодействовать с ганглиозидами мембраны. Для этого ему необходимо преодолеть гликопротеидный «барьер» с помощью нейраминидазы. О возможной роли нейраминидазы и протеазной активности вирусов в процессе слияния с клеточной мембраной свидетельствуют литературные данные [6].

Зависимость связывания вирусов от ионной силы может быть обусловлена как изменениями в вирусных частицах, так и изменениями в поверхности эритроцитарной мембраны. В пользу первой версии говорят результаты экспериментов по изучению нейраминидазной активности вируса Сендай в среде с низкой ионной силой, так как в качестве субстрата использовался растворимый сialogликопротеид — фетuin. Однако изменения вирусных поверхностных белков должны быть обратимы (вирус полностью сохраняет способность к геммагглютинации и гемолизу после переноса в ИТ-буфер), а также не должны затрагивать ганглиозид-связывающего участка белка, поскольку исследованные вирусы сохраняют высокое сродство к рецепторным ганглиозидам и сли-

способность дискриминировать ганглиозиды в растворах с низкой ионной силой [2]. В пользу второй версии свидетельствуют данные Лерхе [7]. В среде без ионов гликокаликс эритроцитов претерпевает существенные изменения: за счет электростатического отталкивания происходит переориентация гликопротеидов и увеличение толщины гликокаликса, что, на наш взгляд, может приводить к нарушению нормального взаимодействия вируса с рецепторами.

Из таблицы видно, что вирус Сендай связывается с эритроцитами более «обратимо», чем вирус гриппа. В первом случае есть разница в степени гемолиза при отмывке несвязавшегося в ИТ-буфере вируса и разбавлении концентрированной суспензии вирусов с эритроцитами ИТ-буфером. Декантирование сахарозного супернатанта и перенос суспензии в NaCl приводит к снижению гемолиза по сравнению с контролем в 3 раза для HVI и в 8,5 раз для FPV. Если не отмывать не связавшийся в СТ-буфере вирус, то при переносе эритроцитов с вирусом в ИТ-буфер гемолиз восстанавливается практически полностью для вируса Сендай и примерно на 61% для вируса гриппа.

При переносе в NaCl связанный в сахарозе вирус может диссоциировать и вновь соединиться или может оставаться связанным с прежним участком мембраны. Из таблицы следует, что связанный в сахарозе вирус гемолизует эритроциты в NaCl менее эффективно (особенно FPV), чем не связанный: 6% гемолиза связавшимся вирусом гриппа и $31 - 6 = 25\%$ гемолиза — не связавшимся (связанный в СТ-буфере вирус составляет около 50% от общего количества). Этот факт дает основание предполагать, что связавшийся в сахарозе вирус не диссоциирует при переносе в NaCl, а остается связанным с прежними сайтами эритроцитарной мембраны, не обеспечивающими эффективного слияния вируса с мембраной и гемолиза. С этой точки зрения легко объяснить наблюдаемый эффект полного или частичного восстановления гемолиза при переносе из сахарозы в ИТ-буфер без отмывки вируса. В случае с HVI связанный в сахарозе вирус дает 10% гемолиза, а несвязанный — $37,2\% = 18,5\%$, что в итоге дает $28,5\%$ (см. табл.). Для FPV $6\% + 51,2\% = 57,2\%$.

Как видно из рис. 3, связывание вирусов Сендай с эритроцитами и вирус-индуцированный гемолиз в разной степени зависят от ионной силы раствора. Связывание быстро возрастает в области малых концентраций, тогда как увеличение гемолиза наблюдается лишь начиная с 60—70 мМ NaCl и достигает максимума в области 100 мМ. Если считать, что степень гемолиза отражает эффективность слияния вирусов с эритроцитами, то можно предположить, что именно в этом диапазоне концентраций NaCl рецептор(ы) принимают нужную для связывания и последующего слияния конформацию. Судя по связыванию вируса, изменения в структуре гликокаликса происходят во всем диапазоне концентраций, но вирус начинает «узнавать» рецепторный участок и сливаться с мембраной эритроцита в среде с достаточно высокой ионной силой.

Неспецифичность взаимодействия вирусов с мембраной эритроцитов в СТ-буфере проявляется в отсутствие не только гемолиза, но и

агглютинации. Иными словами, вирус как бы утрачивает свою мультивалентность в этих условиях и не способен склеивать и удерживать эритроциты в контакте даже после длительного наложения электрического поля, прижимающего клетки друг к другу в диэлектрофорезном эксперименте.

Дальнейшее исследование взаимодействия вирусов с клеточной мембраной в средах различного полного состава может дать дополнительную информацию о ранних стадиях вирусной инфекции.

Авторы признательны рукоподимой Какосян А. В. группе сотрудников отделения переливания крови 2-й клинической больницы г. Еревана за предоставление донорской крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баррет Т., Инглис С. В кн.: Вирусология. Методы. М., 1988.
2. Меликян Г. Б., Селпушкин В. А., Матинян Н. С., Коркмазян М. М., Аракелян В. Б. Биол. мембраны, в печати.
3. Селпушкин В. А., Проказова Н. В., Жигалин Л. С. и др. Мол. генетика, микробиология и вирусология, 12, 38—42, 1984.
4. Hoekstra D., Klapper K. J. Virology, 58, 87—95, 1986.
5. Howe G., Lee L. T. Adv. Virus Res., 17, 1—40, 1971.
6. Huang R. T. C., Diersch E., Rott R. J. Gen. Virol., 61, 295—301, 1985.
7. Lerche D. Bioreology, 19, 557—59, 1982.
8. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. J., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265—275, 1951.
9. Ali S., Klapper K., Hoekstra D. Biochemistry, 25, 2155—2166, 1986.
10. Suzuki J., Suzuki T., Matsumoto M. J. Biochem., 93, 1621—1631, 1983.
11. Suzuki J., Suzuki T., Matsumoto M., Matsumoto H. J. Biochem., 97, 1189—1190, 1988.
12. Suzuki J., Nagata I., Kato H., Matsumoto M., Nishino K., Nakajima K., Nishimura H. J. Biol. Chem., 261, (35), 17457—17461, 1986.
13. Umeda M., Nishino S., Inoue K. J. Biochem., 94, 1955—1966, 1983.
14. Umeda M., Nishino S., Inoue K. Virology, 131, 172—182, 1984.
15. Wolf D., Kanaka I., Nie S., Layton A. Experim. Cell Res., 159, 361—368, 1980.
16. Zimmermann H., Schaurich R., Gieseler G., Benz R. Angewandte Chemie, 94, 340—344, 1981.

Поступила 27.11.1989 г.