

А. С. АГАБАЛЯН, Э. Т. ГАСПАРЯН, А. Г. ГАЛСТЯН,
М. Г. БОСТАНДЖЯНОБРАЗОВАНИЕ И АНТИВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ
ИНТЕРФЕРОНА, ИНДУЦИРОВАННОГО АРБОВИРУСАМИ
В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК КУРИНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ

Изучены некоторые вопросы, связанные с образованием и антивирусной активностью интерферона, индуцированного вирусами. Показано, что предварительная обработка клеток интерфероном снижает инфекционную активность вируса с задержкой начала их репродукции, а также ингибирует синтез инфекционной вирусной РНК.

Установлено, что клетки после их предварительной обработки интерфероном приобретают резистентность к последующей вирусной инфекции.

Продукция интерферона может индуцироваться практически всеми вирусами независимо от их групп, штаммов, размеров, содержания той или иной нуклеиновой кислоты. Интерферонообразование вызывают также вирусы, которые, быстро размножаясь в клетке, способствуют ее разрушению, и опухолевые вирусы, вызывающие пролиферацию клеток.

Многочисленными исследованиями показано, что синтез новых вирусных частиц не является обязательным процессом в индукции интерферона, а образование последнего является не только независимым процессом, но может иметь место и при обработке клеток инактивированными различными способами вирусами [6, 7, 9]. Эти данные свидетельствуют о том, что репликативная форма вирусных РНК не является, как это предполагалось ранее [5, 11], единственным вирусным компонентом для индукции интерферона.

В настоящей работе изучались вопросы, связанные с действием интерферона на репродукцию вируса и синтез инфекционной вирусной РНК в культуре клеток куриных фибробластов. Изучалась также способность интерферона индуцировать развитие резистентности клеток к вирусной инфекции.

В работе использовали арбовирусы группы А: вирус венесуэльского энцефаломиеелита лошадей (ВВЭЛ) и вирус леса Семлики (ВЛС). Вирусы были получены из музея вирусов Института вирусологии АМН СССР.

Определение инфекционной активности вирусов осуществляли по способу, основанному на способности вирусов формировать бляшки под агаром [13]. Первично трипсинизированные фибробласты куриного эмбриона готовили по обычной методике.

Биологическая активность интерферона определялась методом, предложенным Фридманом и Вагнером [8, 15].

Способы экстракции и титрования инфекционных вирусных РНК описаны нами ранее [1].

С целью изучения репродукции вирусов клетки куриных фибробластов заражали массивными дозами вирусов (50—100 БОЕ/кл) при относительно высокой концентрации клеток (10^6 кл/мл). Контакт вируса с клетками осуществляли при 37° в течение 45—60 минут. После адсорбции клетки отмывали от неадсорбированного вируса, заливали свежей средой и оставляли при 37° . Это время принимали за начало инфекции и через определенные интервалы времени собирали культуральную жидкость, в которой определяли инфекционную активность вирусов. Другую часть клеток обрабатывали интерфероном в концентрации 100 ИЕ/мл в течение 24 часов, после чего клетки тщательно отмывали и заражали вирусом (50 БОЕ/кл). Через определенные интервалы времени отбирали пробы с целью выявления ингибирующего действия интерферона.

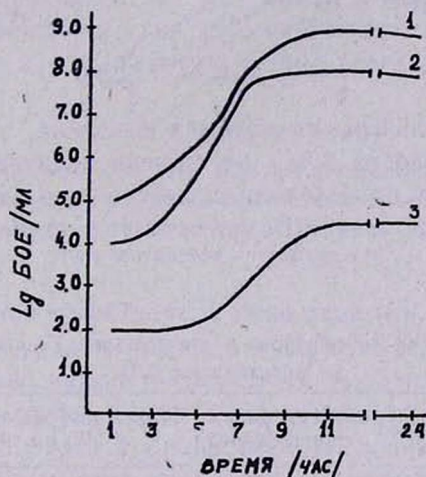


Рис. 1. Динамика репродукции ВВЭЛ и ВЛС в клетках, обработанных и не обработанных интерфероном. 1, 2—кривые репродукции ВВЭЛ и ВЛС в контрольных не обработанных интерфероном клетках. 3—репродукция ВВЭЛ после предварительной обработки клеток интерфероном (100 ИЕ/мл).

Как видно из рис. 1, кривые размножения ВВЭЛ и ВЛС практически одинаковы. Причем в контрольной культуре инфекционность выявляется уже через один час после инфицирования, тогда как в обработанных клетках репродукция вируса начинается через 5—6 часов, т. е. на 4—5 часов позже, чем в контроле. Интенсивность репродукции вирусов при этом заметно снижена. Урожай вируса в этом случае значительно ниже, чем в контроле.

