

В. И. ТОВАРНИЦКИЙ и М. М. ВОРОБЬЕВА

ВЛИЯНИЕ АДЕНОЗИНТРИФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ НА РАЗМНОЖЕНИЕ ВИРУСА ГРИППА

(Представлено академиком В. А. Энгельгардтом 21 IV 1954)

Вопросу об источниках энергии, необходимой для синтеза вирусов и их размножения, несмотря на его большой теоретический и практический интерес, в мировой литературе до сих пор уделялось сравнительно мало внимания. Одним из нас ⁽⁴⁾ еще в 1948 г. впервые было высказано предположение, что источником энергии для размножения вирусов могут являться макроэргические полифосфорные соединения пораженной вирусом клетки. Нами допускалась также возможность трансмутации и аккумуляции энергии фосфорорганических связей внутри структуры вирусных нуклеопротеидов (например, перенос энергии на специальные акцепторы типа нуклеиновой кислоты) и потребление ее для синтеза себе подобных *.

За истекший период путем применения косвенных методов (действия ферментных ядов, угнетающих процессы дыхания, гликолиза и цикла трикарбоновых кислот) рядом работ было показано ^(3, 7, 9, 12-14), что в большинстве случаев угнетение этих процессов подавляет и размножение вирусов.

Что касается вируса гриппа, то недавними работами Аккермана ⁽⁷⁾ и Эйнсли ⁽⁹⁾ было показано, что малонат натрия и фторацетат натрия подавляют размножение вируса гриппа в культуре ткани, в связи с чем было высказано предположение, что источником энергии для размножения вируса являются окислительные процессы цикла трикарбоновых кислот. Зависимость размножения вируса от цикла трикарбоновых кислот могла быть обусловлена или использованием вирусом отдельных межучточных продуктов в процессе синтеза, или же генерированием макроэргических фосфорных связей в процессе этого цикла.

Уже после окончания наших исследований ⁽¹⁾ появилась работа Аккермана и Джонсона ⁽⁸⁾, в которой было продемонстрировано угнетающее действие на размножение вируса гриппа в культуре ткани 2,4-динитрофенола, не оказывавшего в применявшейся концентрации ($27 \cdot 10^{-5}$ М) вирулицидного действия, но разобщавшего процессы дыхания и фосфорилирования. Одновременно ими было отмечено также стимулирующее действие динитрофенола на активность АТФ-азы ткани. Аналогичные результаты были получены также Ингрехемом, Роби и Петерсоном ⁽¹¹⁾, изучавшими действие на размножение вируса гриппа в культуре ткани слабых концентраций динитрофенола и азиды натрия. В применявшихся концентрациях динитрофенол и азид натрия не влияли на дыхание тканей, но подавляли размножение вируса (на 85%) в связи с угнетением процессов фосфорилирования.

На основании приведенных работ можно, таким образом, считать доказанным большое влияние уровня генерирования фосфорных связей в

* Возможность фосфорилирования РНК (увеличение фосфора на 14—48%) при помощи миокиназы и АТФ была недавно показана в работе ⁽¹⁵⁾.

различных окислительных процессах клетки на размножение в ней вируса. Однако применение косвенных методов, в частности метаболических ядов, затрагивающих также деятельность некоторых других энзиматических систем, а не только процессы, связанные с фосфорилированием АТФ, равно как и наличие в живых системах множества реакций, осуществляющих сопряженное фосфорилирование, требовали для решения поставленной задачи более прямых доказательств.

Таблица 1

Влияние АТФ на размножение вируса гриппа в культуре ткани

Штамм вируса	Время инкубации в час.	Внесено АТФ в мг	Логарифмы титров вируса	
			в конт.	в опыт. с АТФ
С-6	1	17	—3	—4
	1	40	—4	—5
	1	48	—3	—4
	1	48	—2	—3
С-6	1	48	—3	—4
	2	40	—6	—6
	2	48	—3	—5
	2	48	—2	—7
	2	48	—3	—6
С-6	2	48	—3	—6
	5	48	—3	—5
Шклявер	1	40	—4	—5
	2	40	—4	—6
	2	40	—4	—4

