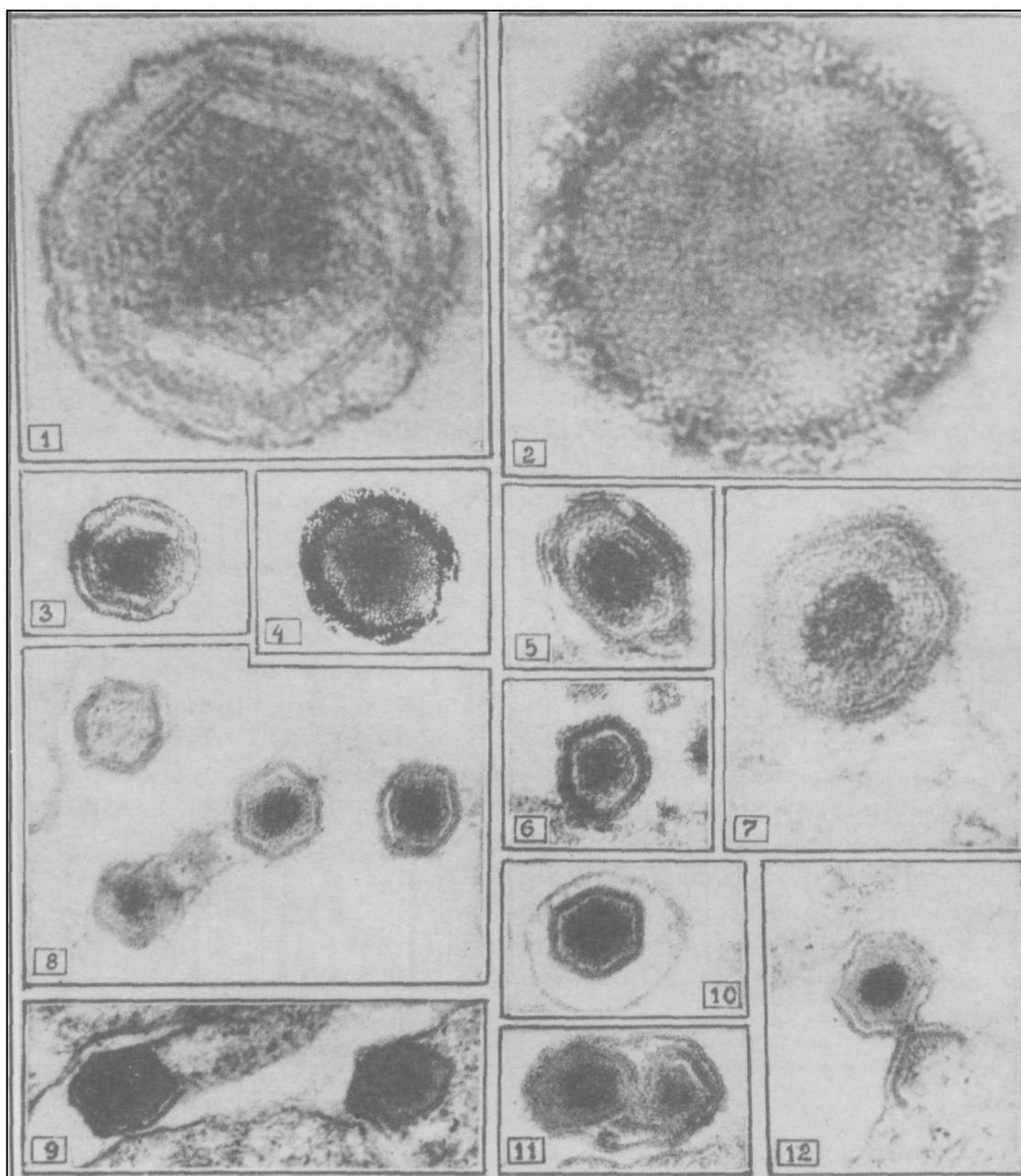


# **ВИРУСОЛОГИЯ**

- ü **Портреты вирусов: вирус африканской чумы свиней**
- ü **Африканская чума свиней – модель взаимодействия патогена с системой мононуклеарных фагоцитов**
- ü **Апоптоз в системе «вирус африканской чумы свиней – мононуклеарные фагоциты свиньи»**
- ü **Популяционная структура вируса африканской чумы свиней по признаку количественной гемадсорбции**
- ü **Физико-химический полиморфизм вирусной популяции и дефектные интерферирующие частицы вируса африканской чумы свиней**
- ü **Функциональная роль гликозилирования вирусных компонентов**
- ü **Гликопротеины вируса африканской чумы свиней**
- ü **Идентификация изолятоспецифического гликополипептида вируса африканской чумы свиней**
- ü **Серологические и физико-химические свойства ГП 110-140 вируса африканской чумы свиней**

## ПОРТРЕТЫ ВИРУСОВ: ВИРУС АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ\*



-----  
\* по материалам электронно-микроскопических исследований М.С.Малаховой.  
Опубликовано в «Ветеринарной газете», 1995, 6, 7.

Крупные частицы вируса размером 175x220 нанометров имеют округлую или икосаэдрическую форму. В архитектуре вирионов выявляются несколько слоев - внешняя оболочка, происходящая из клеточной и приобретаемая в процессе выхода из клетки почкованием, икосаэдральный капсид из 1892-2172 субъединиц-капсомеров и сердцевина из слоя фибриллярных компонентов и нуклеоида.

Очевидно, что вирус АЧС, среди прочих, наиболее "фотогеничен". На коллаже электронных микрофотографий с разным инструментальным увеличением показано многослойное строение вириона на тонких срезах (1 и 3) и то, как частицы выглядят при негативном контрастировании (2 и 4); в последнем случае хорошо видны многочисленные капсомеры. Поверхностная оболочка вирионов нерегулярна и неплотно связана с подлежащим капсидом (5). На последующих фрагментах коллажа представлены некоторые "жизненные ситуации", в которых бывает вирус АЧС: прикрепление к клетке (6), почкование и приобретение клеточной оболочки (7), разные формы вирусных частиц - пустая, пентагональная и две гексагональные в разных ракурсах (8), различные морфологические аспекты взаимодействия с клеточной мембраной (9-12). Особенно изящно выглядит строение почкующихся вирусных частиц (9 и 12).

# **АФРИКАНСКАЯ ЧУМА СВИНЕЙ - МОДЕЛЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПАТОГЕНА С СИСТЕМОЙ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ФАГОЦИТОВ\***

Физиология клеток системы мононуклеарных фагоцитов Ван Фурта (СМФ) *per se* и их значение в иммунном ответе достаточно исследованы и описаны [1, 9, 18]. Решены наиболее общие проблемы, касающиеся значения СМФ в инфекционном процессе для патогенов с внутриклеточной локализацией [2, 12]. Однако остаются малоизученными многочисленными аспекты биологии и патологии инфекционных процессов в тех случаях, когда клетки СМФ являются критической мишенью или имеют преобладающее значение в размножении *in vivo* возбудителей различной природы (таких как листерии, вирусы-возбудители геморрагических лихорадок [13, 16]). Для этих исследований африканская чума свиней (АЧС) может быть интересной моделью, исходя из следующих основных предпосылок. Спонтанно чувствительны к вирусу АЧС только клетки гемопоэтического происхождения, *in vitro* он размножается и обычно культивируется в моноцитах/макрофагах из различных тканевых источников, не размножается в лимфоцитах вне зависимости от митогенной стимуляции, нейтрофилах, эндотелиальных клетках. В присущей АЧС экстенсивной патологии с характерным повреждением «ретикулоэндотелиальной системы» и диссеминированной внутрисосудистой коагулопатией вирусные флюоресцирующие антигены обнаруживаются, главным образом, в клетках макрофагального ряда [10, 13, 15, 19].

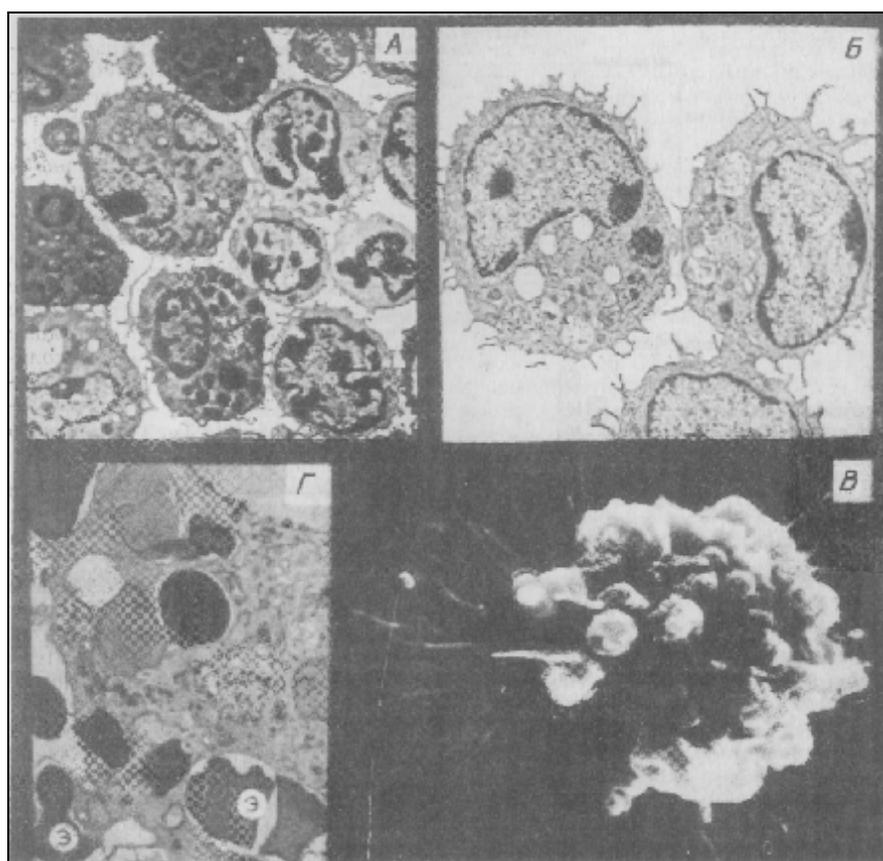
В связи с этим цель настоящей работы - подробно охарактеризовать взаимодействие вируса АЧС с моноцитами/макрофагами (ММ) и с помощью сравнительной интерпретации собственных и литературных данных постулировать их уникальность в качестве критической мишени возбудителя с соответствующими обобщениями с позиций патогенеза и иммуногенеза.

---

\* опубликовано совместно с М.С.Малаховой, Н.А.Власовым и С.Ф.Чевелевым в журнале «Доклады ВАСХНИЛ», 1992, 11-12, 37-44.

Экспериментальная часть работы выполнена с использованием первичной культуры клеток костного мозга свиней (КМС) и ее прилипающей фракции (А-клетки), которые получали путем трехсуточной адгезии на опорном субстрате. Для заражения клеток выбраны оппозитные штаммы вируса АЧС: высоковирулентный «Киравира» (КИР), умеренно вирулентный Ф-32 и его авирулентный дериват ФК. Основные характеристики популяции А-клеток КМС в краткосрочной культуре и штаммов вируса, общие методы культуры клеток, биохимии, электронной микроскопии, статистической обработки данных описаны в предыдущих работах [3-8].

Морфология А-клеток КМС и их некоторые биохимические характеристики приведены на рисунках 1 и 2 (слева), соответственно.



**Рисунок 1.** Электронно-микроскопическая картина А-клеток КМС в культуре: А - общий вид свежеизолированных клеток КМС, тонкий срез, х 6000; Б, В - моноциты/макрофаги трехсуточной культуры, соответственно тонкий срез, х 6000 и сканирующая микроскопия, х 10000; Г - эритроцитозагия ММ, тонкий срез, х 6000.



В обобщенном виде *морфо-биохимические параметры А-клеток КМС* представляются следующим образом:

- § крупные размеры (диаметр >25 мкм);
- § ядерно-цитоплазматическое соотношение >1, ядро бобовидной формы, нет синтеза ДНК;
- § отличаются развитой эндотелиальной сетью и аппаратом Гольджи, обилием крупных митохондрий, осмиофильных гранул, множеством первичных и вторичных лизосом;
- § имеют складчатую, неровную поверхность с многочисленными псевдоподиями (0.2-2 мкм), развитый мембранный аппарат с рецепторными функциями, о чем свидетельствует наличие гликокаликса толщиной 0.01-0.2 мкм;
- § содержат поглощенный детрит и фагоцитированные аллогенные эритроциты, имеют пиноцитозные углубления;
- § гексозомонофосфатный путь (ГМФП) превращения глюкозы значительно преобладает над гликолизом (5.5:1);
- § соотношение фосфолипидов и холестерина в их мембране составляет 1:0.8, плотность клеток в градиенте перколла 1.060 г/см<sup>3</sup>.

Следовательно, по описанным критериям А-клетки КМС в трехсуточной культуре неотличимы от зрелых, тканевых свободных или фиксированных макрофагов согласно представлениям Ван Ферта [1], что свидетельствует о завершенности моноцитопоза *in vitro*. Кроме того, судя по относительному значению ГМФП превращения глюкозы, можно отметить признаки их метаболической активации в культуре. Все это служит основанием для использования А-клеток КМС в модельных исследованиях взаимодействия вируса АЧС с клетками СМФ.

В общем пуле клеток КМС вирус АЧС размножается только во фракции А-клеток [5]. Сравнение способности к репродукции вируса в свежеизолированных клетках КМС или через 3 суток после инкубации последних на опорном субстрате показало, что при прочих равных условиях в первом случае развитие гемадсорбции происходит с задержкой примерно на те же 3 суток.

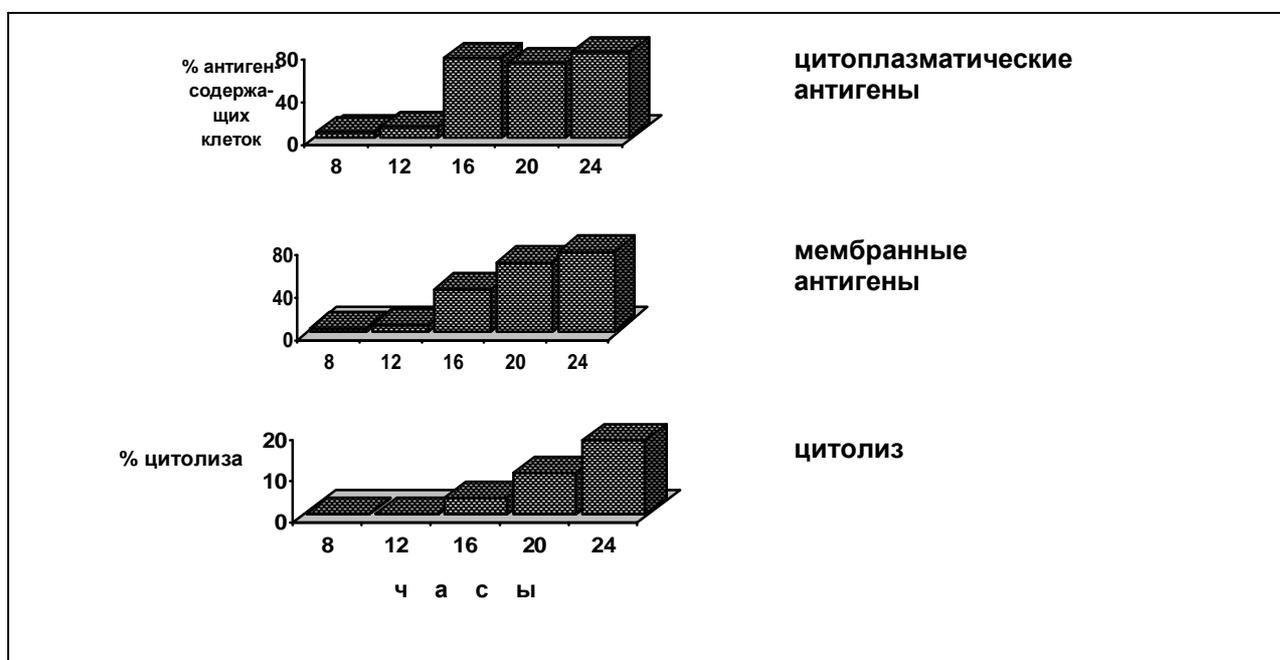
Это свидетельствует об успешном размножении вируса в зависимости от уровня дифференцировки клеток в процессе моноцитопоза *in vitro* в течение данного срока - от промоноцитов костного мозга до того состояния, которое описано выше (рисунки 1 и 2), то есть только зрелые ММ обладают уникальной чувствительностью к вирусу АЧС. Подобное явление известно, например, для системы «ММ - лентивирус висны-маеди» [17]. На это указывают также относительно короткий цикл и эксплозивный характер вирусного размножения в гомогенной культуре дифференцированных А-клеток при оптимальных условиях синхронного заражения [5] по сравнению с длительным, многосуточным накоплением вируса в тех случаях, когда для этого используют свежеизолированные клетки костного мозга и периферической крови свиней или низкую множественность заражения.

Уникальность СМФ как критической мишени возбудителя при АЧС подтверждена опытами *in vivo*. Подсвинки были инокулированы высокой дозой вируса, рассчитанной таким образом, чтобы обеспечить условное поражение большинства М/М в организме. При этом наблюдали *системоспецифический синдром*:

- § на уровне клинических признаков быстрая лихорадочная реакция, резкое исхудание, смерть на 5 сутки;
- § при патологоанатомическом вскрытии геморрагии, ограниченные лимфоузлами;
- § на гистосрезках прогрессирующий распад ММ во всех вторичных лимфоидных органах до полной деструкции их паренхимы.

