

PARASITIC DISEASES OF FISH IN THE WATER BASINS OF ARMENIA

V. V. GRIGORYAN, L. V. GRIGORYAN

In the fish, reared in ponds of the Republic of Armenia had been found 9 different types of pathogens of invasive diseases that lead to the fish depletion, reduce the salable conditions and cause death.

ИССЛЕДОВАНИЕ ИНТЕРФЕРОНОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИОФАГА MS2

М. Д. ДАВИТАШВИЛИ

*Кандидат биологических наук, ассоциированный профессор кафедры
биологии-экологии Телавского государственного университета
им. Я. Гогешашили, Грузия*

Вопрос о том, какие (одно- или двуспиральные) структуры РНК вирусных или синтетических индукторов могут стимулировать интерферогенез, дискутируется до сих пор. Существующему мнению о том, что двух- или многоспиральность РНК является необходимым условием для интерферонообразования [1] противоречат данные других авторов, показавших, что изолированные односпиральные нуклеиновые кислоты могут быть также хорошими стимуляторами синтеза интерферона [2].

Также разноречивые результаты, полученные при исследовании интерферогенной активности фагов и их нуклеиновых кислот. По данным некоторых авторов [3] только лишь репликативные формы бактериофагов MS2, f2 способны индуцировать интерферон. Несколько другие данные были представлены японскими авторами [4] относительно фага MS2 — однотяжевая РНК данного фага в результате обработки клеток куриного эмбриона индуцировала выработку интерферона и резистентность к вирусной инфекции.

В настоящем сообщении представлен материал по изучению интерферогенной активности РНК-содержащего фага MS2 и разных препаратов, полученных в процессе приготовления концентрата данного фага.

Методика. В работе был использован бактериофаг MS2 — активный в отношении *Escherichia coli* С 3060 (F+), содержащий РНК (молекулярный вес РНК $0,95-1,15 \times 10^6$, размеры частиц 24 мкм, длительность латентного периода 38 мин) [5]. Фаговые концентраты получали на бульоне с казеиновым гидролизатом и дрожжевым аутолизатом. Для полной адсорбции фаговых частиц на клетках *E. coli* добавляли хлорид кальция (до концентрации 2,2 мм). Выращивание после добавления фага продол-

жалось 2ч. Для полного разрушения клеток к лизату добавляли хлороформ (10 мл/л) и ЭДТА — (0,33 г/л), перемешивая в течение 30 мин при 35-36°, затем охлаждали до 2-4° и спустя 12 ч лизат центрифугировали при 30000 об/мин. Количество фаговых частиц в концентрате — 10^{11} пятнодоз/мл, в очищенном — 10^{12} пятнодоз/мл. В работе также использовали бактериальные клетки *E. coli* С 3060 (F+), РНК, выделенную из бактериальных клеток и из концентрата фага MS2, и репликативную форму РНК, далее обозначенную как рMS2. Комплекс рMS2 выделяли из индуцированных бактериальных клеток на 15-20 мин после заражения. Данный комплекс оказался резистентным к действию РНК-ази (100 γ/мл, 90 мин при 37°). РНК выделяли по методу Георгиева [6]. Содержание нуклеиновых кислот в препаратах измеряли на спектрофотометре в диапазоне 250-290 нм.

Интерфероногенную активность препаратов проверяли во взвеси клеток костного мозга, селезенки и периферических лейкоцитов разного происхождения, а также *in vivo* на белых мышах и мышах линии СВА. Для индукции выработки интерферона препараты вводили в следующих количествах: клетки *E. coli* с концентрацией 10^4 - 10^5 /мл — *in vivo*, 200 микробных тел и выше в расчете на клетку — *in vitro*; фаг MS2 с титром 10^3 /мл и выше — *in vivo*, 1000 фаговых частиц на клетку — *in vitro*; РНК — 20-50 γ/мл — *in vivo*, а 20-60 γ/мл — *in vitro*.

Оказалось, что противовирусные вещества, полученные при индукции отмеченными индукторами, обладают всеми свойствами интерферона (табл. 5).

Клетки костного мозга мышей и кур получали *ex tempore* промыванием стерильно вылученных бедренных костей необходимым количеством среды 199. Концентрацию жизнеспособных клеток костного мозга, селезенки и лейкоцитов крови доводили до 10^7 клеток смесью среды 199 с 5% бычьей сыворотки и добавляли индуктор в соответствующей дозе. Через определенное время инкубации при 37° и 1000 об/мин взвесь центрифугировали в течение 10 мин и брали надосадочную жидкость.