человека и ткань легкого эмбриона мыши. В первом случае в культуре ткани применялась куриная плазма, куриный эмбриональный экстракт и питательная смесь, состоящая из раствора Тироде и сыворотки человека без гриппозных антител. Заражение производилось вирусом гриппа типа А-1 (штамм С-6), адаптированным к этой ткани. Во втором случае применялась плазма из крови мыши, куриный эмбриональный экстракт и питательная смесь, состоящая из раствора Тироде и сыворотки мыши. Заражение производилось вирусом гриппа типа А (штамм Шклявер). Культивирование ткани проводилось в двухслойной среде в чашках Кареля по методу Л. Л. Фадеевой (5). В опытах с АТФ в каждую чашку вводилось от 1 до 5 мг АТФ (из расчета двубариевой соли). Относящиеся сюда данные приведены в табл. 1.

Из приведенных данных видно, что в тех случаях, где размножение вируса в контроле было слабое, добавление АТФ вызывало довольно резкое усиление размножения вируса. Увеличение дозы АТФ до 5 мг не приводило уже к дальнейшему повышению титра вируса.

2. Влияние АТФ на размножение вируса гриппа в деэмбрионированных яйцах. При постановке этих опытов мы воспользовались методом культивирования вируса гриппа на хориоаллантоисной оболочке деэмбрионированных яиц, предложенным Бернкопфом (10) и разработанным в деталях сотрудниками лаборатории биохимии

С этой целью нами изучалось влияние непосредственного внесения АТФ на размножение вируса гриппа: а) в культуре ткани, б) в деэмбрионированных яйцах и в) в развивающихся куриных эмбрионах. В первых двух случаях размножение вируса гриппа происходило в условиях ослабленного ресинтеза АТФ, а в третьем — в условиях нормально развивающегося организма, обеспечивающего достаточно высокий уровень генерирования макроэргических фосфорных связей.

1. Влияние АТФ на размножение вируса гриппа в культуре ткани. Опыты проводились с двумя эмбриональными тканями: тканью легкого эмбриона

Таблица 2

Влияние АТФ на размножение вируса гриппа в деэмбрионированных яйцах

в контр.	Логарифмы титров вируса	
	в опытах с внесением АТФ	
	80 мг	160 мг
0	—2	—3
—1	—2	—3
—1	—5	—
—1	—5	—
—3	—3	—
—4	—4	—4
—4	—5	—5
—4	—5	—5

мии О. Т. Лутиковой ⁽²⁾ и М. М. Воробьевой ⁽¹⁾. 11-дневные куриные эмбрионы заражались в аллантоисную полость вирусом гриппа типа А-1 (штамм С-6) как обычно ⁽⁶⁾. После 2 час. инкубации при 37° эмбрионы извлекались стерильно из яиц, и на стенках яйца оставлялась лишь одна аллантоисная оболочка. В деэмбрионированные яйца наливался раствор Тироде, яйца закрывались стеклянными крышечками, заливались парафином и помещались в термальную при 37°. В опытных сериях в раствор Тироде вводились дополнительно: а) раствор АТФ из расчета 40—160 мг двубариевой соли на 100 мл раствора Тироде и б) соответствующие ингибиторы ресинтеза АТФ в концентрациях, указанных в табл. 3. После 6-часовой инкубации аллантоисные оболочки извлекались, промывались, растирались в ступке с физиологическим раствором, и в полученной суспензии определялся титр вируса методом титрования на эмбрионах ⁽⁶⁾ (см. табл. 2 и 3).

Таблица 3

Влияние АТФ на размножение вируса гриппа в деэмбрионированных яйцах в присутствии ингибиторов

Ингибитор	Концентрация	Логарифмы титров вируса		
		в контр.	в опыт. с ингибитором	в опыт. с ингибитором + АТФ
Фтористый натрий	0,0001 %	—3	0	—1
		—4	—2	—3
		—4	—2	—3
Малонат натрия	0,004 M	—4	—2	—3
	0,006 M	—3	0	—1
	0,008 M	—3	0	—3
Динитрофенол	0,0001 M	—3	0	—1

Из табл. 2 видно, что и здесь в тех случаях, когда размножение вируса в контроле было слабым, добавление АТФ повышало энергию размножения вируса на 1—4 единицы логарифма титра. Что касается опытов с ингибиторами, то из табл. 3 видно, что в тех случаях, где синтез АТФ был подавлен и размножение вируса прекратилось, добавление АТФ в среду приводило опять к усилению размножения вируса.