В числе установленных эффектов репродукции вируса АЧС на ММ представляют интерес определенные сдвиги клеточного метаболизма (см. рисунок 2), угнетение опсонин-опосредованного фагоцитоза, снижение уровня реакционноспособного кислорода и хемотаксиса при отсутствии влияния на экспрессию  $F_C$ -рецепторов и способность ММ опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) даже при высокой множественности заражения [14]. Принято считать, что даже в течение острого инфекционного процесса при АЧС *in vivo* не изменяются антигенпредъявляющие функции клеток СМФ [15]. В конечном итоге вирус АЧС вызывает специфическую модуляцию мембран зараженных клеток (гемадсорбцию) и лизис последних. В динамике

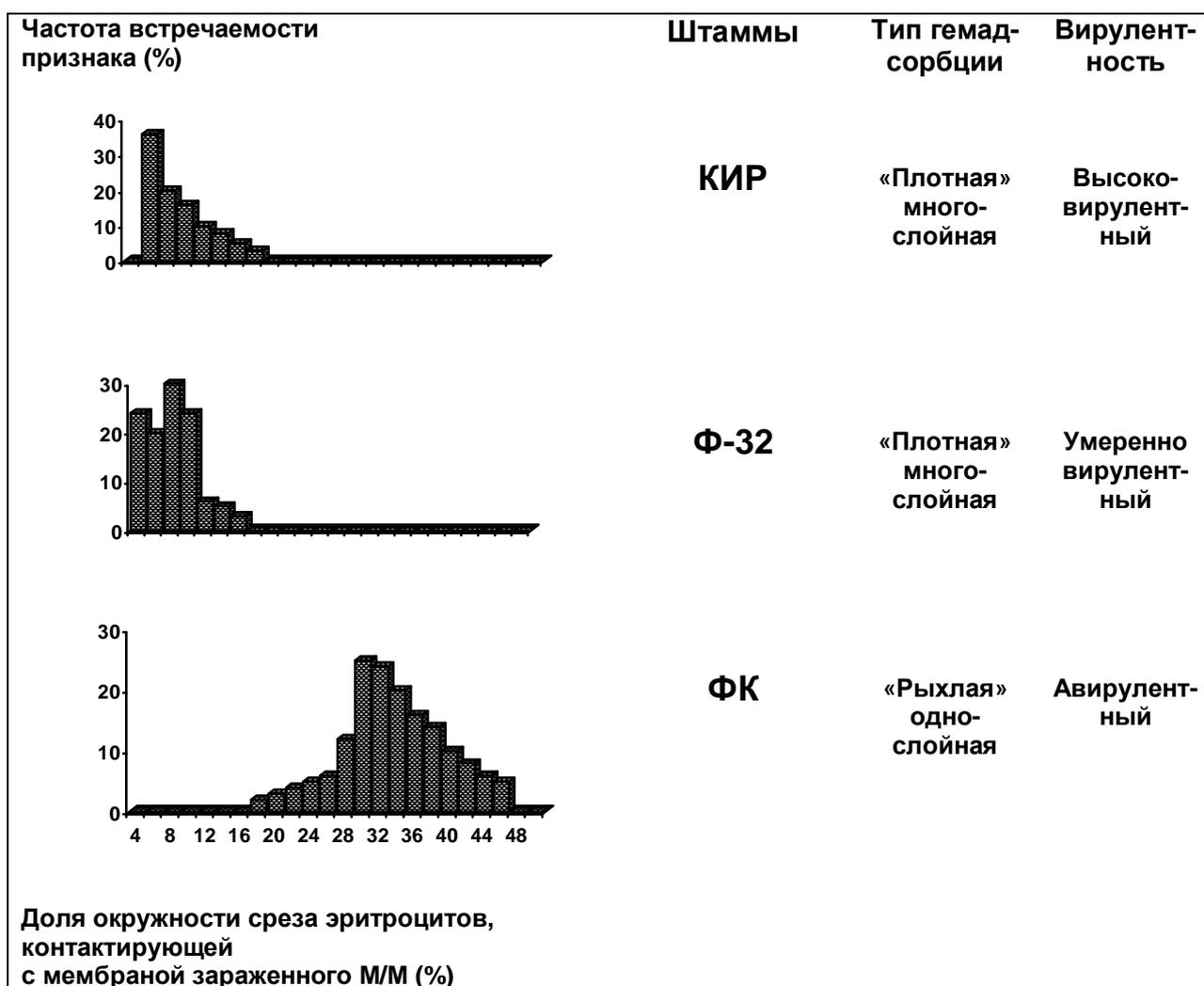
репродукции экспрессия мембранного гемадсорбирующего антигена предшествует образованию инфекционного вирусного потомства и цитолизу (рисунок 3), он является неструктурным вирусным белком и не связан с вирусными частицами в процессе экзоцитоза. В числе перечисленных эффектов именно гемадсорбция, по-видимому, служит наиболее важным феноменом в силу того, что потенциально определяет антигенпредъявляющие или мишеневые функции зараженных ММ в межклеточных взаимоотношениях с лимфоцитами или противоклеточными эффекторами иммунитета, опосредующими АЗКЦ, комплемент-зависимый цитоллиз (КЗЦ), а так же с цитотоксическими Т-лимфоцитами (ЦТЛ), которые описаны ранее [7, 15, 19].



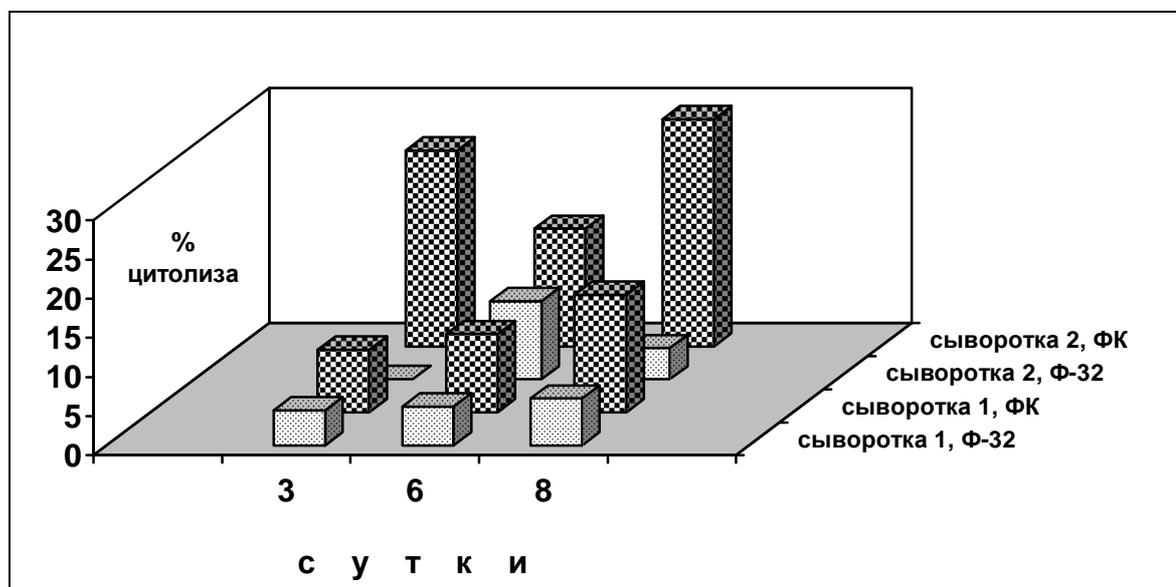
**Рисунок 3.** Динамика выявления клеток, содержащих вирусные цитоплазматические и мембранные флюоресцирующие антигены (%) в фиксированных ацетоном или нативных препаратах, соответственно, и динамика вирусиндуцированного цитолиза (% к контролю по Serottini, Brunner, 1974) в культуре А-клеток КМС, зараженной вирусом АЧС (штамм Ф-32, множественность заражения - 10 ГАЕ<sub>50</sub>/клетка).

Сравнительное исследование этого феномена с использованием различных изолятов и вариантов вируса АЧС показало их выраженное разнообразие по признаку количественной гемадсорбции и структуре вирусных популяций в коррелятивной связи с вирулентностью. Сформирован своеобразный «градиент»

вирулентности / гемадсорбирующей активности и постулирован генетический контроль экспрессии гемадсорбирующего антигена [6]. Дополнительное изучение позволило установить, что для прототипного авирулентного варианта ФК с характерной «рыхлой» однослойной гемадсорбцией типичны более широкие межмембранные контакты «зараженный ММ+эритроцит»: доля контактирующей окружности эритроцитов ( $M \pm m$ ) составила  $34.2 \pm 7.3$  %, тогда как для вирулентного Ф-32 -  $7.8 \pm 3.1$  %, для высоковирулентного КИР -  $11.2 \pm 6.4$  % (рисунок 4). Более того, при прочих равных условиях цитоллиз под действием эффекторов АЗКЦ активнее при использовании в качестве мишеней ММ, зараженных авирулентным вариантом ФК, по сравнению с Ф-32 (рисунок 5). Это свидетельствует, что антигенная модуляция мембраны зараженных ММ в наибольшей степени свойственна авирулентному варианту.



**Рисунок 4.** Распределение частоты встречаемости признака для величины контакта эритроцитов с мембраной зараженных ММ при развитии гемадсорбции, индуцированной различными штаммами вируса АЧС (M=0.01 ГАЕ<sub>50</sub>/клетка, через 3 суток после заражения).



**Рисунок 5.** Активность А-клеток-мишеней, зараженных штаммами Ф-32 и ФК вируса АЧС, в реакции АЗКЦ с сыворотками 2 подсвинков в динамике развития иммунного ответа после инокуляции штамма ФК (по [7]).

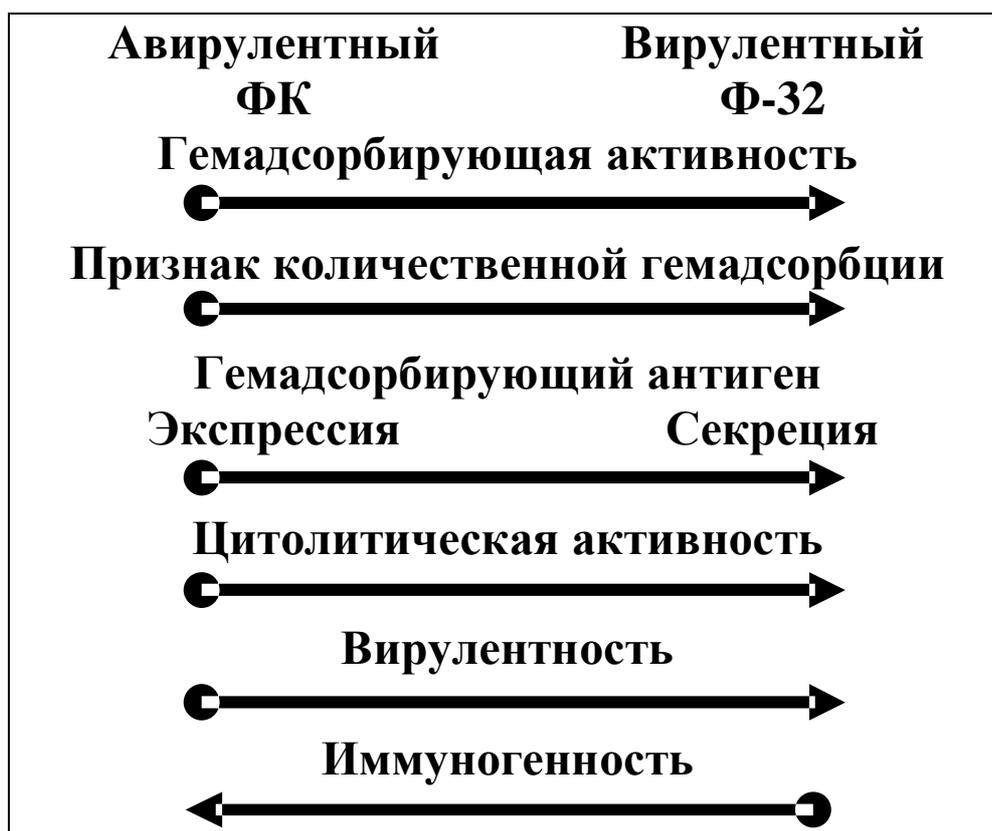
Изложенные данные позволяют сделать следующие выводы. Поскольку ММ уникальны в своей чувствительности к вирусу АЧС, его нейтрализация *in vitro* и *in vivo* исходно невозможна, несмотря на то, что наружная оболочка вирионов активна в рецепторном и антигенном отношении. Вирус проникает в них путем фагоцитоза независимо от специфических рецепторов, а образование комплекса «вирус+антитела» усиливает фагоцитоз по типу опсонизации (более подробное и экспериментальное обоснование изложено в предыдущей публикации [5]). Так как заражение вирусом не влияет на активность ММ в АЗКЦ [14], то именно этим механизмом можно объяснить имеющиеся данные о частичном подавлении вирусного ЦПД и накопления в их культуре

в присутствии большого количества антисыворотки и отдельные случаи пассивной передачи иммунитета [15, 19]. Попытки доказательства существования специфического для вируса АЧС рецептора на поверхности ММ и вирусного «белка прикрепления» (virus attachment protein) путем насыщенного связывания [11], по нашему мнению, изначально неверны: использованная авторами множественность заражения (до 500 000 вирусных частиц на клетку) обуславливает покрытие клеток десятками, если не сотнями, слоев вируса, исходя из сравнения диаметров клетки и вириона, где конкуренция за искомый «рецептор» практически неосуществима.

*Рецепторнезависимый эндоцитоз* исключает основной для большинства вирусов селекционирующий фактор, в связи с чем в отсутствие отбора популяции вируса АЧС гетерогенны в необычно высокой степени. Эта клональная гетерогенность относится и к степени экспрессии вирусных антигенов в мембранах зараженных ММ, как показано для признака количественной гемадсорбции [6] или на рисунке 4. Имеющиеся сравнительные данные о репродукции различных по вирулентности вариантов вируса АЧС в ММ приводят к заключению, что, по крайней мере *in vitro*, авирулентные варианты при прочих равных свойствах различаются только низкой гемадсорбирующей активностью в целом со сдвигом субпопуляционной структуры в эту сторону [6], характером экспрессии гемадсорбирующего антигена (см. рисунок 4) и замедленным цитолизом, судя по уровню внеклеточной ЛДГ (см. рисунок 2). Следовательно, в вирулентности и иммуногенности вируса АЧС главная роль принадлежит именно степени антигенной модуляции мембран зараженных ММ. Продолжительная экспрессия вирусных мембранных антигенов (однослойная гемадсорбция) по сравнению с их секрецией (многослойная гемадсорбция) определяет исход инфекции - соответственно развитие иммунного ответа или летальность, что схематически показано на рисунке 6.

Остается неясным, какую функцию ММ определяет в данном случае та или иная степень экспрессии антигена вируса АЧС в их мембране — «антигенное предъявление» лимфоцитам или мишень в реакциях с иммунологическими эффекторами (АЗКЦ, КЗЦ, ЦТЛ), их совмещение или чередование? Несомненно, что по

патогенетическому стереотипу АЧС относится к болезням с иммунной регуляцией, а природа и свойства клеток СМФ как критической мишени вирусного действия, их роль в иммунном ответе и патологии значительно расширяют возможности иммунного контроля развития инфекции.



**Рисунок 6. Соотношение основных биологических свойств вируса АЧС.**

Эти особенности обуславливают также типичные для таких случаев нестерильный иммунитет, избыточное образование медиаторов патологического процесса (в цикле арахидоновой кислоты), их преобладание над медиаторами иммунитета, геморрагический синдром и другие осложнения, разнообразные формы течения инфекции, персистенцию вируса АЧС и в конечном счете трудности создания вакцин.

Вакцинальный процесс при использовании вакцин из модифицированного вируса будет неизбежно сопровождаться всеми перечисленными последствиями, связанными с участием

ММ как критической мишени. Выход из положения - создание гибридного вируса с иным тропизмом и замена таким образом клетки-мишени реплицирующегося антигена.

## Литература.

1. Ван Ферт Р. и др. // Бюлл. ВОЗ, 1973, т. 46, № 6.
2. Войно-Ясенецкий М.В. Биология и патология инфекционных процессов. Л.: Медицина, 1981.
3. Кононов В.Г. и др. // Доклады ВАСХНИЛ, 1984, № 2.
4. Макаров В.В. // В кн.: Вопр. вет. вирусол. микробиол., эпизоотол., 1987.
5. Макаров В.В. и др. // Доклады ВАСХНИЛ, 1991, № 12.
6. Макаров В.В. и др. // Вопросы вирусологии, 1991, № 4.
7. Середа А.Д. и др. // Вопросы вирусологии, 1992, № 3.
8. Устин А.В. и др. // Доклады ВАСХНИЛ, 1988, № 7.
9. Фрейдлин И.С. Система мононуклеарных фагоцитов. М.: Медицина, 1984.
10. African swine fever. Ed. Becker Y., 1989.
11. Alcamí A. et al. // Virus res., 1990, v. 17, № 2.
12. Allison A. // Int. rev. exp. pathol., 1978, № 18.
13. Anderson E., Williams S. // Res. vet. sci., 1987, v. 42, № 3.
14. Martins C. et al. // Viral immunol., 1988, v. 1., № 3.
15. Mebus C. // Adv. virus res., 1988, № 35.
16. Morahan P., Morse St. // In: Virus-lymphocyte interact.: implic. disease, 1979.
17. Gendelman H. et al. // J. virol., 1986, v. 58, № 1.
18. Pierce C. // Am. J. pathol., 1980, v. 98, № 1.
19. Wardley R. et al. // Prog. med. virol., 1987, № 34.

# **АПОПТОЗ В СИСТЕМЕ «ВИРУС АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ - МОНОНУКЛЕАРНЫЕ ФАГОЦИТЫ СВИНЬИ»\***

В самом общем определении апоптозом считается физиологический процесс гибели клеток как элемент регуляции гомеостаза нормальных тканей (негативная селекция). Это механизм запрограммированного клеточного саморазрушения, альтернативный некрозу. Принципиальные отличия заключаются в морфологической картине, АТФ-зависимости, экспрессии генов *de novo*, фрагментации ДНК, интактности клеточной мембраны с селективной проницаемостью, ингибции  $Zn^{+}$ . Апоптозный путь гибели описан применительно к клеткам гемопоэтической, нервной системы, цитопатогенному действию ряда вирусов и ингибиторов метаболизма, киллингу зараженных или раковых клеток эффекторами иммунитета [1, 7, 12].

Настоящее сообщение посвящено ретроспективному анализу результатов рутинных электронно-микроскопических исследований взаимодействия вируса африканской чумы свиней (АЧС) с клетками системы мононуклеарных фагоцитов в культуре, которые являются для него уникальной мишенью *in vitro* и *in vivo* [4]. Вирус АЧС, классифицированный МКТВ и единственный член непоименованного семейства, - крупный цитоплазматический дезоксирибовирус с диаметром вирионов 175 x 220 нм, содержит линейную двухцепочечную ковалентно замкнутую ДНК размером 170-190 т.п.о. Идентифицирован вирусный ген 5-НЛ, кодирующий белок 21 кД с высоким уровнем гомологии с семейством *bcl-2*-родственных белков - продуктов протоонкогенов, которые негативно и позитивно модулируют апоптоз. Клонирование и экспрессия этого гена в бакуловирусе сопровождалась развитием типичных для апоптоза признаков при инфицировании клеток насекомых рекомбинантом по сравнению с размножением бакуловируса дикого типа [10, 11].

---

\* опубликовано в журнале «Молекулярная генетика, микробиология и вирусология», 1995, 3, 38-43.

Как морфологическое явление апоптоз относительно мало известен в отечественной литературе [3, 5]. Цель данной работы — описание морфологических признаков индуцированного апоптоза в избранной системе вирус-клетка.