Для изучения динамики нарастания резистентности клеток к вирусной инфекции культуру клеток обрабатывали интерфероном в концентрации 100 ИЕ/мл. Затем через определенные промежутки времени клетки тщательно отмывали от интерферона и заражали ВЛС с множественностью 10—20 БОЕ/кл. Через 18 часов после заражения надосадо-

ную жидкость собирали и определяли в ней титр вируса. На рис. 2 видно, что максимальная резистентность отмечается уже через 5—7 часов после внесения интерферона, а затем сохраняется на достигнутом уровне в последующие 24 часа. Аналогичные данные были получены нами ранее по определению динамики развития резистентности клеток, обра-

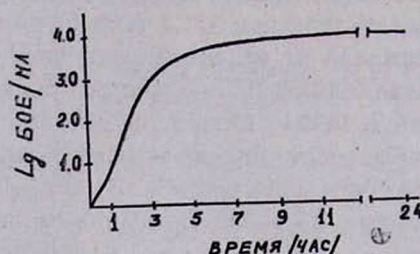


Рис. 2. Динамика нарастания резистентности клеток в присутствии интерферона (100'ИЕ/мл).

ботанных интерфероном к ВВЭЛ [2]. Установленный факт позволяет считать вполне достаточным 5-часовой контакт клеток с интерфероном при титровании последнего вместо обычно используемого 24-часового контакта.

В серии специальных опытов была выявлена зависимость интерферогенной способности ВЛС от степени инактивации последнего. Инактивацию вируса производили прогреванием при различных температурах в течение 30 минут. Результаты этих экспериментов приведены в табл. 1.

Таблица 1
Индукция интерферона в зависимости от степени инактивации ВЛС

Материал	Температура прогревания	Титры интерферона в ИЕ/мл
ВЛС	55°	160
	65°	80
	75°	20 - 40
	85°	0 - 10
	95°	0

Примечание. Титры интерферона указаны в величинах, обратных разведению.

Как видно из табл. 1, наиболее высокие результаты были получены с вирусом, прогретым при 55° в течение 30 минут. Использование более высоких температур (75° и выше) приводило к частичной или полной утрате способности вируса вызывать продукцию интерферона клетками.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что синтез интерферона может проходить в условиях, в которых отсутствует репродукция вируса. Последнее обстоятельство в свою очередь указывает на то, что синтез вирусных РНК не является обязательным этапом в продукции интерферона.

Особый интерес представляло изучение действия интерферона на репликацию вирусной РНК. С этой целью монослой клеток, обработанных и не обработанных интерфероном, заражали вирусом ВВЭЛ с множественностью 50—100 БОЕ/кл и в динамике отбирали культуральную жидкость, экстрагировали из нее вирионную РНК и определяли в ней инфекционную активность. Как показали результаты исследований, предварительная обработка клеток интерфероном в концентрации 100 ИЕ/мл приводила к ингибированию синтеза инфекционной РНК (рис. 3). При этом значения инфекционности вирионной РНК были на 1—1,5

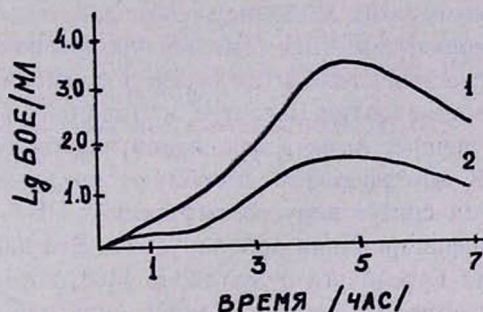


Рис. 3. Синтез инфекционной РНК ВВЭЛ в контрольных и обработанных интерфероном клетках. 1—динамика синтеза инфекционной РНК в контрольных клетках. 2—синтез инфекционной РНК после предварительной обработки клеток интерфероном.

lg БОЕ/мл ниже, чем в контроле. Важно отметить, что между подавлением интерфероном урожая вируса и синтеза инфекционной РНК обнаруживается довольно четкий параллелизм этих процессов, указывающий на их прямую связь. Наши данные находятся в полном соответствии с данными Локарта и Сривалсана [12], показавших, что ингибирование продукции вируса интерфероном является следствием ингибирования синтеза вирусных РНК.

Арбсвирусы группы А являются активными индукторами интерферонообразования и отличаются выраженной чувствительностью к его действию. Эти свойства делают их весьма удобной моделью для изучения основных закономерностей продукции и действия интерферона. При изучении репродукции вирусов в клетках, обработанных и не обработанных интерфероном, было отмечено заметное ингибирование урожая вируса и задержка репродукции вируса в клетках, предварительно обработанных интерфероном в течение 4—5 часов. По данным Ф. И. Ершова и Э. Б. Тазулаховой [3], задержка начала репродукции не зависит от продолжительности предварительной обработки клеток интерфероном, вследствие чего можно предположить, что процесс накопления антивирусного белка (АВБ), индуцированного интерфероном, достигает определенного уровня и завершается спустя 4—6 часов после инфицирования клеток.

