

М. Х. ХАЗАНОВ, С. С. МАРЕННИКОВА и Т. Д. СЛАВКО

**АКТИВНОСТЬ КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ
И ОРГАНОВ, А ТАКЖЕ НУКЛЕОТИДАЗ ОРГАНОВ МЫШЕЙ
В УСЛОВИЯХ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ВИРУСА ГРИППА
НА ОРГАНИЗМ**

(Представлено академиком А. Д. Сперанским 24 XI 1953)

В настоящее время не существует единого мнения о патогенезе гриппозной инфекции. Согласно представлениям большинства зарубежных исследователей, в основе патогенеза вирусных инфекций и, в частности, гриппа лежит процесс размножения вируса. С другой стороны, отечественными вирусологами и клиницистами решающее значение в патогенезе гриппозной инфекции у человека придается токсикозу организма. В связи с этим представляло интерес выяснить, в какой мере нарушения обмена веществ при гриппозной инфекции обусловлены токсическим действием вируса гриппа.

Как известно, при внутривенном введении вируса гриппа последний в организме мыши не размножается. В связи с этим токсическое действие вируса изучалось нами методом внутривенного введения белым мышам весом 10—12 г вирусосодержащих жидкостей. Материалом для заражения являлась аллантоисная жидкость инфицированных куриных эмбрионов, а также очищенные культуры вируса гриппа. Очистка производилась методом адсорбции вируса из аллантоисной жидкости на эритроциты куриного эмбриона (2,5—3 часа при $+2^{\circ}$) с последующей элюцией (2,5 часа при 37°) вируса физиологическим раствором (до первоначального или в 2—10 раз меньшего объема).

Вирусосодержащий материал вводился мышам в хвостовую вену в объеме 0,25—1,0 мл; перед введением материал проверялся на отсутствие микрофлоры и устанавливался титр гемагглютининов в реакции агглютинации эритроцитов (РГА). В качестве контроля мышам вводилась цельная аллантоисная жидкость незараженных куриных эмбрионов (нормальная аллантоисная жидкость), или же нормальная аллантоисная жидкость, подвергнутая такой же процедуре очистки, как и зараженная вирусом («нормальная аллантоисная жидкость»).

В работе использовалось несколько вариантов (EM_1 , $EM_{алл}$ и EM_2) одного штамма вируса гриппа типа A_1 (EM). Эти варианты существенно не отличались друг от друга по интенсивности размножения в легких мышей или в эмбрионах кур, но резко различались по своему действию на них. Так, варианты EM_1 и EM_2 вызывали гибель эмбрионов кур лишь в очень небольшом проценте случаев, тогда как вариант $EM_{алл}$ почти в 100% случаев (¹). У мышей при интраназальном введении варианты EM_1 и $EM_{алл}$ вызывали лишь бессимптомную инфекцию, а вариант EM_2 — выраженный патологический процесс и гибель большинства зараженных животных. Применялись также аллантоисные культуры штамма PR-8 (типа), патогенного для мышей. Подопытные животные разбивались на группы по 12 мышей.

О степени токсического действия вируса судили по гибели мышей в ранние сроки после введения (10—72 часа), а также по изменению

общего состояния, которое проявлялось в потере обычной подвижности, появлении тремора головы и судорог. При вскрытии павших животных отмечались гиперемия и кровоизлияния в кишечнике, брыжечных железах и мышце сердца; обнаруживались также некротические изменения в печени и селезенке. Через 20 час. после введения материала часть животных из каждой группы убивалась путем перерезки подключичных вен под легким эфирным наркозом. Определение кислой фосфатазы и нуклеотидаз проводилось по методике, описанной ранее (2, 3).