### **Материалы и методы.**

Поскольку важнейшие признаки апоптоза (характерные изменения ядерного вещества, образование апоптозных тел, интактность клеточной мембраны) трудно дифференцировать при светооптической микроскопии [3, 5, 12], использована электронная микроскопия препаратов с умеренным увеличением (кроме специальных случаев), позволяющая наблюдать состояние полноразмерной клетки ( $\times$  3-10000). Оценены тонкие срезы препаратов трех групп: (i) культуры клеток, зараженной вирулентным изолятом Ф-32 вируса АЧС европейской группы, (ii) обработанной дефектными интерферирующими (ДИ) частицами вируса и (iii) клеток-мишеней под действием вирусспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ). Основные характеристики культуры макрофагов свиньи, общие методы культуры клеток и заражения вирусом, тестирования ЦТЛ при АЧС и электронной микроскопии описаны в предыдущих публикациях [2, 4, 6].

ДИ-частицы вируса АЧС получали центрифугированием концентрированной осветленной вирусосодержащей суспензии в ступенчатом градиенте плотности сахарозы (40-43%, масса/объем) при 55 000 g в течение 4 часов. Фракция ДИ-частиц в зоне 1.20-1.21 г/см<sup>3</sup> (стандартный вирус АЧС в градиенте сахарозы имеет плотность 1.17-1.18 г/см<sup>3</sup>) при электронной микроскопии содержала внешне идентичные вирусные частицы, характеризовалась включением метаболической метки ДНК-[<sup>3</sup>H]-тимидина (в имп/мин/мл) и активностью вирусной РНК-полимеразы (на 1 мг белка), близкими по значениям для стандартного вируса, но отличалась в 100 раз более низкой инфекционностью при повышенных интерферирующей способности против гомологичного вируса и соответственно удельной активности РНК-полимеразы (на ГАЕ<sub>50</sub>). Для исключения репродукции вируса остаточную инфекционность фракции ДИ-частиц инактивировали гамма-облучением в дозе 2.5 Мрад в

течение 5 часов\*.

Необходимые детали и условия отдельных опытов указаны в подписях к рисункам.

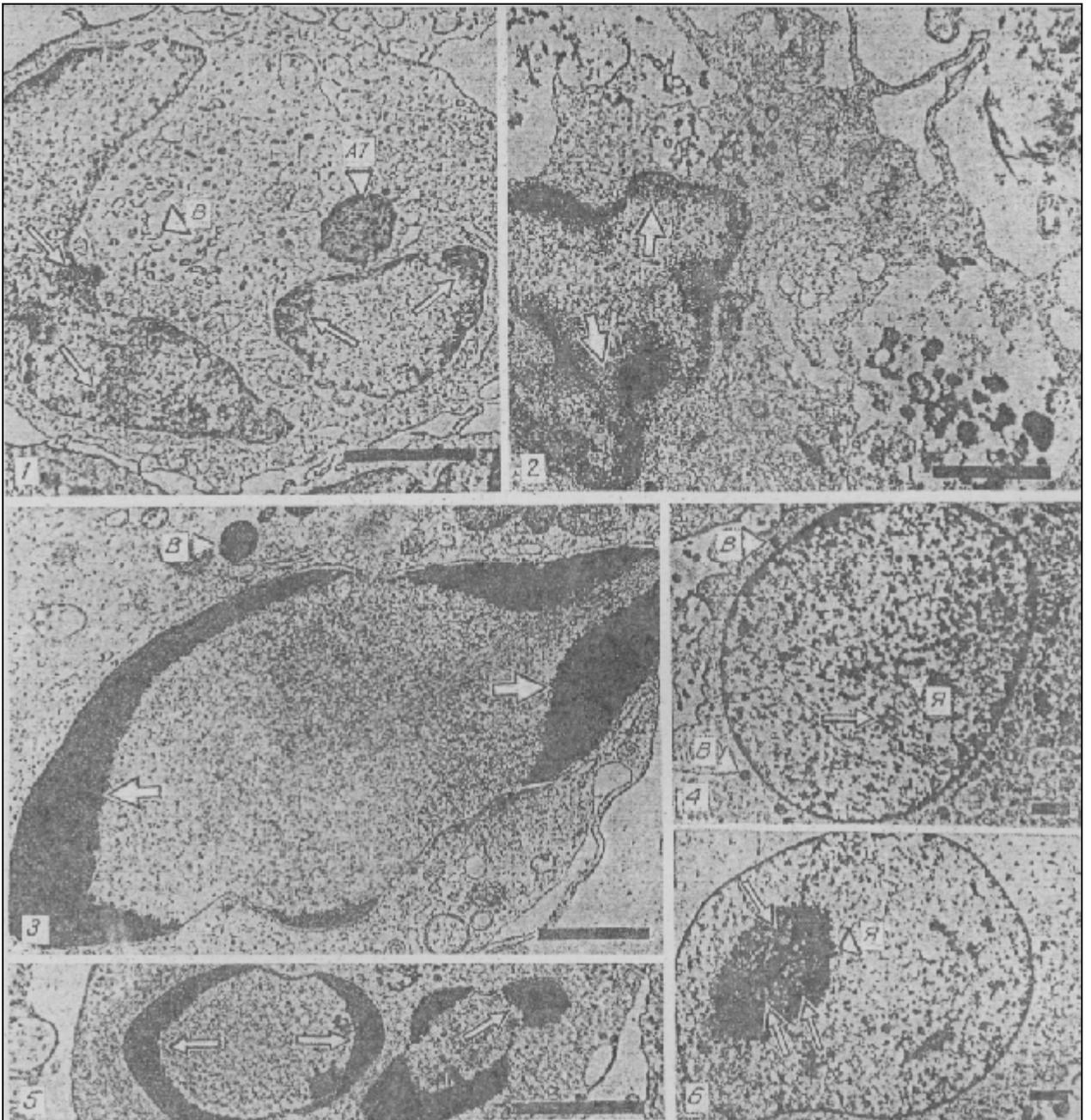
### **Результаты и обсуждение.**

**Ядерное вещество** на общем плане зараженного макрофага (рисунок 1/1) претерпевает ранние изменения - конденсацию хроматина в компактные гранулярные массы по внутреннему периметру границы ядра (показано стрелками). Здесь уже есть сформированное апоптозное ядро и структуры, напоминающие зарождающийся виропласт. Более выражена конденсация хроматина на рисунке 1/2 и особенно 3 и 5, где видны типичная картина поляризованных серповидных кэпов или дискретные "лепестки"-фрагменты гиперхроматина по периферии ядра (см. стрелки). На рисунке 1/4 показано состояние ядра зараженной клетки со следами распавшегося ядрышка и прилегающими вирусными частицами без агрегации хроматина, а на рисунке 1/6 увеличенное рыхлое, "рассыпающееся", ядрышко; в обоих случаях внутри ядра обнаруживаются электронно-плотные кольцевые структуры (см. стрелки), подобные таковым при цирковирусном апоптозе клеток В- и Т-лимфобластоидных линий *in vitro* и тимоцитов цыпят *in vivo* [8].

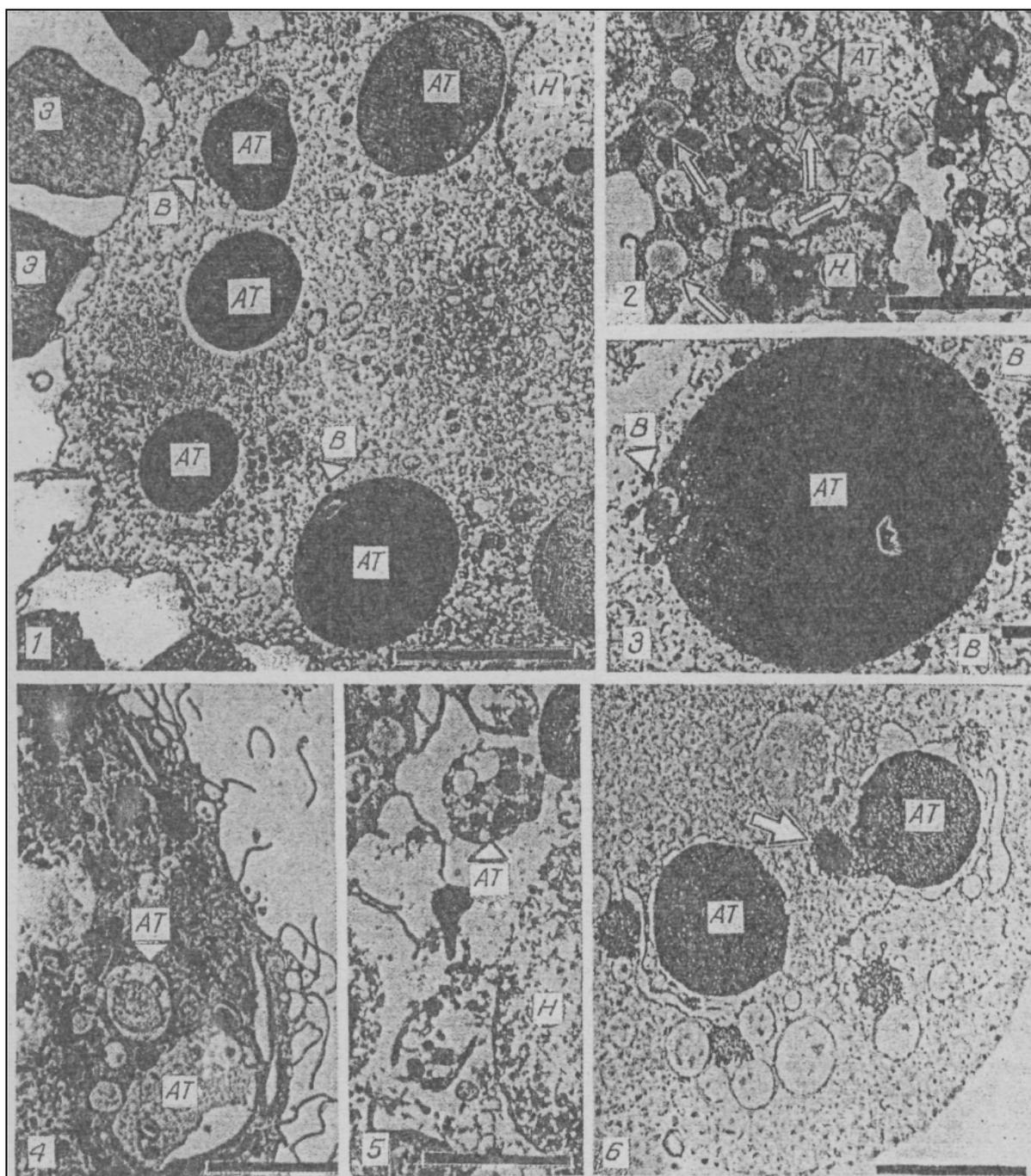
**Апоптозные тела** - морфологические образования из окруженных интактной мембраной клеточных фрагментов, на которые клетка в конечном итоге распадается, имеют самые разнообразные формы, в основном близкие к сферической или овоидные, и состав - от остатков с хорошо сохранившейся клеточной структурой до электронно-плотных гомогенных масс конденсированной цитоплазмы (рисунки 2/1, 4). Многочисленные округлые средней плотности (полупрозрачные) вакуоли (рисунок 2/2, см. стрелки), отражающие интенсивную зернистость клеток при светооптической микроскопии нативной культуры, также могут в данном случае считаться "кандидатами" в апоптозные тела.

---

\* метод получения ДИ-частиц, их характеристика и значение физико-химического полиморфизма популяции в биологии вируса АЧС подробно описаны в отдельной работе, помещенной в настоящем Сборнике на стр. 45-54.



**Рисунок 1. Состояние ядерного вещества макрофагов свиньи при заражении вирусом АЧС с множественностью 1 ГАЕ<sub>50</sub>/клетка через 8 часов (1) и 24 часа (3, 4) или при обработке ДИ-частицами вируса с высокой множественностью (> 400 на клетку) через 48 часов (2, 5, 6). Здесь и на рисунках 2-4: АТ - апоптотные тела, В - вирусные частицы, Н - ядро, Э - эритроциты, Я - ядрышко. Длина масштабной полоски 5 мкм (1, 2, 5) или 0.5 мкм (3, 4, 6).**

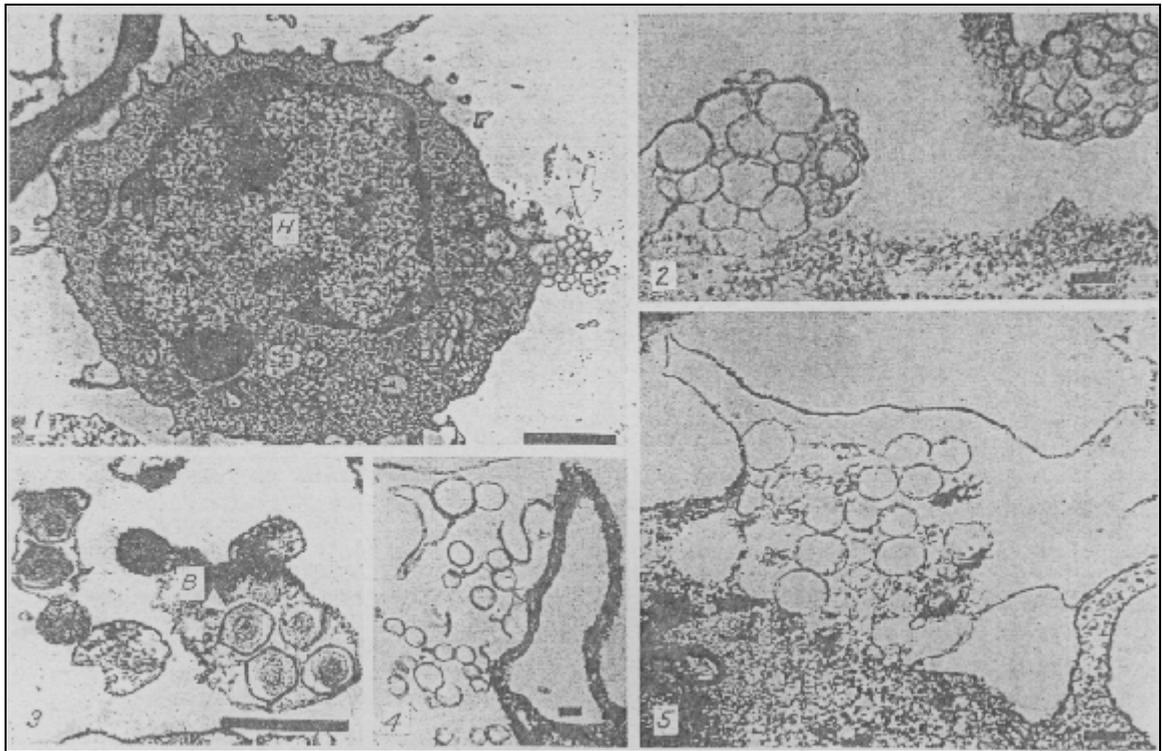


**Рисунок 2.** Морфология апоптозных тел, образующихся в макрофагах свиной при заражении вирусом АЧС с множественностью 1 ГАЕ<sub>50</sub>/клетка через 24 часа (1, 3, 4) или при обработке ДИ-частицами вируса с высокой множественностью (> 400 на клетку) через 48 часов (2), внеклеточные (5) и фагоцитированные (6) апоптозные тела в зараженной культуре. Длина масштабной полоски 5 мкм (1, 2, 4, 5, 6) или 0.5 мкм (3).

Судя по сравнительному диаметру прикрепившихся к зараженной клетке эритроцитов в процессе гемадсорбции или вирусных частиц (см. рисунок 2/1 и 3, соответственно), размер внутриклеточных гомогенных апоптозных тел может достигать порядка 5 мкм и более. Об эндогенном происхождении электронно-плотных гомогенных апоптозных тел в этих случаях свидетельствует привлечение к ограничивающим их мембранам вирусных частиц (см. рисунок 2/3). Разнообразная прогрессивная конденсация цитоплазмы, формирование апоптозных тел и их отделение совпадают с появлением характерных протуберанцев на поверхности окончательно распадающихся клеток (см. рисунок 2/4 и 5), неестественных по сравнению с нормальными псевдоподобиями макрофагов и отсутствующих на ранних стадиях инфекции (ср. рисунки 1/1 и 3/1). Внеклеточные апоптозные тела подвергаются фагоцитозу: на рисунке 2/6 показана фагосома с парой апоптозных тел и признаками их деградации (стрелка).

**Клеточная мембрана** на общем плане зараженного макрофага (рисунок 3/1) с началом очевидных изменений ядерного вещества уже на ранних стадиях имеет признаки "бойлинга" ("вскипания", показано стрелкой). При этом образующиеся пузырьки, довольно мелкие в отличие от апоптозных тел, имеют поистине форму мыльных пузырей (цит. по [9]), объединенных в множественную гроздевидную структуру (рисунок 3/2), расположенных отдельно (рисунок 3/4) или окруженных общей оболочкой (рисунок 3/5) и даже содержащих вирусные частицы разной степени зрелости (рисунок 3/3). По-видимому, сам по себе процесс "бойлинга" свидетельствует об интактности при этом клеточной мембраны.