Для получения сывороточного интерферона подопытных животных заражали внутрибрюшинно соответствующими дозами индукторов и через определенные промежутки времени забирали кровь, ставили в термостат, отсасывали сыворотку и определяли в ней наличие интерферона.

Интерфероносодержащий материал, обработанный 10-20%-ным раствором HCl, доводили до pH 2,0-2,2, сохраняли 5-6 суток при 4° для инактивации интерфероногенов, после чего 20-40%-ным раствором NaOH доводили pH до 7,2-7,4 и центрифугировали при 1500 об/мин. В пробирки с гомологичными клетками вносили по 1 мл интерфероносодержащей жидкости двукратного разведения; после 24 ч инкубации клеток при 37° в пробирки вносили по 100 ЦПД₅₀ вируса везикулярного стоматита в объеме 0,1 мл. Через 48 ч определяли титр интерферона по его последнему

разведению, обеспечивающему сохранение клеточного монослоя от цитопатического действия индикаторного вируса (BBC).

Результаты. Во взвеси клеток костного мозга мышей были исследованы интерфероногенные свойства разных препаратов фага MS2 и бактериальной клетки *E. Coli* 2С 3060 (F+), а именно интактные клетки бактерий *E. Coli*, РНК, выделенная из *E. Coli*, фаг MS2, РНК, выделенная из данного фага, РНК рMS2, выделенная из зараженных клеток в стадии репликации. Полученные результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Индукция выработки интерферона во взвеси клеток костного мозга препаратами, полученными в ходе приготовления MS2 фагового концентрата и выделения рMS2

Как видно из таблицы, из всех препаратов, испытанных на

Индукторы интерферона	Титры интерферона в ед/мл
<i>E. Coli</i> С 3060 (F+)	20
<i>E. Coli</i> С 3060 (F+) + MS2	40
Фаг MS2 (концентрат)	<10
РНК – <i>E. Coli</i> С 3060	<10
РНК – фага MS2	<10
рMS2 – фага рMS2	320, 320

интерфероногенную активность, большее количество интерферона индуцировала рMS2 — репликативная форма РНК фага MS2 (титр 320 ед/мл). Интерферон не обнаруживался в надосадочной жидкости культур при внесении нерепликативной формы РНК, выделенной из фага MS2, или самого фага MS2 и РНК, выделенной из бактериальных клеток *E. Coli*. Малые титры интерферона были обнаружены при индукции клеток костного мозга бактериями *E. Coli* и *E. Coli*, зараженными фагом MS2 (титры интерферона 40 ед/мл).

Таблица 2

Образование сывороточного интерферона индуцированного рMS2

Продуценты интерферона	Средние титры интерферона по часам (в ед/мл)					
	2	4	6	8	18	24
Беспородные белые мыши	10	20	80	80-160	360	160
Мыши линии СВА	10	40	40	160	640	320

Для исследования интенсивности интерферонообразования в разных системах в последующих опытах была исследована репликативная РНК — рMS2 фага MS2.

Мышам внутрибрюшинно вводили рMS2 и спустя 2, 4, 6, 8, 18, 24 и 48 ч в сыворотке животных определяли наличие интерферона. Как видно из табл. 2, максимальный титр сывороточного интерферона, индуциро-

ванного рMS2, наблюдается на 18 ч инфекции. Оказалось, что титры сывороточного интерферона, индуцированного рMS2, несколько выше в мышах линии СВА, чем в беспородных белых мышах.

Примененный индуктор также успешно индуцировал образование интерферона во взвеси лейкоцитов человека и мышей, в клетках костного мозга разного происхождения (человека, мышей, кур) и клетках селезенки (табл. 3).

Результаты проведенных исследований по зависимости индукции выработки сывороточного интерферона рMS2 от возраста животных показали (табл. 4), что мыши-сосунки на введение данного индуктора, в отличие от клеток взрослых мышей, вырабатывали сывороточный интерферон в ничтожно малых количествах (10 ед/мл).