Таблица 1

Активность кислой фосфатазы сыворотки крови, легких, печени и селезенки и нуклеотидаз легких, печени и селезенки*

№№ опытов	Вводимый материал	Очистка и концентр. материала	Доза в мл	Титр в РГА	Сыворотка крови, мг.л. фосфатаза	Печень		Селезенка		Легкие	
						нуклеотидаза	кисл. фосфатаза	нуклеотидаза	кисл. фосфатаза	нуклеотидаза	кисл. фосфатаза
1	Норм. мыши**	—	—	—	3,59	2,14	6,64	—	—	5,45	4,03
	Норм. аллант. жидкость	Неочищ.	1,0	0	4,40	1,74	6,60	—	—	5,21	5,00
	Апатогенный вирус ЕМ ₁	Аллант. жидкость	1,0	640	4,96	4,50	6,21	—	—	4,57	4,55
2	Патогенный вирус ЕМ ₂	То же	1,0	640	13,27	4,84	6,18	—	—	5,56	4,74
	Норм. мыши	—	—	—	3,41	—	—	—	—	—	—
	Норм. аллант. жидкость	Неочищ.	1,0	0	5,33	—	—	—	—	—	—
3	Апатогенный вирус ЕМ _{алл}	Аллант. жидкость (разведенная 1:3)	1,0	—	5,48	—	—	—	—	—	—
	Апатогенный вирус ЕМ _{алл}	Аллант. жидкость	1,0	320	6,13	—	—	—	—	—	—
	Патогенный вирус ЕМ ₂	То же	1,0	640	13,23	—	—	—	—	—	—
4	Норм. мыши Патогенный R-8	—	—	—	2,70	—	—	4,19	6,97	—	—
	Патогенный вирус ЕМ ₂	Очищ., концентр.	0,25	5120	4,30	—	—	5,00	7,53	—	—
5	Норм. мыши	—	—	—	3,30	—	6,17	3,20	7,80	—	—
	Патогенный вирус ЕМ ₂	Очищ., концентр.	0,25	10240	7,50	—	5,85	6,40	8,20	—	—
6	Норм. мыши	—	—	—	3,30	1,53	—	3,50	8,90	3,90	3,90
	Норм. аллант. жидкость	Очищ.	0,5	0	3,80	1,27	—	4,10	6,80	4,70	3,40
	Апатогенный вирус ЕМ _{алл}	Очищ., концентр.	0,5	640	3,20	2,83	—	5,10	7,30	5,10	3,50
7	Патогенный вирус ЕМ ₂	То же	0,5	1280	9,40	2,26	—	4,70	7,80	5,10	3,50
	Норм. мыши	—	—	—	3,04	2,17	6,10	4,43	9,02	—	—
	Норм. аллант. жидкость	Очищ.	0,5	0	3,75	2,05	6,28	3,96	9,15	—	—
8	Апатогенный вирус ЕМ _{алл}	Очищ., концентр.	0,5	640	3,20	3,00	7,00	5,69	7,93	—	—
	Патогенный вирус ЕМ ₂	То же	0,5	1280	10,37	3,60	6,01	6,43	8,81	—	—

* Активность кислой фосфатазы сыворотки крови выражена в мг % неорганического фосфора, освобожденного из субстрата за 1 час инкубации при 37°. Активность ферментов органов выражена в мг неорганического фосфора, освобожденного из субстрата 1 г сырой ткани за 1 час инкубации при 37°.

** Контрольная группа животных, которым ничего не вводилось.

Как видно из табл. 1 (опыт № 1), внутривенное введение 1,0 мл неразведенной аллантоисной жидкости нормальных эмбрионов или аллантоисной жидкости, содержащей вариант ЕМ₁, привело к повышению активности кислой фосфатазы сыворотки крови, соответственно, на 22 и 38% (т. е. апатогенный для мышей вариант ЕМ₁ оказал действие, сходное с таковым нормальной аллантоисной жидкости). Внутривенное же введение патогенного для мышей варианта ЕМ₂ вызвало повышение активности кислой фосфатазы сыворотки крови в 3,7 раза.