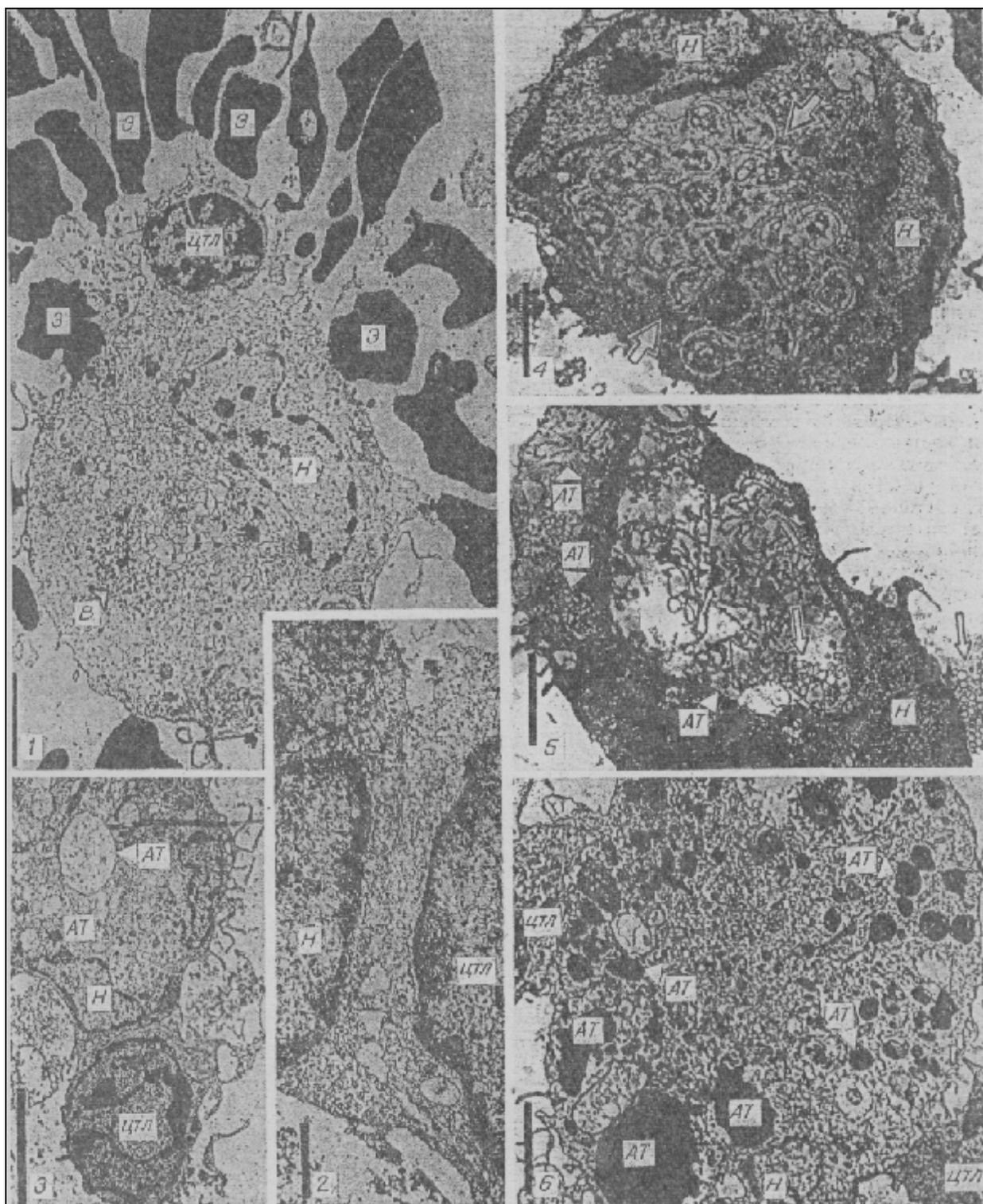
**Киллинг ЦТЛ клетки-мишени** уже на ранних этапах, до появления видимых повреждений последней, также характеризуется реакцией со стороны ядра, напоминающей апоптоз, - началом дискретной конденсации хроматина по внутреннему периметру (рисунок 4/1). Далее продемонстрирована с трудом поддающаяся систематизации чрезвычайно драматическая картина патоморфоза глубоких изменений клетки-мишени после иммунной атаки ЦТЛ: протуберанцы, апоптозные тела (рисунок 4/3), разнообразные формы последних, даже кластеризованные (рисунок 4/4, стрелки) или в виде гигантской "пустоты", занимающей большую часть клетки и содержащей беспорядочные



**Рисунок 3.** "Бойлинг" поверхности макрофагов свиньи при заражении вирусом АЧС с множественностью 1 ГАЕ<sub>50</sub>/клетка через 8 часов (1, 2) и 24 часа (3, 4, 5). Длина масштабной полоски 5 мкм (1) или 0.5 мкм (2, 3, 4, 5).

обрывки и клубки агрегированных микрофиламентов, с признаками клеточного "бойлинга" как за пределы клетки, так и внутри такой "пустоты" (рисунок 4/5, стрелки), десятки разного размера гомогенных электронно-плотных и других апоптозных тел в цитоплазме одной клетки-мишени (рисунок 4/6).

В дополнение к этому на общем плане иммунной атаки (см. рисунок 4/7) очевидно, что привлекающая ЦТЛ вирусспецифическая антигенная модуляция клетки-мишени и типичная для размножения вируса АЧС гемадсорбция происходят до видимых признаков ее вирусиндуцированного разрушения, в период формирования виропласта, задолго до почкования и тем более созревания вирусного потомства; атака ЦТЛ и гемадсорбция указывают на достаточную плотность вирусных мембранных антигенов к этому сроку. Два факта - наличие виропласта и



**Рисунок 4.** Киллинг вирусспецифическими ЦТЛ клеток-мишеней - аутологичных макрофагов свиньи через 18 часов после заражения последних вирусом АЧС с множественностью 1 ГАЕ<sub>50</sub>/клетка: общая картина атаки ЦТЛ клетки-мишени (1), морфологические детали контакта ЦТЛ-мишень (2) и более крупный план этой ситуации (3), различные ракурсы разрушения клеток-мишеней (4, 5, 6). Длина масштабной полоски 5 мкм (1, 3-6) или 0.5 мкм (2).

гемадсорбция - в свою очередь свидетельствуют об аутентичности клетки-мишени. То, что при этом ЦТЛ атакует мишень в сопровождении эскорта эритроцитов на стороне, противоположной виропласту, с известной долей условности все же указывает на некую поляризованность антигенной модуляции мембраны клетки-мишени и даже на определенное соответствие объектов атаки ЦТЛ и гемадсорбирующего антигена.

Таким образом, в системе «вирус АЧС-клетки системы мононуклеарных фагоцитов» во всех случаях обнаружены морфологические свидетельства апоптоза как формы клеточной гибели. Если в таком контексте реинтерпретировать опубликованные нами ранее результаты изучения ультраструктурных изменений макрофагов свиньи под действием ингибиторов гликозилирования [2], то там также обнаруживались морфологические признаки разрушения клеток по апоптозному пути; через 24 часа после инкубации клеток в присутствии моненсина (0.5-1.0 мкг/мл) или 2-дезокси-*D*-глюкозы (10 мг/мл) происходили конденсация ядерного вещества и цитоплазмы, расширение эндоплазматической сети, образование апоптозных тел. В числе прочих цитопатологических явлений особенно драматична картина разрушения клеток-мишеней цитотоксическими Т-лимфоцитами; в последнем случае описанные признаки несколько отличаются от традиционных представлений [9], в частности, в отношении разрушения клеточных мембран, набухания, дезинтеграции и потери цитоплазмы. Развитие типичной картины при обработке клеток ДИ-частицами вируса АЧС указывает, что причиной вирусиндуцированного апоптоза являются, по всей вероятности, вирионные или ранние вирусные белки.

### **Благодарность.**

Фрагмент работы, связанный с изучением ЦТЛ, выполнен в рамках проекта РФФИ, грант № 94-04-12076. Благодарю сотрудников ВНИИВВиМ Е.К.Сенечкину, С.Ф.Чевелева и А.Д.Середу за помощь в написании статьи.

## Литература.

1. Волянский Ю.Л., Колотова Т.Ю., Васильев Н.В. // Успехи соврем. биол., 1994, т. 114, № 5, С. 679-692.
2. Ефимова А.А., Малахова М.С., Середа А.Д., Макаров В.В. // Доклады ВАСХНИЛ, 1989, № 7, С. 38-40.
3. Лушников Е.Ф. // Арх. пат., 1986, № 3, С. 60-67.
4. Макаров В.В., Малахова М.С., Власов Н.А., Чевелев С.Ф. // Доклады РАСХН, 1992, № 11-12, С. 37-44.
5. Общая патология человека // Под ред. А.И.Струкова, В.В.Серова, Д.С.Саркисова. 2-е изд., М., 1990.
6. Середа А.Д., Соловкин С.Л., Сенечкина Е.К., Макаров В.В. // Сельхоз. биол., 1994, № 6, С. 112—115.
7. Cohen J.J. // Immunol. Today, 1993, v. 14, P. 126-130.
8. Eurissen S., Wagenaar F., Pol J. et al. // J. Virol., 1992, v. 66, № 12, P. 7383-7388.
9. Klein J. Natural history of the major histocompatibility complex. N.Y., 1986.
10. Neilan J.G., Lu Z., Afonso C.L. et al. // J. Virol., 1993, v. 67, № 7, P. 4391-4394.
11. Neilan J.G., Zsak L., Caler E. et al. Conf. Res. Work. Anim. Dis., 75-th, Abstracts, Fort Collins, Col., 1994.
12. Wyllie A., Kerr J., Currie A. // Int. Rev. Cytol., 1980, v. 68, P. 251-305.

# **ПОПУЛЯЦИОННАЯ СТРУКТУРА ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ ПО ПРИЗНАКУ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ГЕМАДСОРБЦИИ\***

В биологическом и патологическом аспектах африканская чума свиней (АЧС) как инфекция характеризуется рядом уникальных особенностей и невыясненных моментов. В их числе - свойства сих пор неклассифицированного возбудителя, окончательно не исследованная стратегия в организме хозяина, вирусологические механизмы функционирования паразитарной системы «вирус АЧС-популяция свиней» в природных очагах и условиях домашнего свиноводства. В связи с последним обстоятельством на основе анализа современной эволюции данной инфекции нами было высказано предположение о ведущей роли изначально выраженного клонального разнообразия природных вирусных популяций, обуславливающего быстрое изменение вирулентности вируса в полевых условиях, и его преобладающем значении по сравнению с постепенной, «случайной» гетерогенизацией возбудителя путем мутагенеза и накопления мутантов. Иными словами, речь шла о необычайно богатом, поддерживаемом на высоком уровне мобилизационном резерве изменчивости как причине постоянной готовности вируса АЧС к «шифтовым» модификациям при возникновении соответствующих условий [2].

Вирус АЧС обладает способностью индуцировать специфическую адсорбцию эритроцитов на зараженных клетках в культуре с сероспецифической отменой феномена [5]. Поэтому в принципе гетерогенность популяции вируса АЧС постулирована еще в 1971 г. Несс'ом на основании ряда предшествующих сообщений об изоляции его негемадсорбирующих вариантов.

---

\* опубликовано в журнале «Вопросы вирусологии», 1991, 4, 321-324 совместно с И.Ф. Вишняковым, Н.А.Власовым и А.М.Серовой.

Позднее была обнаружена так называемая атипичная (однослойная) гемадсорбция на отдельных клетках в зараженной культуре, называемая в нашей работе «рыхлой» в отличие от типичной «плотной» (многослойной) гемадсорбции. Сейчас фенотипическая гетерогенность достоверно подтверждена уже при изучении целого ряда биологических свойств компонентов популяции вируса АЧС [6, 8].

Однако количественных характеристик феномена в строгом значении понятия не получено. Это обстоятельство относится прежде всего к популяционной структуре вируса АЧС, что связано с отсутствием надлежащих стандартных подходов к его клонированию и описанию «поперечного разреза» популяций определенных изолятов и вариантов; вирус успешно культивируется в гемопозитических клетках свиньи, где невозможно его тестирование по негативным колониям и S-признаку, в других же культурах размножение возможно только после сложной адаптации, сопровождающейся изменением его исходных свойств.

Цель настоящего исследования - сравнительная оценка популяционной структуры вариантов вируса АЧС с контрастными свойствами. В качестве фенотипического признака использована гемадсорбция, количественно определяемая по числу адсорбированных зараженной клеткой эритроцитов в естественно восприимчивой системе А-клеток (макрофагов) свиней.

### **Материалы и методы.**

Использованы вирулентные штаммы вируса АЧС Ф-32\*, К-73 и их авирулентные аттенуированные варианты - соответственно ФК и КК, полученные пассированием в культуре клеток костного мозга свиньи (КМС). В отдельных случаях для сравнения были взяты высоковирулентные штаммы «Мозамбик» (МОЗ), «Киравира» (КИР), культуральные аттенуированные варианты ТСП (дериват КИР) и ЛК. Для заражения на пластинках из покровного стекла размером 9x18 мм получали культуру прилипающей фракции

---

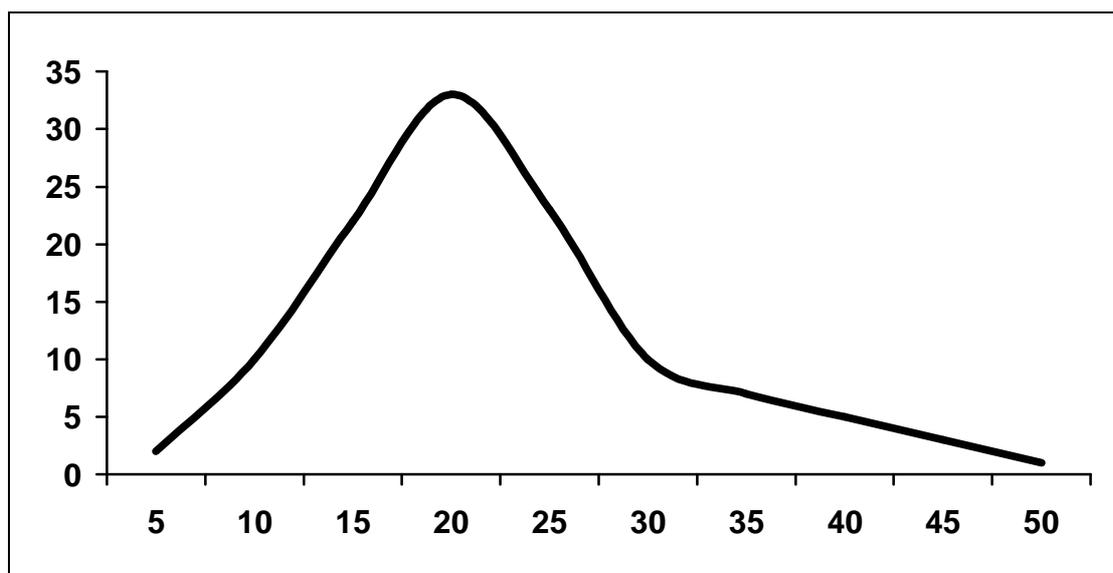
\* здесь и далее - индексы лаборатории музейных штаммов ВНИИВВиМ.

клеток КМС после трехсуточной их адгезии; эти так называемые А-клетки исходно наиболее чувствительны к вирусу АЧС. После заражения их с низкой множественностью ( $M=0.001-0.01$  ГАЕ<sub>50</sub>/клетка) и 48-72-часовой инкубации ставили реакцию гемадсорбции по методу [5], затем культуру на пластинах фиксировали метанолом и окрашивали 1% раствором азуро-эозина. При увеличении  $\times 400$  подсчитывали количество эритроцитов, прикрепившихся на отдельных клетках. Таким путем обсчитывали 200-400 клеток в поле зрения, расположенных по диагоналям препарата. Статистическая обработка данных включала расчет средних арифметических значений, стандартных ошибок средних арифметических, оценку достоверности средних значений, достоверности различий, полный регрессионный анализ и т. п., проводимый на ЭВМ «Мир-2» с использованием стандартных программ [1, 3, 4].

### **Результаты и обсуждение.**

Оказалось, что число эритроцитов на одной клетке для штаммов ФК, Ф-32 и КИР варьирует в значительных пределах. Вместе с тем частота встречаемости признака носит характер распределения, близкого к нормальному (рисунок 1). При этом среднее арифметическое число эритроцитов на гемадсорбирующую клетку в вариационном ряду для разных штаммов оказалось различным: низким у ФК ( $18.52 \pm 0.36$ ) и более высоким у Ф-32 и КИР ( $29.32 \pm 0.71$  и  $34.49 \pm 0.89$ , соответственно). Таким образом, судя по штаммовой специфике, количественная характеристика гемадсорбирующей активности вируса могла быть использована в качестве фенотипического признака.

Характер распределения количества эритроцитов на отдельных клетках, или признак количественного выражения гемадсорбции (в дальнейшем просто «признак»), уже предопределял его вариабельность и внутривидовую гетерогенность вируса АЧС. Чтобы убедиться в этом, с помощью световой микроскопии проведен количественный учет гемадсорбирующих клеток с условным разделением на два типа - обладающих «рыхлой» и «плотной» гемадсорбцией. Из данных, приведенных в таблице 1, видно, что популяции использованных штаммов вируса неоднородны. В связи с этим правомерен вопрос,



**Рисунок 1.** Частота встречаемости клеток КМС с определенным количеством эритроцитов на поверхности в культуре, зараженной вирусом АЧС, штамм ФК. По оси ординат - количество клеток, по оси абсцисс - количество адсорбированных эритроцитов.

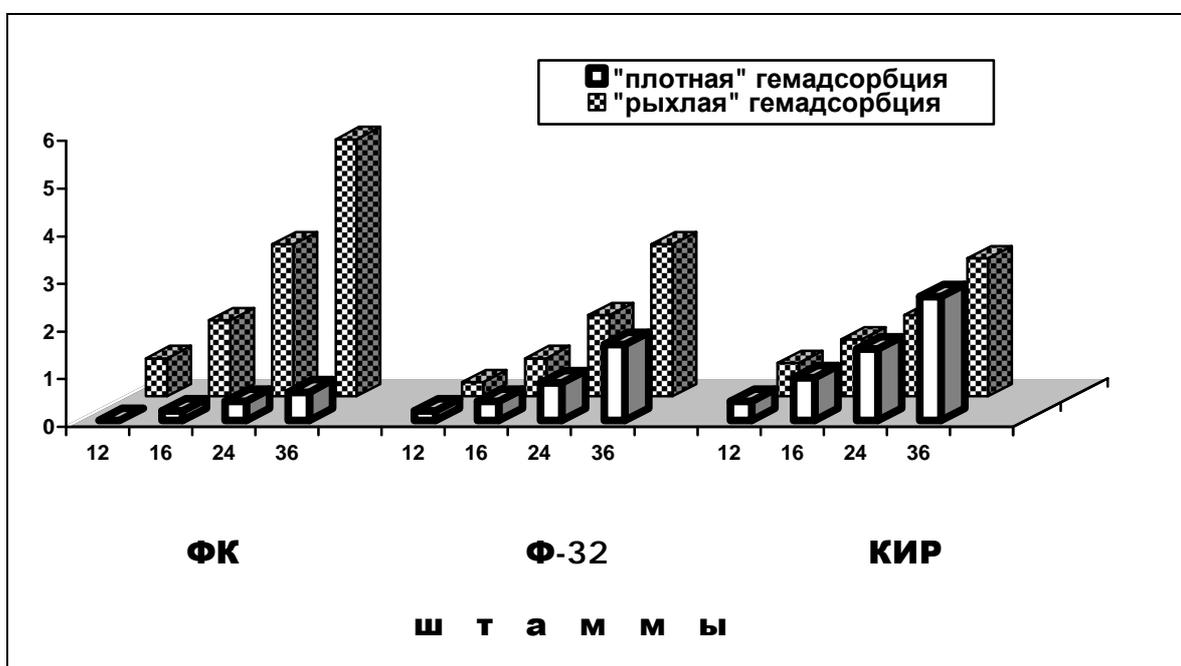
является ли тип гемадсорбции стабильным клональным (генетическим) признаком или характер феномена отражает динамику сенсibilизации мембран зараженных клеток с постепенным переходом от «рыхлой» гемадсорбции к «плотной» по ходу внутриклеточного развития вируса.