Таблица 3

**Индукция выработки интерферона рMS2 во взвеси лейкоцитов
и клеток костного мозга разного происхождения**

Источник интерферона	Титры интерферона по опытам (в ед/мл)			
	1	2	3	4
Лейкоциты человека	80	40	80	80
Лейкоциты мышей	40	160	80	160
Лейкоциты кур	160	320	80	80
Человеческий костный мозг	80	40	80	
Мышинный костный мозг	320	160	160	
Куриный костный мозг	160	160		
Клетки селезенки кур	320	320		

Клетки костного мозга и лейкоциты мышей-сосунков вообще не продуцировали интерферон в ответ на введение рMS2 (табл. 4).

Таблица 4

**Индукция выработки интерферона рMS2 в сыворотке и во взвеси
клеток мышей разного возраста**

Источник интерферона	Титры интерферона (в ед/мл), индуцированного рMS2 в сыворотке и клетках	
	взрослых мышей	мышей-сосунков
Сыворотка	640	<10
Клетки костного мозга	160	<10
Лейкоциты крови	80	<10

Таблица 5

**Исследование некоторых свойств интерферонов, индуцированных
pMS2 *in vivo* и *in vitro***

Продуценты интерферона	Титры интерферона после обработки			Взвесь ВВС+ИФ	Титрование на клетках		
	действия рН 2,0	действия +56°	действия трипсина		Л	ФЧ	КФ
Сыворотка мышей	640	10	10	10 ⁵	640	10	<10
Человеческие лейкоциты	80	10	10	10 ⁴	10	80	<10
Мышинный костный мозг	320	20	10	10 ⁵	10	320	<10

Были исследованы свойства нативных препаратов костномозгового, лейкоцитарного и сывороточного интерферона, индуцированных pMS2. Как видно из табл. 5, активность полученных противовирусных веществ на гомологичных клетках проявлялась в отношении вируса везикулярного стоматита в разведениях 80, 640 и 320 ед/мл и не проявлялась на гетерологичных клетках. Они оказались стабильными при рН 2,0, утрачивали частично активность термообработкой (прогрев при 56° в течение 1ч) и обработкой трипсином (37°, 30 мин). Кроме того, они не нейтрализовали тест вируса (ВВС). Таким образом, полученные противовирусные вещества по всем исследуемым параметрам не отличались от вирусиндуцированного интерферона.

Таким образом была показана интерферогенная активность репликативной формы РНК фага MS2-pMS2. Можно предположить, что наибольшая интерферогенная активность репликационной РНК фага MS2 связана с устойчивостью двунитевой формы РНК к воздействию клеточных РНК-аз.

ЛИТЕРАТУРА

1. Colby C., Duesberg P. H. Nature, 222, 5197, 1969.
2. Baron S., Bogomolova M., Billiau A., Levy H. B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 64, 1, 1969.
3. Vetrak I., Fuchsberger N., Lackovich V. Acta Microbiologica, Pol., Ser. A, 5(22), 1973.
4. Masaka M., Ioshimi K., Fukada T. Jap. J. Microbiol., 14, 1970.
5. Габрилович И. П. Основы бактериофагии, «Высшая школа», Минск, 1973.
6. Георгиев Г. П. В кн.: Химия и биохимия нуклеиновых кислот, «Медицина», Л., 1968.

MS2 ԲԱԿՏԵՐԻՈՖԱԳԻ ԻՆՏԵՐՖԵՐՈՆՈԳԵՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆ

Մ. Դ. ՂԱՎԻԹԱՇՎԻԼԻ

Հոդվածը վերաբերում է MS2 բակտերիոֆագի ինտերֆերոնոգեն ալկտիվության փորձարարական հետազոտության արդյունքներին, որոնք ունեն ինչպես տեսական, այնպես էլ գործնական նշանակություն:

STUDY OF THE INTERFERONOGENIC ACTIVITY OF PHAGE MS2

M. D. DAVITASHVILI

Study has been made on the interferonogenic activity of phage MS2, intact bacterial cells *E. coli* 2C 3060 (F+), RNA isolated from *E. coli* and phage MS2, and replicative form RNA of phage MS2, arising in the process of replication of this phage on bacterial cells. Studies of the interferonogenic activity of these preparations on the marrow bone cells and peripheral leukocytes of different origins, and in serum of mice revealed that the highest interferonogenic activity was characteristic of double-stranded RNA of phage MS2.