В связи с тем, что животным вводился не очищенный препарат вируса, а вируссодержащая аллантоисная жидкость, возникла необходимость дифференцировать токсическое действие патогенного варианта ЕМ₂ от возможного токсического действия продуктов обмена, выделяе-

мых в аллантоисную жидкость зараженным эмбрионом. Для этой цели в последующих опытах вместо варианта EM_1 использовалась аллантоисная жидкость эмбрионов, инфицированных вариантом $EM_{алл}$. Если бы на активность фосфатаз органов и тканей мышей оказывал влияние не сам вирус гриппа, а сопутствующие ему токсические продукты обмена куриного эмбриона, зараженного вирусом гриппа, то следовало бы ожидать, что аллантоисная жидкость эмбриона, зараженных высокопатогенным для них вирусом $EM_{алл}$, окажется для мышей даже более токсичной, чем аллантоисная жидкость эмбрионов, инфицированных вирусом EM_2 . Попутно еще раз отметим, что вариант $EM_{алл}$ для эмбрионов кур несравненно более токсичен, чем вариант EM_2 .

Однако, как это видно из опыта № 2, внутривенное введение мышам 1,0 мл неразведенной аллантоисной жидкости эмбрионов, зараженных вариантом $EM_{алл}$, привело примерно к таким же изменениям в активности кислой фосфатазы сыворотки крови, как и инъекции 1,0 мл аллантоисной жидкости нормальных эмбрионов. В противоположность этому, аллантоисная жидкость эмбрионов, зараженных вариантом EM_2 , вызвала, как и в опыте № 1, увеличение активности фермента почти в 4 раза. В следующих опытах (№№ 3—6) мышам вводилась уже не вирусосодержащая аллантоисная жидкость, а частично очищенный вирус и «нормальная аллантоисная жидкость», подвергшаяся подобной же обработке.

Анализ приведенных в табл. 1 материалов показывает: 1) что аллантоисная жидкость эмбрионов, зараженных высокопатогенным для них вирусом $EM_{алл}$, не отличается от нормальной аллантоисной жидкости по содержанию продуктов обмена эмбрионов, оказывающих влияние на активность кислой фосфатазы сыворотки крови; 2) что адсорбция и последующая элюция из эритроцитов освобождает культуру вируса $EM_{алл}$, а также и нормальную аллантоисную жидкость от каких-то веществ, оказывающих влияние на активность кислой фосфатазы сыворотки крови (опыты №№ 5, 6); 3) что материал, содержащий патогенный для мышей вирус EM_2 , резко отличается по своему действию на организм мышей от апатогенного для них варианта $EM_{алл}$. При внутривенном введении вируса EM_2 наблюдается резкое повышение активности фосфатазы сыворотки крови (до 340—390%) и это действие сохраняется и после очистки вирусного материала.

Таким образом, приведенные в табл. 1 данные с достаточным основанием позволяют предполагать, что изменения активности фосфатазы крови, происходящие при действии на организм материала, содержащего патогенный для мышей вирус гриппа (EM_2), являются результатом токсического действия самого вируса, а не токсических продуктов обмена веществ, присутствующих в вирусосодержащем материале. Сопоставление этих данных с нашими наблюдениями, показавшими, что одним из проявлений выраженной гриппозной инфекции у мышей является резкое повышение активности кислой фосфатазы сыворотки крови, приводит нас к заключению, что это изменение активности фосфатазы крови при выраженной гриппозной инфекции обусловлено именно токсическим действием вируса гриппа.

Приведенные экспериментальные данные показывают, что не процесс репродукции вируса, а его токсическое действие на организм лежит в основе одного из проявлений выраженной гриппозной инфекции (активации фосфатаз крови).