**Таблица 1.**  
Количество клеток с «рыхлой» и «плотной» гемадсорбцией в культуре КМС через 24 часа после заражения различными штаммами вируса АЧС (на 200 клеток).

Штаммы	Количество клеток с гемадсорбцией	
	«рыхлой»	«плотной»
ФК	189	11
Ф-32	141	59
КИР	105	95

Для ответа на него образование гемадсорбирующих клеток обоих типов было прослежено в динамике вирусного размножения при  $M=0.01$  ГАЕ<sub>50</sub>/клетка. Как видно из рисунка 2, установленные

пропорции (см. таблицу 1) остаются неизменными в исследованные сроки у трех различных штаммов. Это обстоятельство свидетельствует, что количественное выражение гемадсорбирующей активности вируса АЧС постоянно в пределах одной популяции и различно для штаммов. Иными словами, признак является генетическим (штаммоспецифическим) по аналогии, например, с S-признаком у других вирусов и в известной мере может компенсировать невозможность анализа клонов природного вируса АЧС по размеру негативных колоний под твердым покрытием.



**Рисунок 2.** Образование клеток КМС с «рыхлой» и «плотной» гемадсорбцией в различные сроки при размножении штаммов вируса АЧС с контрастными по этому признаку свойствами ( $M=0.01$  ГАЕ<sub>50</sub>/клетка). По оси ординат - количество гемадсорбирующих клеток на поле зрения, по оси абсцисс - время культивирования, часы.

В целях более детального измерения внутривидовой гетерогенности вируса АЧС результаты подсчета абсолютного числа эритроцитов на большом количестве зараженных клеток подвергли машинной обработке. Для определения характеристик совокупностей выборки анализировали по методу обработки несгруппированного набора измерений, разделение смешанной

выборки на нормально распределенные совокупности и определение аномальности распределения - по специальной программе на ЭВМ «Мир-2» [1].

Статистическая характеристика популяций указанных штаммов вируса АЧС приведена в таблице 2. Ее анализ свидетельствует о различиях совокупностей по модальному числу ( $M_0$ ) за счет свойств самих совокупностей, а не ошибок опыта (среднее квадратичное отклонение  $S$  и коэффициент вариации  $V$ ), каждая совокупность не имеет характера нормального распределения (величины показателя асимметрии  $A$  и показателя эксцесса  $E$ ), объемы выборок, характеризуемые величинами ошибки значения  $S$  ( $OS$ ) и ошибки значения  $V$  ( $OV$ ), достаточны и т.д. Большой коэффициент вариации ( $V > 25\%$ ) указывает на асимметричность распределения признака, одной из причин которого может быть неоднородность совокупностей, т.е. объединение в их составе двух и более нормальных совокупностей, характеризующихся самостоятельным набором основных параметров ( $M_0, m, S$ ; см. таблицу 2).

Поэтому каждая совокупность (для каждого штамма) была разделена на нормально распределенные составляющие. Результаты, представленные в таблице 3, показали, что во всех случаях разделение совокупностей характеризуется закономерным группированием частот встречаемости с формированием строго определенных нормально распределенных составляющих (или компонентов) популяций использованных штаммов вируса АЧС. Это обстоятельство прямо указывает на их субпопуляционную гетерогенность по аналогии с классическим распределением любого фенотипического признака в биометрии [3, 4]. Данные средней части таблицы 3 позволяют количественно выразить относительный субпопуляционный состав вируса по сумме частот встречаемости признака, где в качестве усредненных элементов выявляются три субпопуляционных компонента - клетки, адсорбирующие до 20 (первый, «рыхлый»), 20-40 (второй, промежуточный) и 40-80 (третий, «плотный») эритроцитов. Статистический анализ субпопуляционного состава по критериям, использованным выше (см. таблицу 2), подтвердил достоверность разделения совокупностей.

**Таблица 2.**

**Статистическая характеристика популяций штаммов ФК, Ф-32 и КИР вируса АЧС по признаку гемадсорбции (количеству адсорбированных эритроцитов на отдельных клетках).**

Штаммы	Параметры*													
	<i>min</i>	<i>max</i>	<i>Mo</i>	<i>m</i>	<i>S</i>	<i>OS</i>	<i>V</i>	<i>OV</i>	<i>A</i>	<i>OA</i>	<i>E</i>	<i>OE</i>	<i>TA</i>	<i>TE</i>
<b>ФК</b>	<b>4</b>	<b>46</b>	<b>18.52</b>	<b>0.36</b>	<b>7.38</b>	<b>0.25</b>	<b>39.85</b>	<b>1.57</b>	<b>0.79</b>	<b>0.19</b>	<b>0.39</b>	<b>0.29</b>	<b>4.15</b>	<b>1.34</b>
<b>Ф-32</b>	<b>4</b>	<b>83</b>	<b>34.00</b>	<b>0.83</b>	<b>13.60</b>	<b>0.51</b>	<b>40.00</b>	<b>2.06</b>	<b>0.34</b>	<b>0.13</b>	<b>-0.54</b>	<b>0.26</b>	<b>2.61</b>	<b>2.08</b>
<b>КИР</b>	<b>6</b>	<b>74</b>	<b>37.99</b>	<b>1.37</b>	<b>17.24</b>	<b>0.59</b>	<b>45.38</b>	<b>2.09</b>	<b>0.72</b>	<b>0.18</b>	<b>-0.44</b>	<b>0.23</b>	<b>4.00</b>	<b>1.91</b>

\* *min*, *max* - экстремальные значения, *Mo* – модальное число, *m* – ошибка значения *Mo*, *S* – среднее квадратичное отклонение, *OS* – ошибка значения *S*, *V* – коэффициент вариации (%), *OV* – ошибка значения *V*, *A* – показатель асимметрии, *OA* - ошибка значения *A*, *E* – показатель эксцесса, *OE* – ошибка значения *E*, *TA* и *TE* – критерии достоверности *A* и *E*.

**Таблица 3.**

**Статистическая характеристика совокупностей (популяций) по нормально распределенным составляющим для штаммов ФК, Ф-32 и КИР вируса АЧС.**

<b>Штаммы</b>	<b>Составляющие совокупностей</b>	<i>Mo</i>	<i>S</i>	<i>T*</i>	<i>Г*</i>	<b>% от общего количества</b>
<b>ФК</b>	<b>1</b>	<b>15.35</b>	<b>4.49</b>	<b>0.20</b>	<b>4-22</b>	<b>81.3</b>
	<b>2</b>	<b>30.10</b>	<b>4.49</b>	<b>0.26</b>	<b>22-40</b>	<b>18.7</b>
<b>Ф-32</b>	<b>1</b>	<b>17.54</b>	<b>8.95</b>	<b>0.31</b>	<b>4-23</b>	<b>33.1</b>
	<b>2</b>	<b>31.73</b>	<b>8.95</b>	<b>0.20</b>	<b>21-42</b>	<b>40.2</b>
	<b>3</b>	<b>47.18</b>	<b>13.05</b>	<b>0.38</b>	<b>44-83</b>	<b>26.7</b>
<b>КИР</b>	<b>2</b>	<b>25.54</b>	<b>8.55</b>	<b>0.20</b>	<b>6-44</b>	<b>73.9</b>
	<b>3</b>	<b>60.11</b>	<b>8.55</b>	<b>0.21</b>	<b>45-73</b>	<b>26.1</b>

\* *T* – трансгрессия, *Г* – граничные значения признака между составляющими.

Эта «структурная» закономерность явления гетерогенности, как оказалось, распространяется и на популяции дополнительно исследованных пяти штаммов вируса АЧС, различающихся по вирулентности. Все они обладали аналогичными статистическими характеристиками субпопуляционного состава и делились на те же нормально распределенные усредненные составляющие, что и изначально взятые штаммы ФК, Ф-32 и КИР. Сравнительные данные о субпопуляционном составе восьми штаммов и вариантов вируса АЧС в суммированном виде приведены в таблице 4. Очевидно, что первые четыре аттенуированные (авирулентные) варианты характеризуются наличием только первой и второй субпопуляций с «рыхлой» и промежуточной гемадсорбцией. Популяции вирулентных штаммов МОЗ, КИР и К-73, напротив, теряют первый компонент и содержат субпопуляции с промежуточной и «плотной» гемадсорбцией. Штамм Ф-32 занимает переходное положение.

Сходная картина зависимости от вирулентности наблюдается при графическом выражении модальных чисел адсорбированных эритроцитов, количественно характеризующих гемадсорбирующую активность исследованных штаммов и вариантов вируса АЧС (рисунок 3). В этом случае авирулентные варианты, начиная с ФК, в целом менее активны и отличаются по данному показателю от вирулентных; крайние различия для штаммов ФК и К-73 составляют  $18.52 \pm 0.36$  и  $41.10 \pm 1.18$ , соответственно.

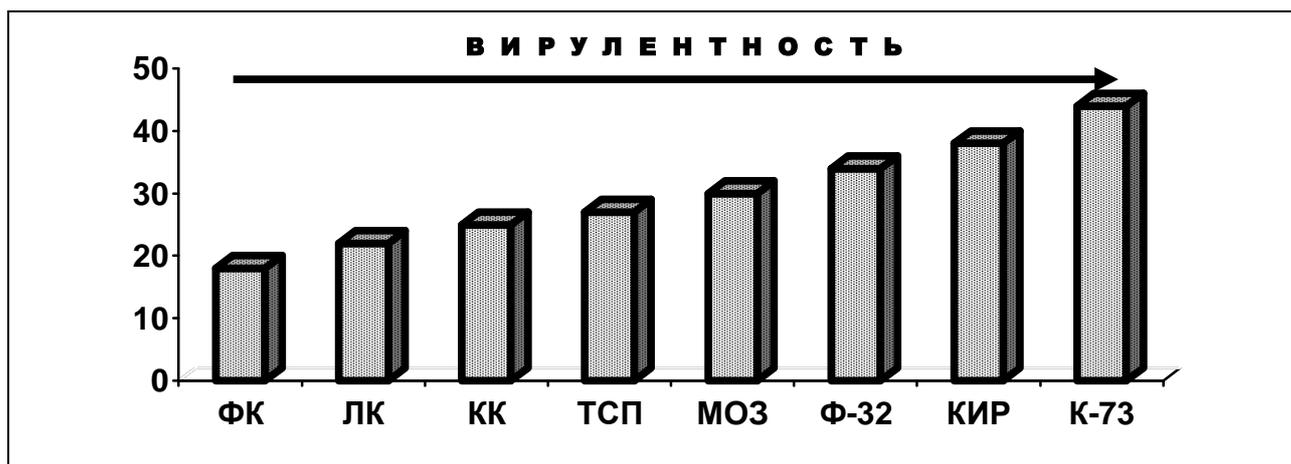
**Таблица 4.**

**Сравнительный состав популяций различных штаммов и вариантов вируса АЧС по признаку количественной гемадсорбции.**

Штаммы, варианты	Вирулентность	Происхождение, годы изоляции**	Относительное содержание компонентов популяций вируса, %		
			до 20 эритроцитов	20-40 эритроцитов	40-80 эритроцитов
<b>ФК</b>	-	<b>ЛАБ</b>	<b>81.30</b>	<b>18.70</b>	<b>0</b>
<b>ЛК</b>	-	<b>ЛАБ</b>	<b>69.13</b>	<b>30.87</b>	<b>0</b>
<b>КК</b>	-	<b>ЛАБ</b>	<b>64.04</b>	<b>35.96</b>	<b>0</b>
<b>ТСП</b>	-	<b>ЛАБ</b>	<b>58.38</b>	<b>41.62</b>	<b>0</b>
<b>Ф-32</b>	±*	<b>ПР-ЕВР-64</b>	<b>33.10</b>	<b>40.20</b>	<b>26.80</b>
<b>КИР</b>	+	<b>ПР-АФР-70</b>	<b>0</b>	<b>73.30</b>	<b>26.70</b>
<b>К-73</b>	+	<b>ПР-АФР-73</b>	<b>0</b>	<b>74.28</b>	<b>25.72</b>
<b>МОЗ</b>	+	<b>ПР-АФР-64</b>	<b>0</b>	<b>47.40</b>	<b>52.60</b>

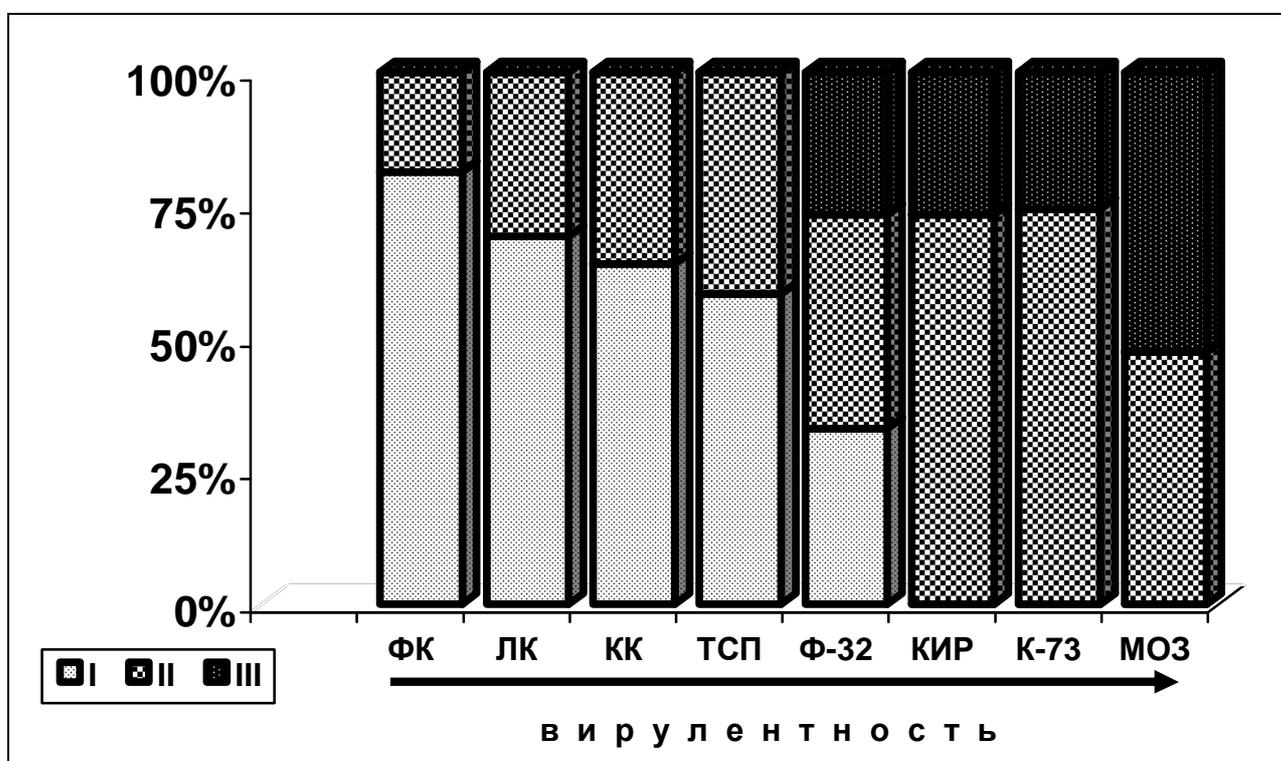
\* по сравнению с остальными вирулентными штаммами вариант Ф-32 может рассматриваться как умеренно вирулентный.

\*\*ЛАБ - лабораторный вариант, ПР-ЕВР-64 - природный изолят, выделенный в Европе в 1964 г., ПР-АФР - природные изоляты, выделенные в Африке в 1970, 1973 и 1964 гг. (см. [8]).



**Рисунок 3. Модальные числа адсорбированных эритроцитов на клетках КМС (по оси ординат) при заражении различными штаммами и вариантами вируса АЧС.**

Таким образом, разносторонняя оценка признака количественного выражения гемадсорбции, несмотря на значительную методическую трудоемкость, оказалась достаточно информативной для характеристики штаммовой специфики, гетерогенности популяций, субпопуляционного состава вируса АЧС. Выражение признака коррелирует с вирулентностью: аттенуированным вариантам свойственны пониженная гемадсорбирующая активность в целом, преобладание субпопуляционных компонентов со сдвигом в эту сторону и наоборот (рисунок 4).



**Рисунок 4.** Графическое соотношение субпопуляционного состава вируса АЧС по признаку количественной гемадсорбции с вирулентностью различных штаммов и вариантов. I компонент популяции (до 20 эритроцитов), II компонент (20-40 эритроцитов), III компонент (40-80 эритроцитов).

Можно сделать вывод, что экспрессия вирусиндуцированного гемадсорбирующего антигена подвержена генетическому контролю. На этом основании возможна селекция вирусных вариантов - кандидатов в вакцинные штаммы.

Полученные данные интересны и в контексте значения феномена гемадсорбции как показатели вирусспецифической антигенной модуляции мембран зараженных клеток. Следует полагать, что гетерогенность популяции вируса АЧС может трактоваться и в отношении экспрессии его антигенов на мембранах зараженных клеток. Удивительно, что подобная точка зрения на гемадсорбирующий антиген вируса АЧС не принимается во внимание. Так, Plowright [7] в своем недавнем ретроспективном обзоре писал, что «это явление все еще не объяснено, плохо описано и вызывает малый интерес». Им же отрицается иммунологическое значение гемадсорбирующего (мембранного) антигена вируса АЧС. На основе полученных нами данных возможно предположение, что вирулентность вируса АЧС непосредственно определяется характером экспрессии его антигенов в мембранах зараженных клеток. Поэтому установленный градиент различий штаммов по признаку количественной гемадсорбции может косвенно отражать состояние мобилизационного резерва изменчивости вируса АЧС в локальных природных популяциях. Одной из основных предпосылок поддержания высокой степени гетерогенности вирусных популяций может служить тот факт, что вирус АЧС в силу особенностей физиологии репродуцируется в клетках макрофагального ряда, где исключается рецепторзависимый эндоцитоз как основной для большинства вирусов селекционирующий фактор; в отсутствие отбора этого типа, согласно закону Харди-Вайнберга, частота генотипов не должна изменяться.

## Литература.

1. Андреев В.А. Биометрические расчеты на ЭВМ «Мир-2». М., 1979.
2. Бакулов И.А., Макаров В.В. // Вестн. с/х науки, 1990, № 3, С. 46—55.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия. М., 1980.
4. Филипченко Ю.А. Изменчивость и методы ее изучения. М., 1978.
5. Malmquist W., Hay D. // Bull. Off. Int. Epizoot., 1961, v. 55, № 1-2, P. 176-184.
6. Pan J., Hess W. // Amer. J. Vet. Res., 1985, v. 46, № 2, P. 314-320.
7. Plowright W. // Res. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot., 1986, v. 5, № 2, P. 455-468.
8. Vinuela E. // Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1985, v. 116, P. 151-170.