3. Влияние АТФ на размножение вируса гриппа в развивающихся куриных эмбрионах. Культивирование вируса гриппа в развивающихся куриных эмбрионах проводилось по общепринятой методике ⁽⁶⁾. Заражение контрольных и опытных эмбрионов производилось в аллантоисную полость вирусом гриппа типа А-1 (штамм С-6) в разведении 10^{-4} . В опытные эмбрионы одновременно с заражением вводилось 0,25 мл раствора АТФ (соответствовавшей 5 мг двубариевой соли), а в контрольные — такой же объем контрольного раствора. После инкубации в термальном при 37° в течение 24—48 час. эмбрионы вскрывались и в аллантоисной жидкости биологическим методом (титрованием на эмбрионах) производилось определение титра вируса. Результаты опытов сведены в табл. 4.

Таблица 4

Влияние АТФ на размножение вируса гриппа в развивающихся куриных эмбрионах

Время инкубации в час.	Логарифмы титров вируса	
	в контр.	в опыт. с АТФ
24	—6	—7
	—6	—8
48	—7	—8
	—7	—8
	—8	—8
	—8	—9
	—8	—9
	—8	—9
	—8	—9
	—8	—10
	—8	—12
	—9	—12

Как видно из табл. 4, в большинстве опытов добавление в аллантоисную полость развивающегося куриного эмбриона АТФ вызывало увеличение титра вируса в 10 раз, а в некоторых опытах и больше. Очевидно, что и в развивающемся зародыше, несмотря на постоянно идущий синтез АТФ и невзирая на незначительную потребность в ней вируса гриппа, могут создаваться условия недостаточности макроэргических фосфорных связей, когда введение соответствующего субстрата извне оказывает положительное влияние на синтез вирусных нуклеопротеидов.

Таким образом, как на основании материалов, добытых косвенными путями (в опытах с ингибиторами (⁷⁻¹⁵)), так и на основании наших прямых опытов с внесением АТФ в среду, можно считать вполне вероятным участие АТФ в синтезе вирусных нуклеопротеидов, что свидетельствует об общих закономерностях энергетики процессов синтеза живой материи и в мире вирусов. Проведенными исследованиями не исключается, однако, возможность использования вирусами для своего размножения и других источников энергии.

Институт вирусологии
им. Д. И. Ивановского
Академии медицинских наук СССР

Поступило
14 IV 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ М. М. Воробьева, Тез. VI сессии Инст. вирусологии, 1953, стр. 9.
- ² О. Т. Лутикова, там же, 1953, стр. 10. ³ В. Л. Рыжков, А. И. Семич, Бюлл. эксп. биол. и мед., 24, 10 (1947).
- ⁴ В. И. Товарницкий, Совещание по белку, Изд. АН СССР, 1948, стр. 156.
- ⁵ Л. Л. Фадеева, Журн. микр., эпид. и иммун., № 2, 47 (1953).
- ⁶ А. К. Шубладзе, С. Н. Гайдамович, Практическая вирусология, Медгиз, 1949.
- ⁷ W. Ackermann, J. Biol. Chem., 189, 421 (1951); J. Exp. Med., 93, 635 (1951).
- ⁸ W. Ackermann, R. Johnson, *ibid.*, 97, 315 (1953).
- ⁹ J. Ainslie, *ibid.*, 95, 9 (1952).
- ¹⁰ H. Bernkopf, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 72, 680 (1949).
- ¹¹ J. Ingraham, T. Roby, J. Peterson, Arch. Biochem., 46, 215 (1953).
- ¹² W. Mogabgab, F. Horsfall, J. Exp. Med., 96, 531 (1952).
- ¹³ H. Pearson, J. Immunol., 64, 447 (1950).
- ¹⁴ R. Thompson, *ibid.*, 55, 345 (1947).
- ¹⁵ A. Dounce, F. Kay, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 83, 321 (1953).