В процессе исследования динамики развития клеточной резистентности было показано, что резистентность клеток к вирусной инфекции

отмечается уже через 1,5—2 часа после внесения интерферона, достигая своего максимума к 5—6 часам. Представляет интерес тот факт, что время, при котором отмечается начало развития резистентности, совпадает с временем, показанным для синтеза информационной РНК (иРНК) для АВБ [4]. Рабочая гипотеза этого обстоятельства была предложена Тейлором [14] и выглядит следующим образом: 1) интерферон, реагируя с клетками, вызывает синтез иРНК для АВБ; 2) начальный уровень антивирусной активности, наблюдаемый в клетках, обработанных интерфероном, и отмечаемый к 1—3 часам, по-видимому, связан с продукцией АВБ; 3) возрастающая резистентность, которая доходит до максимума к 5—7 часу, объясняется продолжающейся продукцией и накоплением АВБ. Имеется предположение, что с накоплением АВБ последний становится более доступным для разрушения, хотя продукция его, вероятно, остается постоянной [4].

Данные, полученные нами в отношении ингибирования синтеза инфекционной РНК интерфероном, позволяют предположить, что интерферон действует на синтез вирусспецифических РНК, синтезируемых в клетке после их инфицирования арбовирусами. Эти данные подтверждаются результатами Гроссберга и Холланда [10], которые показали, что непосредственная обработка инфекционной вирусной РНК интерфероном не снижает уровня ее инфекционности.

Институт

экспериментальной
биологии АН АрмССР

Поступила 29/XI 1973 г.

Ա. Ս. ԱՂԱՔԱՆԱՆ, Է. Տ. ԳԱՍՊԱՐՅԱՆ, Ա. Գ. ԳԱԼՏՅԱՆ, Մ. Գ. ԲՈՍՏԱՆՋՅԱՆ

ԻՆՏԵՐՖԵՐՈՆԻ ՀԱԿԱՎԻՐՈՒՄԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆՆ ՈՒ ԿԱԶՄԱՎՈՐՈՒՄԸ,
ԻՆԴՈՒԿՑԻԱԿԱՆ ԱՐԲՈՎԻՐՈՒՄՆԵՐՈՎ ՀԱՎԻ ՖԻՐՐՈՐԱՍՏՆԵՐԻ ԲԶՋԱՅԻՆ
ԿՈՒՆՏՐՈՒՅՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ու մ

Տվյալ աշխատանքը նվիրված է ինտերֆերոնի արտադրման և արգելա-
թյան որոշ հարցերին: Սահմանված է, որ կասեցնելով նոր վիրուսային մաս-
նիկների սինթեզի սկիզբը և զգալիորեն թուլացնելով սինթեզված վիրուսի
ինֆեկցիոն ակտիվությունը, միաժամանակ ճնշում է վիրուսային ինֆեկցիոն
ոճի-ի սինթեզը:

Ցույց է տրված, որ Ա խմբի արբովիրուսների ինակտիվացիայի ամենա-
օպտիմալ ռեժիմը, նրանց ինտերֆերոնագեն ունակության հայտնաբերման
համար հանդիսանում է տաքացումը 55—60°-ի պայմաններում 30' ընթաց-
քում:

Ցուցաբերված է, որ ինտերֆերոնով մշակված բջիջները կայունություն
են ձեռք բերում վիրուսային հետագա ինֆեկցիայի հանդեպ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Агабалян А. С., Меньших Л. К., Ершов Ф. И. Вопросы вирусологии, 1971, 5, стр. 527.
2. Ершов Ф. И., Агабалян А. С. Лабораторное дело, 1970, 4, стр. 228.
3. Ершов Ф. И., Тазулахова Э. Б. Антибиотики, 1970, 9, 832.
4. Baron S., Buckler C., Levy H., Friedman R. JEG, 6, Scientific Memo, 1966.
5. Burke D., Skehel J., Low M. JEG, 6, Scientific Memo, 1966.
6. De Mayer E., De Somer P. Nature, 1962, 194, 1252.
7. Dianzani F., Gagnoni S., Buckler C., Baron S. Proc. Soc. Expt. Biol. Med., 1970, 133, 324.
8. Friedman R. J. Bacteriol., 1966, 91, 1224.
9. Goorha R., Gifford G. Proc. Soc. Expt. Biol. Med., 1970, 134, 1142.
10. Grossberg S., Holland J. J. Immunol., 1962, 88, 708.
11. Isaacs A., Lindenmann J. Proc. Roy. Soc. B., 1957, 147, 258.
12. Lockart R., Sreevalsan T. Viruses, nucleic acids, cancer, 1963, 447.
13. Porterfield J. Nature, 1959, 183, 1069.
14. Taylor J. Biochem. Biophys. Res. Commun, 1964, 14, 447.
15. Wagner R. Virology, 1961, 13, 323.