# **ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ВИРУСНОЙ ПОПУЛЯЦИИ И ДЕФЕКТНЫЕ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ЧАСТИЦЫ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ\***

Дефектные интерферирующие (ДИ) частицы присутствуют в популяциях большинства вирусов. Подробно изучены условия и механизмы образования, биологическая роль ДИ-частиц РНК-содержащих вирусов гриппа, везикулярного стоматита, бешенства, Синдбис, Сендай [2-4, 6]. Относительно ДНК-содержащих вирусов данных значительно меньше [7]. О наличии ДИ-частиц в популяциях вируса африканской чумы свиней (АЧС) сообщений нет.

Из зараженной вирусом АЧС суспензии клеток можно получить концентрат, который после инактивации инфекционности гамма-облучением сохраняет биологическую активность, что проявляется в способности ингибировать накопление стандартного вируса при одновременном внесении обоих компонентов в культуру клеток костного мозга свиней (КМС). Эти исходные данные о вирусингибирующем факторе (ВИФ) представляют несомненный интерес с точки зрения его роли в проявлении биологических свойств вируса и ряда других аспектов.

---

\* опубликовано в журнале «Вестник Россельхозакадемии», 1997, 5, 67-70 совместно с А.Д.Середой и Н.А.Власовым.

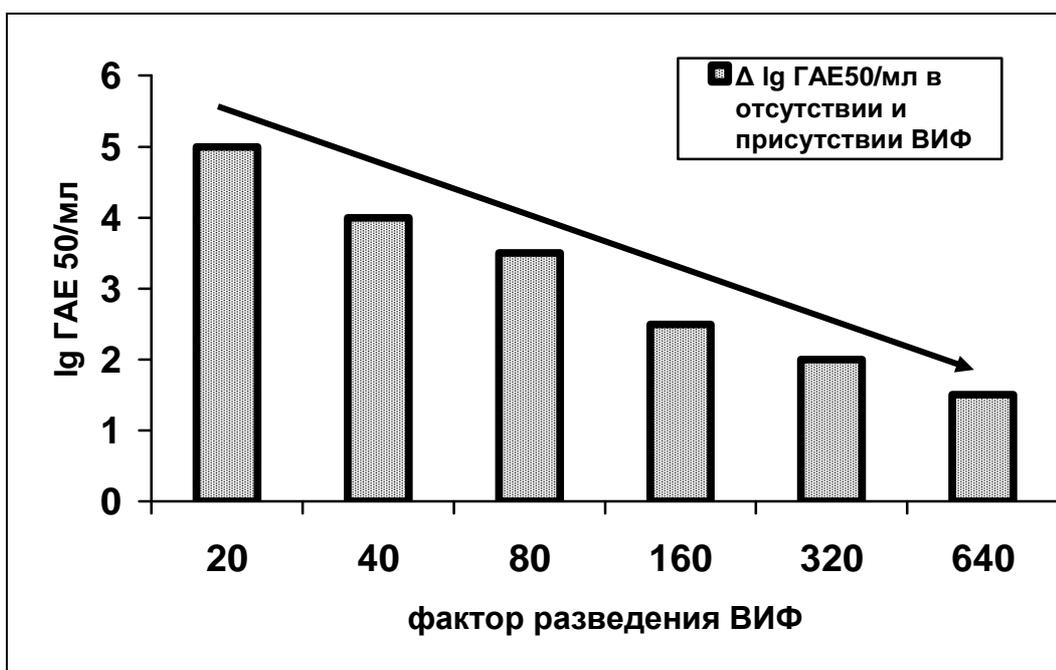
## **ДИ-частицы вируса АЧС.**

Кратко методика получения ВИФ состоит в следующем.

Двухсуточную культуру клеток КМС заражают вирусом АЧС с множественностью  $10^{-4}$  ГАЕ<sub>50</sub> или ТЦД<sub>50</sub>/клетка. Через 5 суток культивирования вирусосодержащую суспензию дважды осветляют центрифугированием при 3000 g 30 минут, в надсадок добавляют ПЭГ 6000 до 5% концентрации и через 18 часов инкубирования при 4°C осаждают при 3000 g 30 минут. Затем преципитат ресуспендируют в фосфатном буферном растворе (ФБР) в объеме 1:100 к исходному и пересаждают через 30% сахарозную "подушку" при 50 000 g в течение 2 часов. Осадок ресуспензируют в ФБР в объеме 1:1000 от исходного и подвергают гамма-облучению дозой 2.5 Мрад, что приводит к потере инфекционной активности вируса АЧС.

Первоначально проведено количественное тестирование активности ВИФ в культуре КМС. С этой целью препараты ВИФ, полученные из вируса АЧС (штамм ФК-135), в двукратных разведениях вносили в культуру КМС и через 30 минут ее заражали исходным нативным (стандартным) вирусом АЧС с множественностью  $10^{-4}$  ГАЕ<sub>50</sub>/клетка. Накопление коинфицирующего вируса определяли через 5 суток титрованием в КМС и рассчитывали ингибирующую активность препаратов ВИФ по разнице накопления инфекционного вируса в контрольных и опытных пробах.

Обнаружена прямая линейная зависимость между дозой ВИФ и его ингибирующей активностью (рисунок 1, стрелка-тренд), что свидетельствует о проявлении активности ВИФ как инактивированного, нереплицирующегося агента. Изучение динамики размножения стандартного вируса АЧС (штамм ФК-135) в клетках КМС, зараженных с множественностью  $10^{-4}$  ГАЕ<sub>50</sub>/клетка, в присутствии гомологичного ВИФ в разведении 1:160 показало, что, несмотря на снижение урожая в среднем на 2,5 lg ГАЕ<sub>50</sub>/мл в течение всего периода культивирования и накопления, общий характер репродукции не отличается от контроля с использованием интактной культуры.



**Рисунок 1. Снижение уровня накопления стандартного вируса АЧС, шт. ФК-135) в присутствии гомологичного ВИФ в различной концентрации.**

Далее проведены эксперименты с целью установления возможных коррелятивных изменений активности ВИФ в процессе серийных пассажей вируса АЧС в клетках КМС. Для этого использованы штамм «Катанга» и его серийные пассажные варианты К-105, К-110, К-149, К-170, К-190. При их сравнении определялась активность приготовленных из них по принятой методике препаратов ВИФ и уровень внеклеточной лактатдегидрогеназы (ЛДГ) - свойства, количественно характеризующего цитолитическую активность нативного вируса. Оказалось, что в процессе пассажей по мере снижения вирулентности возрастает интерферирующая активность соответствующих вариантов препаратов ВИФ и параллельно уменьшается цитолитический потенциал нативного вируса (рисунок 2, см. стрелки-тренды). Установленные корреляции указывают на вероятную природу ВИФ как ДИ-частиц.

Результаты влияния физико-химических факторов на интерферирующую активность ВИФ свидетельствовали об устойчивости ВИФ к прогреванию при 56°C, гамма-облучению в дозах 1.25-2.5 Мрад, воздействию проназы и ДНК-азы (рисунок 3). Очевидно, что кроме отношения к облучению по остальным параметрам ВИФ не отличался от стандартного инфекционного вируса АЧС.

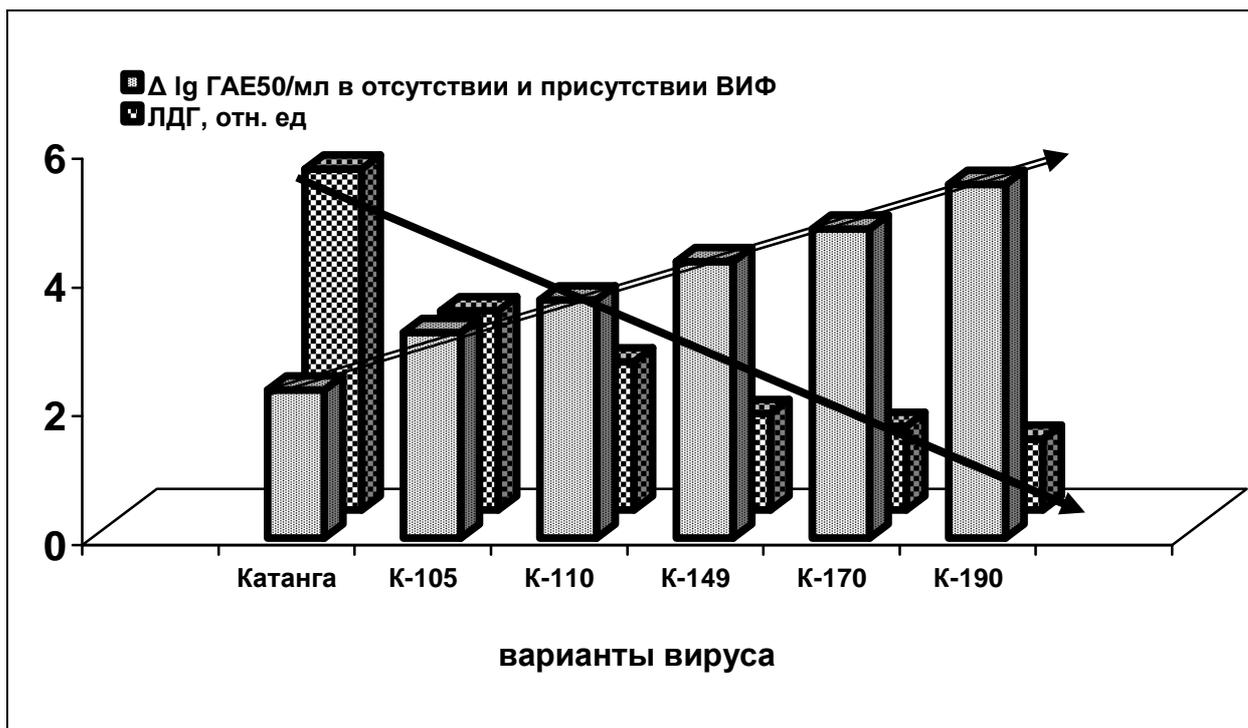


Рисунок 2. Интерферирующая активность ВИФ (в разведении 1:80) и цитолитическая активность (уровень внеклеточной лактатдегидрогеназы) пассажных вариантов вируса АЧС, шт. «Катанга».

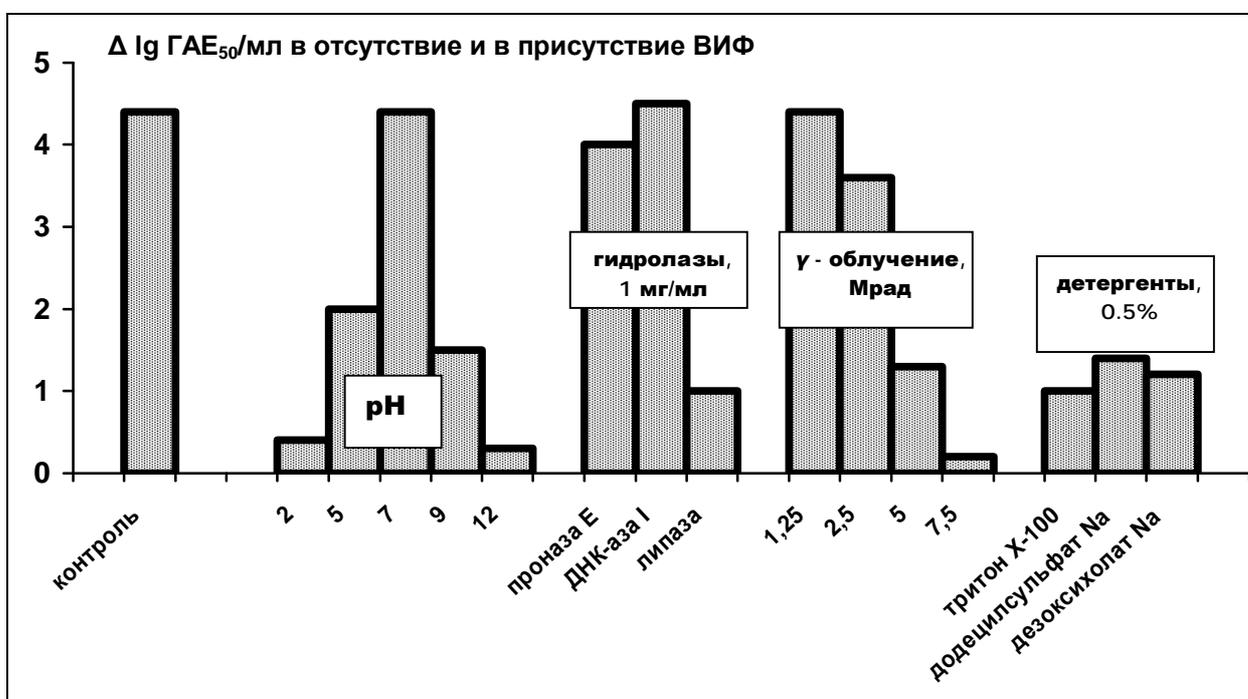
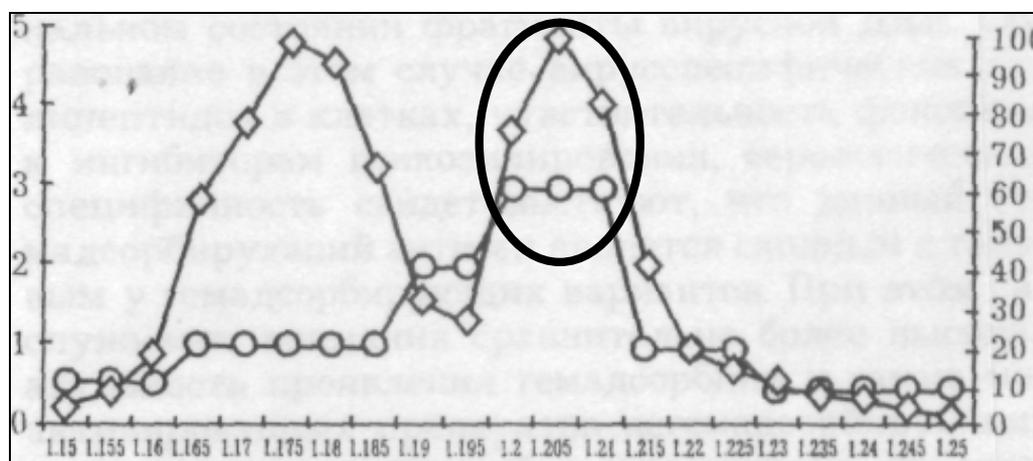


Рисунок 3. Влияние физико-химических факторов на интерферирующую активность ВИФ (шт. ФК-135, разведение 1:80).

Эксперименты по определению плавучей плотности ВИФ из штамма ФК-135 показали иные результаты. Первичный концентрат вируса центрифугировали в линейном градиенте плотности сахарозы 30-60% в течение 15 часов при 60000 g, собирали фракции от 1.08 до 1.25 г/см<sup>3</sup>, содержимое фракций переосаждали при 60000 g в течение часа и ресуспендировали в ФБР. Оказалось, что плотность стандартного вируса АЧС составляла 1.17-1.18 г/см<sup>3</sup>. Активность же ВИФ концентрируется в зоне с плавучей плотностью 1.20-1.21 г/см<sup>3</sup> и совпадает со вторым максимумом радиоактивности маркированного <sup>3</sup>Н-тимидином вируса АЧС после его изопикнического центрифугирования в линейном градиенте плотности сахарозы (рисунок 4, в круге).



**Рисунок 4.** Распределение маркированного <sup>3</sup>Н-тимидином стандартного вируса АЧС и ВИФ (шт. Ф-32) после равновесного ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы. По оси абсцисс - плавучая плотность, г/см<sup>3</sup>; по оси ординат справа – радиоактивность, имп/мин × 10<sup>3</sup> (♦); слева - разность в урожае инфекционного вируса в отсутствие и в присутствии ВИФ, Δ lg ГАЕ<sub>50</sub>/мл (○).

Сравнение состава содержимого фракций с плавучей плотностью 1.17-1.18 г/см<sup>3</sup> (стандартный вирус) и 1.20-1.21 г/см<sup>3</sup> (ВИФ) методом электронной микроскопии не выявило различий в морфологии вирусных частиц. При разнице по инфекционности в 70-100 раз число вирионов во фракции стандартного вируса (с плавучей плотностью 1.17-1.18 г/см<sup>3</sup>) превышало число вирусных частиц во фракции (1.20-1.21 г/см<sup>3</sup>) всего в 4-5 раз. Показательным аргументом в пользу вирионной структуры ВИФ стали данные по определению активности ДНК-зависимой РНК-полимеразы [по 6]. Оказалось, что удельная активность фермента, рассчитанная на

концентрацию белка, во фракции ВИФ была практически равна таковой для стандартного вируса. Однако удельная активность фермента в пересчете на инфекционность у ВИФ значительно превосходила таковую стандартного вируса (таблица).

**Таблица.**  
**Активность ДНК-зависимой РНК-полимеразы**  
**в препаратах ВИФ и стандартного вируса АЧС.**

<b>Удельная активность фермента</b>	<b>ВИФ</b>	<b>Стандартный вирус</b>	<b>ВИФ / стандартный вирус</b>
<b><u>имп / мин</u> мг белка</b>	<b>2149</b>	<b>2668</b>	<b>0.8</b>
<b><u>имп / мин</u> мг x ГАЕ<sub>50</sub></b>	<b>8759</b>	<b>178</b>	<b>49.2</b>

Таким образом, на основании экспериментов установлено, что ВИФ вируса АЧС по своим биологическим и физико-химическим свойствам соответствует его ДИ-частицам, представляет собой их фракцию и отражает физико-химический полиморфизм вирусной популяции.