Следующим разделом исследования являлось выяснение влияния гриппозного токсикоза организма на активность ферментов органов. Оказалось, что внутривенное введение нормальной аллантоисной жидкости, апатогенных и патогенных вариантов вируса (EM_1 , $EM_{алл}$ и EM_2) не повлияло на уровень активности нуклеотидаз и кислой фосфатазы легких. Таким образом, исследуемые энзиматические системы легких оказались стойкими как при токсическом, так и при патогенном действии

вируса гриппа, т. е. когда последний активно размножался в легких мышей.

Как видно из данных табл. 1, активность кислой фосфатазы печени не подвергалась изменениям при введении мышам всех испытывавшихся материалов. В этом случае мы снова обнаруживаем сходство влияния на активность кислой фосфатазы печени внутривенного и интраназального введения различных веществ. Кислая фосфатаза селезенки также оказалась устойчивой к внутривенному введению патогенного вируса (ЕМ₂).

Определенный интерес представляют данные по нуклеотидазам печени и селезенки при токсическом действии вируса гриппа. Как видно из опыта № 1, внутривенное введение нормальной аллантоисной жидкости (в дозе, в 2000 раз превышающей вводимую при интраназальном заражении мышей, — 1,0 мл цельной аллантоисной жидкости вместо 0,05 мл разведенной в 100 раз) не привело к изменениям активности нуклеотидаз печени. С другой стороны, внутривенное введение вирусных культур, в том числе и частично очищенных (опыты №№ 4—6), привело к значительной активации нуклеотидаз печени и селезенки (от 40% — опыт № 6 до 120% — опыт № 1).

Таким образом, активация нуклеотидаз печени и селезенки имеет место при внутривенном введении только вирусных культур и отсутствует при введении нормальной аллантоисной жидкости. При введении же в нос активация нуклеотидаз печени и селезенки происходит как от вирусных культур, так и контрольных жидкостей. Надо полагать, что эти различия в активации нуклеотидаз, обнаруживающиеся при сравнении двух различных способов введения испытуемого материала, указывают на существование двух различных механизмов активации нуклеотидаз органов. К изложенным выше заключениям приводит анализ представленного в табл. 1 материала, где расчет активности энзимов велся как на единицу веса тканей, так и на весь орган.

Можно думать, что целый ряд симптомов, характеризующихся как следствие патогенного действия вируса гриппа, в действительности является результатом токсикоза организма. В связи с этим представляют интерес данные Г. Ф. Шемановой, полученные ею на тех же животных, которые использовались и в наших опытах. Автором было показано, что при выраженном гриппозном процессе, обусловленном интраназальным заражением животных патогенным вирусом гриппа (PR-8 и ЕМ₂), у мышей наблюдается активация амилазы поджелудочной железы (в среднем на 40%). Такая же или даже большая (на 56%) активация амилазы поджелудочной железы наблюдалась и в условиях экспериментального токсикоза организма, обусловленного внутривенным введением патогенного вируса гриппа. Таким образом, становится очевидной токсическая природа активации амилазы поджелудочной железы, наблюдающейся при выраженном гриппозном процессе.

В соответствии с нашими наблюдениями об отсутствии влияния апатогенных для мышей вариантов штаммов вируса гриппа (ЕМ₁ и КЛИМ₁) на активность кислой фосфатазы сыворотки крови находятся и данные Шемановой о резистентности амилазы поджелудочной железы как к интраназальному, так и внутривенному введению тех же вирусов. Эти данные указывают на то, что выявленные нами и Шемановой нарушения обмена веществ при гриппозной инфекции, как то: повышение активности кислой фосфатазы сыворотки крови и активации амилазы поджелудочной железы, обусловлены не процессом репродукции вируса, а его токсическим действием на организм.

Государственный контрольный институт
сывороток и вакцин им. Л. А. Тарасевича и
Институт вирусологии им. Д. И. Иванковского

Поступило
24 XI 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ В. Д. Соловьев, С. С. Маренникова, Н. Р. Гутман, ЖМЭИ, 1 (1953).