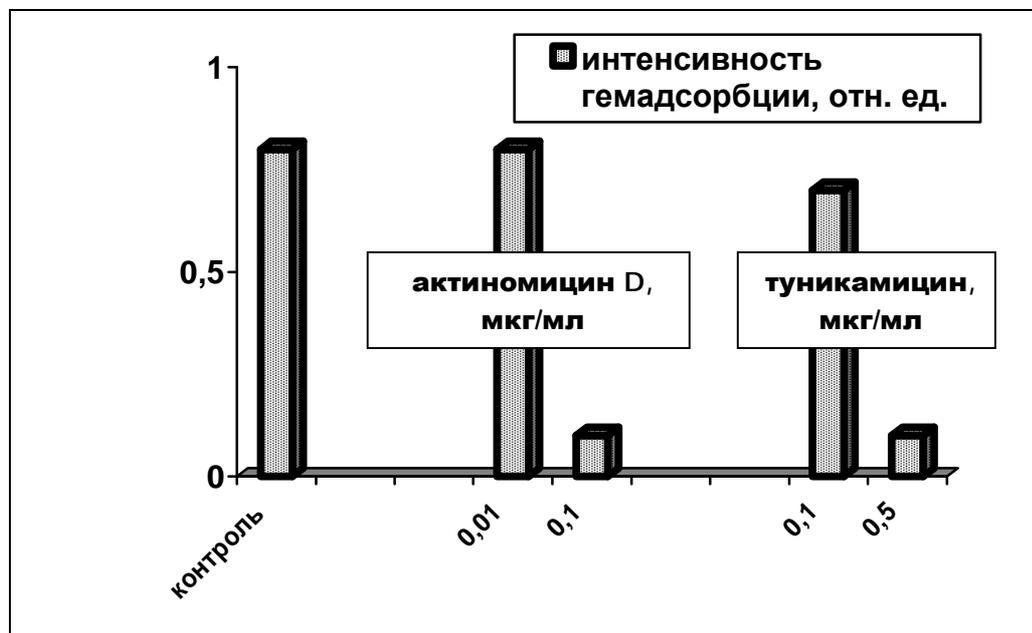
### **Гемадсорбция гамма-инактивированного вируса АЧС.**

Отмечено, что в культуре КМС под действием ВИФ на первые-третьи сутки всегда наблюдается еще одно проявление его биологической активности - развитие атипичной («рыхлой») гемадсорбции, интенсивность которой оценивается по отношению количества клеток с сорбированными эритроцитами к общему их количеству. Этот феномен обозначен как *гемадсорбция гамма-инактивированного вируса (ГА-γ-ИВ)*. Поскольку ГА-γ-ИВ по своим качественным проявлениям имеет высокий индекс корреляции (0.8-1.0) с интерферирующей активностью ВИФ, представлялось важным выяснить природу и механизм этого феномена.

Для сравнения способности ДИ-частиц и стандартного вируса вызывать гемадсорбцию после гамма-облучения были приготовлены препараты из вируса АЧС (штамм ФК-135) с плавучей плотностью в градиенте сахарозы 1.20-1.21 и 1.17-1.18

г/см<sup>3</sup>, соответственно. Оказалось, что при сходной концентрации белка в препаратах ДИ-частиц и стандартного вируса и титрах инфекционности до облучения 7.0 и 8.7 lg ГАЕ<sub>50</sub>/мл, соответственно, способность вызывать ГА-γ-ИВ по результатам оценки ее интенсивности при двукратных разведениях у ВИФ была в 8-16 раз выше.

Чтобы установить обусловленность ГА-γ-ИВ функционированием генома вируса АЧС, а не типичной для оболочечных вирусов антигенной модуляции клеточной мембраны "извне" при внесении в культуру клеток инактивированных вирионов, проведен ингибиторный анализ и изучена динамика процесса [5]. Препараты ДИ-частиц из штамма К-105 в разведении 1:640 вносились в культуру клеток КМС через сутки после внесения ингибиторов трансляции актиномицина D и гликозилирования туникамицина. Результаты, полученные на третьи-шестые сутки, свидетельствуют, что для развития ГА-γ-ИВ необходимы процессы трансляции вирусспецифических белков и их модификации, включая гликозилирование (рисунок 5).



**Рисунок 5.** Влияние ингибиторов молекулярного синтеза на индукцию гемадсорбции гамма-инактивированного вируса АЧС, шт. К-149 в культуре КМС.

Очевидно, что развитие *ГА-γ-ИБ*, наблюдаемое после внесения препаратов ДИ-частиц вируса АЧС в культуру клеток КМС, обусловлено ограниченным функционированием фрагментов вирусного генома.

Изучение динамики развития *ГА-γ-ИБ* показало, что в течение первых суток она обнаруживается в разведениях 1:1280-1:2560, а на вторые-третьи сутки - до 1:10240 с возрастающей интенсивностью. На пятые-шестые сутки интенсивность гемадсорбции существенно снижалась. Дополнительно методом иммунофлюоресценции была изучена динамика синтеза вирусспецифических антигенов в обработанных препаратами ДИ-частиц клетках КМС, которые каждые сутки фиксировали в спирте-эфире (1:1) и инкубировали с мечеными ФИТЦ глобулинами из антисывороток к вирусу АЧС. Уже через сутки наблюдали диффузную слабую флюоресценцию цитоплазмы, через двое суток формировались округлые, ярко светящиеся скопления антигенов, которые на третьи сутки образовывали крупные гомогенные агрегаты.

В А-клетках КМС через трое суток после обработки ДИ-частицами обнаружили вирусспецифические антигены с титром в иммуноэлектроосмофорезе от цельного до 1:2. В этих же клетках методом иммуноблотинга с использованием антисыворотки к вирусу АЧС выявлено наличие 16 вирусспецифических полипептидов с м.м. от 14 до 78 кДа. Отсутствие высокомолекулярных полипептидов указывает на сохранение после гамма-облучения функционально активными лишь низкомолекулярных фрагментов вирусного генома.

Кроме гемадсорбирующих в нормальных условиях штаммов вируса АЧС «Киравира-67», ФК-135, «Катанга», К-105 для получения препаратов ДИ-частиц использованы и негемадсорбирующие штаммы и варианты К-149, К-170, К-190, ФНГ. Сравнительное титрование интенсивности *ГА-γ-ИБ* позволило установить парадоксальный факт - полученные из негемадсорбирующих штаммов и вариантов препараты ДИ-частиц превосходили по своей способности индуцировать *ГА-γ-ИБ*, аналогично полученные из гемадсорбирующих.

Обнаружение антигенов вируса АЧС в клетках КМС с помощью МФА побудило изучить возможность постановки реакции задержки *ГА-γ-ИБ* в различных вариантах. В опытах использовали препараты ДИ-частиц из вируса АЧС штаммов Л-57,

«Катанга», К-110, К-149, ФК-135 и антисыворотки, задерживающие гемадсорбцию вируса, 1, 2 и 4 серотипов, с титрами в РЗГА 1:160-1:640 [1]. Реакцию ставили в двух модификациях:

§ цельную антисыворотку вносили в культуру КМС и через два часа инкубации при 37°C добавляли ДИ-частицы в двукратных разведениях. Учет реакции проводили через двое суток;

§ культуру КМС обрабатывали ДИ-частицами в двукратных разведениях, в течение трех суток наблюдали за развитием гемадсорбции, отбирали положительные культуры с наибольшим разведением ДИ-частиц и вносили в нее цельную антисыворотку. Учет реакции проводили через 30-60 минут.

Опыты показали, что гомологичные по серотипу антисыворотки снижали интенсивность, а в ряде случаев полностью задерживали (первый вариант) или отменяли (второй вариант) *ГА-γ-ИВ*. Гетерологичные по серотипу антисыворотки таким свойством не обладали.

Таким образом, достоверное установление физико-химического полиморфизма популяций вируса АЧС, свойств и природы ВИФ как субпопуляции дефектных интерферирующих частиц, играющих важную роль в вирулентности и гемадсорбирующей способности штаммов, важно в контексте определения механизмов патогенности при данной инфекции. Принципиально важным является обнаружение способности вызывать гемадсорбцию у «негемадсорбирующих» изолятов и вариантов вируса АЧС при их инокуляции в культуру в виде гамма-инактивированного вируса. Механизм этого явления окончательно неясен, хотя, как установлено для ДИ-частиц, доза облучения в 2.5 Мрад сохраняет в функциональном состоянии фрагменты вирусной ДНК. Образование в этом случае вирусспецифических полипептидов в клетках, чувствительность феномена к ингибиторам гликозилирования, серологическая специфичность свидетельствуют, что данный гемадсорбирующий антиген является сходным с таковым у гемадсорбирующих вариантов. При этом заслуживает внимания сравнительно более высокая активность проявления гемадсорбции у гамма-инактивированных препаратов негемадсорбирующих вариантов с тенденцией к увеличению по мере пассирования в культуре клеток, снижения вирулентности и утраты гемадсорбирующей способности на примере пассажных культуральных вариантов штамма «Катанга» (от К-105 до К-190).

## Литература.

1. Вишняков И.Ф., Митин Н.И., Курносов А.Н. и др. Диагностика вируса африканской чумы свиней. I. Реакция гемадсорбции и задержки гемадсорбции при АЧС// Вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и эпизоотологии. Покров, 1992, Ч. 1.
2. Канторович-Прокудина Е.Н., Семенова Н.П. Дефектные интерферирующие вирусные частицы //Успехи современной биологии, 1982, т. 93, № 3.
3. Blumberg M., Kolakofsky D. An analytical review of defective infections of vesicular stomatitis virus // J. Gen. Virol., 1983, v. 64, № 9.
4. Huang A.S., Wu Ti-yun, Yilma T. et al. Characterization of virulent isolates of vesicular stomatitis virus in relation to interference by defective particles // Microbiol. Pathol., 1986, v. 1, № 2.
5. Kaluza G., Scholtissek C., Rott R. Inhibition of the multiplication of enveloped RNA-viruses by glucosamine and 2-deoxy-D-glucose // J. Gen. Virol., 1972, v. 14, № 1.
6. Migliaccio G., Castagnola P., Leone A. et al. mRNA activity of a Sindbis virus defective-interfering RNA // J. Virol., 1985, v. 55, № 3.
7. Schroder C.H., Furst B., Weise K. et al. A study of interfering herpes simplex virus DNA preparations containing defective genomes of either class I or II and the identification of minimal requirements for interference // J. Gen. Virol., 1984, 65, № 3.

# **ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ ВИРУСНЫХ КОМПОНЕНТОВ\***

Среди прочих компонентов вирусные гликопротеины (ГП) в практическом аспекте наиболее интересны и важны. В связи с биохимическими особенностями строения и репродукции биомолекулы именно этого класса экспонированы на поверхности всех оболочечных вирусов и мембран зараженных клеток, определяют иммунологические реакции и серотиповую специфичность, ответственны за адсорбцию, слияние вирусных и клеточных мембран и т.п. (прототипом в этом смысле служат гемагглютинины орто- и парамиксовирусов) [1, 6]. При исследовании роли ГП в биологии вирусов возможны два принципиальных подхода - препаративное получение или ингибиторный анализ. Если первый позволяет в основном изучать структурные характеристики биомолекул в их связи с определенными свойствами, второй в наиболее полной степени дает представление о функциональной роли ГП и деталях процесса гликозилирования [9].

Целью настоящей работы является исследование роли гликозилирования в процессе вирусной репродукции на модели вируса африканской чумы свиней (АЧС) с помощью наиболее употребляемых метаболических ингибиторов различного механизма действия [туникамицин, 2-дезоксид-*D*-глюкоза (2-ДДГ), моненсин] и веществ, так или иначе влияющих на специфические реакции с участием ГП (гликозидазы, конкурирующие моносахара).

---

\* опубликовано в журнале «Вопросы вирусологии», 1992, 5-6, 267-270  
совместно с А.Д.Середой, А.А.Пиря и М.С.Малаховой.

Вирус АЧС структурно организован подобно представителям семейства *Iridoviridae*, имеет липидную суперкапсидную оболочку. Он обладает рядом интересных биологических свойств, которые могут потенциально определяться его ГП: высоковариабелен по вирулентности, индуцирует генетически контролируемую (штаммо- и сероспецифическую) гемадсорбцию, экзоцитируется почкованием через плазматическую мембрану, вирусные антигены в мембранах зараженных клеток служат мишенями для эффекторов протективного иммунитета [3, 8, 12]. В предыдущих работах нами изучено влияние вышеуказанных ингибиторов на чувствительную к нему клеточную систему А-клеток костного мозга свиньи (КМС), определены нецитотоксические концентрации, установлен состав вирусиндуцированных ГП [2, 5].

### **Материалы и методы.**

Исходные данные о вирусе АЧС приведены в таблице 1. Штаммы и варианты отобраны и сгруппированы по общности происхождения и контрастности основных биологических свойств, группы составляют природные изоляты с их лабораторными модифицированными производными. Для репродукции и титрования вируса использована прилипающая фракция клеток КМС после их трехсуточной адгезии (А-клетки КМС), накопление вируса определяли через 3-4 суток после заражения по гемадсорбирующей или цитолитической способности и выражали в ГАЕ<sub>50</sub>/мл или ТЦД<sub>50</sub>/мл [7]. Общие принципы ингибиторного анализа гликозилирования вирусных компонентов основаны на публикации [9] с применением ингибиторов туникамицина, 2-ДДГ, моненсина, экзогликозидаз нейраминидазы,  $\beta$ -галактозидазы,  $\beta$ -гликозидазы,  $\alpha$ -маннозидазы, моносахаров для специфической конкуренции *L*-фукозы, *D*-галактозы,  $\alpha$ -метилманнопиранозиды, *N*-ацетилглюкозамина (все препараты фирмы «Sigma», США).

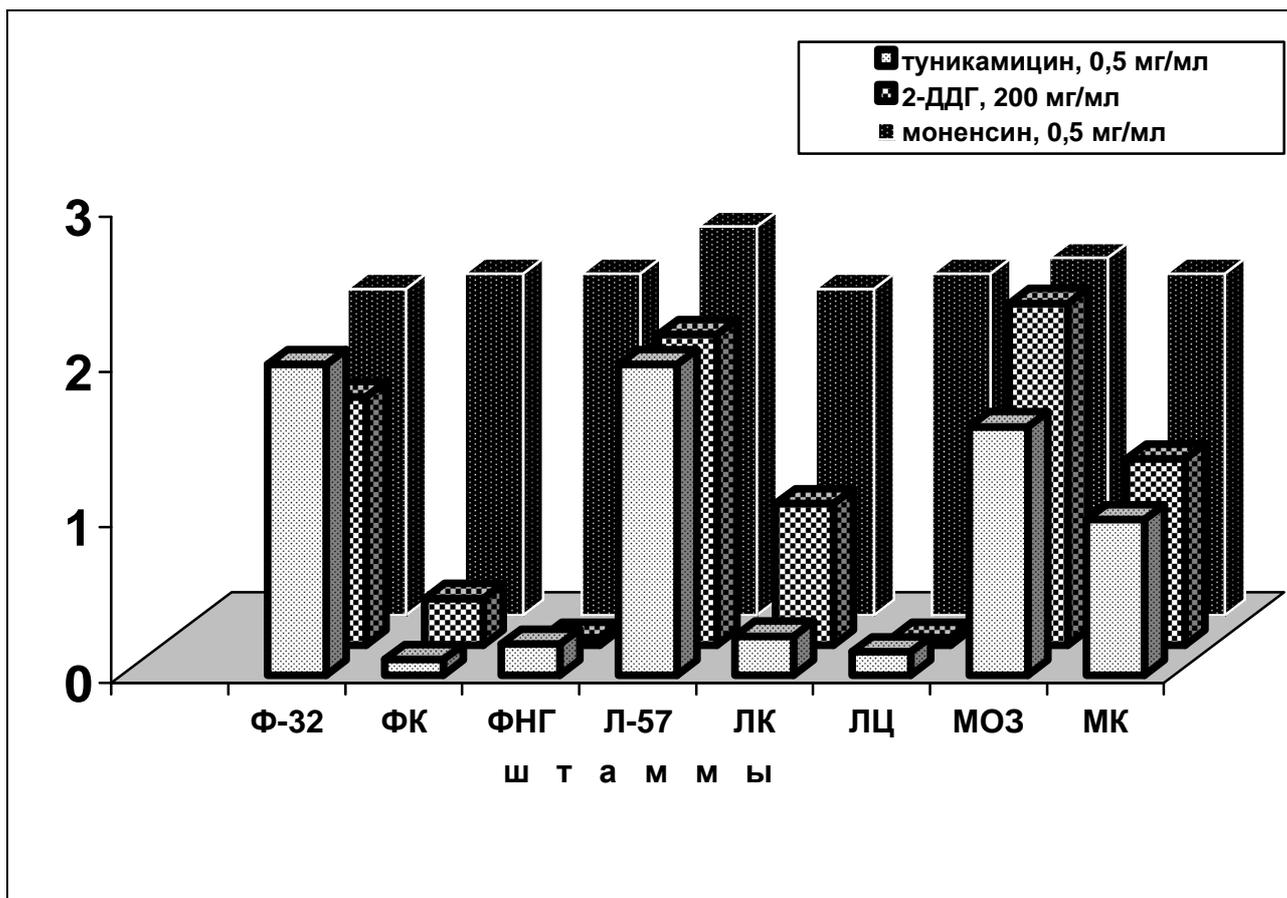
Электронномикроскопическое изучение культуры КМС проводили по описанной ранее стандартной методике [2]. В опытах по оценке экзоцитоза применяли метод количественной электронной микроскопии с подсчетом вирионов на 50 произвольно выбранных серийных срезах каждой пробы. Активность цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) иммунизированных против АЧС подсвинков оценивали в системе

аутогенных А-клеток культуры лейкоцитов крови, зараженных в качестве мишеней гомологичным по группе вирусом, по специфическому цитолизу - выходу  $^{14}\text{C}$ -ацетата натрия (ВО «Изотоп») [4]. Полученные результаты статистически обрабатывали по методу Стьюдента с оценкой достоверности различий.

### **Результаты и обсуждение.**

Как видно из данных рисунка 1, репродукция вируса АЧС чувствительна к ингибиторам гликозилирования в нецитотидных концентрациях. Накопление природных изолятов Ф-32, Л-57, МОЗ снижалось под их влиянием в 29-630 раз. Сопоставление чувствительности вируса АЧС к ингибиторам гликозилирования с основными биологическими свойствами дано в таблице 1, где показана обнаруженная корреляция ряда этих параметров. В частности, моненсин подавлял репродукцию всех использованных штаммов и вариантов вируса. Однако к туникамицину и 2-ДДГ сравнительную устойчивость проявляли авирулентные, индуцирующие рыхлую гемадсорбцию или негемадсорбирующие лабораторные модифицированные варианты I и II групп - ФК, ФНГ, ЛК, ЛЦ (разность титров порядка 0.10-0.91 lg ГАЕ<sub>50</sub>/мл или ТЦД<sub>50</sub>/мл, выделено в таблице 1).

Электронно-микроскопическое изучение морфогенеза и морфологии частиц вируса АЧС в А-клетках КМС, интактных или обработанных ингибиторами в избранных концентрациях, не выявило их заметного влияния; сроки появления вирусных матриксов, их структура, начало и особенности почкования были аналогичны таковым в контроле. Однако в присутствии ингибиторов отмечена выраженная ассоциация почкующихся вирионов не только с плазмалеммой, но и в преобладающей степени с мембранами вакуолей аппарата Гольджи. Данные о количественных особенностях процесса представлены в таблице 2 и на рисунке 2. Моненсин, ингибирующий инфекционность штамма ФК вируса АЧС, в значительной степени подавлял экзоцитоз вирионов (более чем в 6 раз). Аналогичным, хотя и менее выраженным эффектом обладают туникамицин и 2-ДДГ, к которым репродукция варианта ФК сравнительно устойчива.



**Рисунок 1.** Влияние различных ингибиторов гликозилирования на накопление штаммов и вариантов вируса АЧС в культуре А-клеток КМС по разнице в титре ( $\Delta \lg$  ГАЕ<sub>50</sub>/мл или ТЦД<sub>50</sub>/мл).  $M = 10^{-5}$  ГАЕ<sub>50</sub>/клетка или ТЦД<sub>50</sub>/клетка,  $p > 0.05$ . Цифры по вертикали –  $\lg$  ГАЕ<sub>50</sub>/мл или ТЦД<sub>50</sub>/мл.

Для определения роли углеводных компонентов в гемадсорбции, индуцированной вирусом АЧС, инфицированную культуру А-клеток КМС предварительно обрабатывали растворами различных экзогликозидаз или добавляли растворы моносахаров в поддерживающей среде, после чего проводили реакцию гемадсорбции по [7]. Данные таблицы 3 свидетельствуют, что предобработка  $\alpha$ -маннозидазой или присутствие  $\alpha$ -метилманнопиранозида подавляют развитие гемадсорбции в течение 3 часов наблюдения (выделено в таблице).

**Таблица 1.**  
**Сравнительная характеристика штаммов и вариантов вируса АЧС.**

Исходные данные					Чувствительность к ингибиторам гликозилирования		
Группа	Наименование	Происхождение*	Вирулентность**	Гемадсорбирующая способность***	Туникамцин	2-ДДГ	Монесин
I	Ф-32	ПР-ЕВР-64	У	ПТ	+	+	+
	ФК	ЛАБ	А	РА	-	-	+
	ФНГ	ЛАБ	У	НГ	-	-	+
II	Л-57	ПР-ЕВР-57	В	ПТ	+	+	+
	ЛК-57	ЛАБ	А	РА	-	-	+
	ЛЦ	ЛАБ	У	НГ	-	-	+
III	МОЗ	ПР-АФР-64	В	ПТ	+	+	+
	МК	ЛАБ	А	ПТ	+	+	+

\* ПР-ЕВР-64 и ПР-ЕВР-57 - природные изоляты, выделенные в Европе соответственно в 1964 и 1957 гг., ПР-АФР-64 - природный изолят, выделенный в Африке в 1964 г., ЛАБ - лабораторный модифицированный вариант.

\*\* У - умеренно вирулентный, А - авирулентный.

\*\*\* ПТ - индукция плотной типичной гемадсорбции, РА - преобладание субпопуляций, индуцирующих рыхлую атипичную гемадсорбцию [3], НГ - негемадсорбирующие варианты.

Результаты сравнительного изучения роли гликозилирования в реакции индуцированных вирусом АЧС мембранных антигенов зараженных клеток с эффекторами противоклеточного иммунитета, т.е. в иммунологическом узнавании, приведены на рисунке 3. Оказалось, что ингибция гликозилирования в обработанных туникамицином клетках-мишенях не сопровождается снижением уровня их специфического лизиса и даже в определенной мере увеличивает его (в целом в 2.5 раза).

**Таблица 2.**  
**Экзоцитоз вируса АЧС в присутствии ингибиторов**  
**гликозилирования с различным механизмом действия\*.**

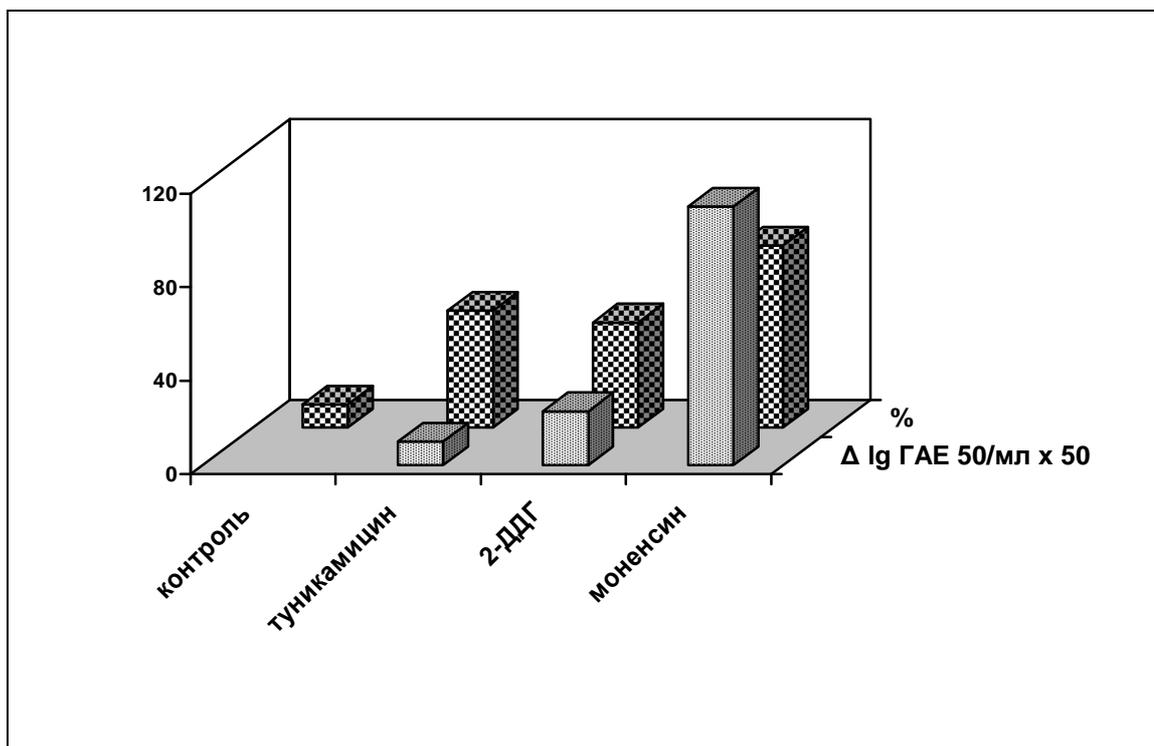
Ингибиторы			Количественная характеристика экзоцитоза			
			$\Delta Ig$ ГАЕ <sub>50</sub> /мл**	Число вирионов, связанных:		Соотношение
Наименование	Механизм действия	Концентрация, мкг / мл		с мембранами аппарата Гольджи***	с плазмалеммой	
Туникамицин	Блок белок-углеводной связи	0.5	0.2±0.2	184/50	181/50	1:1
2-ДДГ	Синтез нефункциональной углеводной цепи	200	0.46±0.2	33/45	40/55	0.82:1
Моненсин	Блок транспорта ГП	0.5	2.21±0.5	273/78	75/22	3.6:1
Без ингибитора				43/13	281/87	0.15:1

\* А-клетки КМС, штамм ФК, М = 0.1 ГАЕ<sub>50</sub>/клетка.

\*\* подавление урожая вируса в присутствии ингибиторов (разность титров).

\*\*\* в числителе - число вирионов, в знаменателе - % от общего числа.

Таким образом, с помощью ингибиторного анализа показано, что ГП действительно определяют три из четырех основных функциональных параметров биологии вируса АЧС, указанных в начале статьи: вирулентность и вариабельность по этому признаку, внутриклеточный транспорт и экзоцитоз, а также гемадсорбцию, но не иммунологическое узнавание. Установленный факт чувствительности репродукции вируса АЧС к трем ингибиторам гликозилирования с различным механизмом действия прямо указывает на важную роль посттрансляционной модификации этого типа и образования ГП в его инфекционности. Подобный вывод подтверждается данными литературы [11].



**Рисунок 2.** Относительное количество вирионов, связанных с мембранами аппарата Гольджи (%), и подавление урожая вируса АЧС ( $\Delta \lg \text{ГАЕ}_{50}/\text{мл} \times 50$ ) в присутствии туникамицина, 2-ДДГ и моненсина. Данные комасштабированы.

С помощью ингибиторного анализа «промаркированы» детали стадийного развития вируса и такие относящиеся к гликозилированию биосинтетические и физиологические процессы, как присоединение углеводов к вирусным полипептидам с образованием *N*-гликозидной связи (туникамицин), транспорт вирусных ГП между цис- и трансотделами аппарата Гольджи (моненсин), транспорт вирусных ГП и формирующихся вирионов в процессе созревания и экзоцитоза (все использованные ингибиторы). Сравнительная устойчивость к ингибиторам гликозилирования, а точнее меньшая зависимость от стадий, определяемых гликозилированием, у вирусных вариантов, дефектных в отношении гемадсорбции, подтверждает факт генетического контроля экспрессии мембранного (гемадсорбирующего) антигена вируса АЧС [3] и дает представление о его механизмах. В близкой по смыслу работе с вирусом ядерного полиэдроза была показана аналогичная связь чувствительности к туникамицину со штаммоспецифическими особенностями внутриклеточного морфогенеза, транспорта и экзоцитоза вирионов [10].

**Таблица 3.**  
**Влияние различных экзогликозидаз и моносахаров на гемадсорбцию, индуцируемую вирусом АЧС\*.**

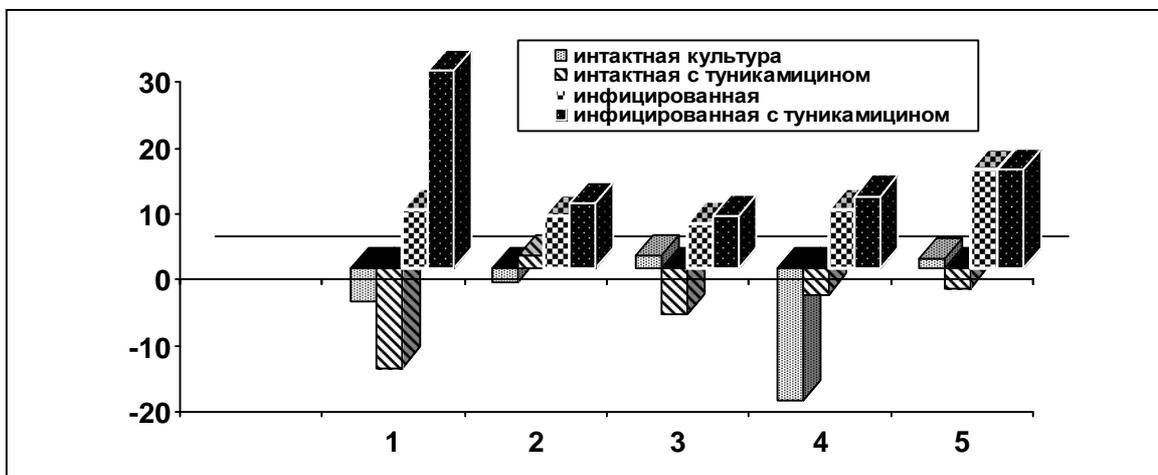
Экзогликолидазы**, моносахара***	Концентрация	Наличие гемадсорбции через:		
		1 час	2 часа	3 часа
Нейраминидаза	10.0 ед/мл	+	+	+
$\beta$ -галактозидаза	150.0 ед/мл	-	+	+
$\beta$ -гликозидаза	50.0 ед/мл	+	+	+
$\alpha$ -маннозидаза	8.5 ед/мл	+	-	-
<i>D</i> -глюкоза	1.25 %	+	+	+
	2.50 %	+	+	+
	5.00 %	+	+	+
<i>L</i> -фукоза	1.25 %	+	+	+
	2.50 %	+	+	+
	5.00 %	+	+	+
<i>D</i> -галактоза	1.25 %	+	+	+
	2.50 %	-	+	+
	5.00 %	-	+	+
$\alpha$ -метилманно- пиранозид	1.25 %	-	+	+
	2.50 %	-	+	+
	5.00 %	-	-	-
<i>N</i> -ацетил- глюкозамин	1.25 %	+	+	+
	2.50 %	+	+	+
	5.00 %	+	+	+

\* А-клетки КМС, штамм Ф-32, М=1 ГАЕ<sub>50</sub>/клетка, 18 часов после инфицирования.

\*\* предобработка зараженной культуры в течение 1 часа, удаление, промывка, реакция гемадсорбции.

\*\*\* реакция гемадсорбции в присутствии конкурирующих моносахаров.

Тот факт, что ингибция гликозилирования сопровождается выраженной ассоциацией части вируса АЧС с мембранами аппарата Гольджи и их склонностью к почкованию через внутриклеточные мембраны, свидетельствует о нарушении транспорта и экзоцитоза вирионов при обычном морфогенезе, а также о зависимости их от вирусных ГП, и служит иллюстрацией механизма действия избранных ингибиторов. Остается неясным значение этого блока в инфекционности, учитывая разную чувствительность репродукции варианта ФК к моненсину или туникамицину и 2-ДДГ.



**Рисунок 3.** Индивидуальные показатели активности ЦТЛ пяти иммунных к АЧС подсвинков (номера по горизонтали) в культуре интактной и инфицированной в зависимости от присутствия туникамицина в концентрации 0.5 мкг/мл. Подсвинки иммунизированы вариантом ФК в дозе  $10^8$  ГАЕ<sub>50</sub>, ЦТЛ получены через 6 суток после иммунизации, клетки-мишени заражены вирусом АЧС, штамм Ф-32 с М = 1 ГАЕ<sub>50</sub>/клетка, использованы через 18 часов после заражения, соотношение ЦТЛ : мишень 20:1-100:1. Цифры по вертикали слева - % специфического лизиса клеток-мишеней.

При изучении вирусиндуцированной гемадсорбции оказались полезными приемы из биоаффинной хроматографии углеводов - разрушение лиганда (экзогликозидазы) и конкуренция с образованием связи *рецептор + лиганд* (моносахара). Полученные данные указывают на очевидную роль в реакции *эритроцитарный рецептор + мембранный антиген вируса АЧС* углеводных компонентов последнего, его гликопротеиновую природу по аналогии со всеми подобными феноменами в вирусологии (включая гемагглютинацию как прототип). Судя по специфичности подавления реакции гемадсорбции (выделено в таблице 3), мембранный ГП вируса АЧС может быть отнесен к высокоманнозному типу [1].

Отсутствие значения гликозилирования вирусных компонентов в иммунологическом узнавании, т.е. сохранение активности специфических ЦТЛ в отношении зараженных вирусом АЧС клеток в присутствии туникамицина, указывает на экспрессию в мембранах зараженных клеток иммунологически реактивных негликозилированных антигенов.

### **Литература.**

1. Деревицкая В.А. // Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 5, С.581-615.
2. Ефимова А.А., Малахова М.С., Серeda А.Д. и др. // Докл. Всесоюзн. акад. с.-х. наук, 1989, № 7, С.38-40.
3. Макаров В.В., Вишняков И.Ф., Власов Н.А. и др. // Вопр. вирусол., 1991, № 4, С. 48-51.
4. Методические рекомендации по изучению клеточного иммунитета у свиней при вирусных инфекциях. Покров, 1988.
5. Серeda А.Д., Макаров В.В. // Ветеринария, 1992, № 1, С. 22-25.
6. Хьюз Р. Гликопротеины. М., 1985.
7. Malmquist W., Hay D. // Bull. Off. Int. Epiz., 1961, v. 55, № 1-2, P. 176-184.
8. Mebus Ch. // Advanc. Virus Res., 1988, v. 35, P. 251-269.
9. Schwarz R., Datema R. // Advanc. Carbohydr. Chem. Biochem., 1982, v. 40, P. 287-389.
10. Stiles B., Wood H., Hughes P. // J. Invertebr. Path., 1983, v. 41, № 3, P. 405-408.
11. Val M., del, Vinuela E. // Virus Res., 1987, v. 7, P. 299-308.
12. Wardley R., Norley S., Martin C. et al. // Progr. Med. Virol., 1987, v. 34, P. 180-192.

## **ГЛИКОПРОТЕИНЫ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ\***

Возбудитель африканской чумы свиней (АЧС) - ДНК-содержащий арбовирус, поражает только представителей семейства *Suidae*. Изоляты вируса, выделенные в различных регионах мира или в течение хронологически разнящихся эпизоотий, значительно различаются по вирулентности, способности индуцировать гемадсорбцию при размножении в культурах клеток костного мозга свиней (КМС) или лейкоцитов свиней (ЛС). Антигенная вариабельность изолятов вируса АЧС продемонстрирована в иммунологических пробах на чувствительных животных, в реакциях задержки гемадсорбции (РЗГА), комплементзависимого цитолиза, по взаимодействию с набором моноклональных антител. Выжившие после переболевания животные становятся устойчивыми к заражению гомологичным изолятом, но не защищены от гибели после инфицирования гетерологичными изолятами [8, 9, 11, 12, 17, 18].

Иммунологические исследования показали, что при АЧС решающую роль в защите от гибели играют эффекторные механизмы, направленные на элиминацию зараженных клеток, такие, как лизис цитотоксическими Т-лимфоцитами (ЦТЛ) и антителозависимая цитотоксичность [6, 13]. Неспособность антител от переболевших животных к нейтрализации вируса АЧС в тривиальной постановке реакции затрудняет обнаружение его протективных белков. Общеизвестно, что среди вирусных антигенов в практическом аспекте наибольший интерес представляют мембранные белки зараженных клеток и в первую очередь гликопротеины.

---

\*Опубликовано в журнале «Вопросы вирусологии», 1994, 6, 278-281 совместно с А.Д. Середой, и Е.Г.Анохиной.

Изучение гликопротеинов вируса АЧС началось с анализа состава оболочечных белков вирионов, когда по результатам радиомаркирования <sup>3</sup>H-глюкозамином были обнаружены три гликозилированных полипептида с м.м. 51, 56, 89 кД [14]. Затем Val и соавт. [15] установили в составе оболочек вирионов гликозилированные компоненты с м.м. 9, 95, 230 кД, причем два последних обуславливали агглютинацию очищенных вирионов лектинами. В инфицированных вирусом АЧС клетках *Vero* идентифицировано 19 гликозилированных компонентов, из которых по меньшей мере 5 - вирусиндуцированные гликополипептиды с м.м. 13, 33, 34, 38, 220 кД [16].

В настоящей работе обобщены результаты изучения гликопротеинов вируса АЧС, их антигенности, значения гликозилирования в вирусной репродукции, проведенных в лаборатории биохимии ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии в 1989-1992 гг.

### **Материалы и методы.**

*Вирус.* Характеристика изолятов и вариантов вируса АЧС, использованных в работе, приведена в таблице 1. Для репродукции и титрования вируса использовали прилипающую фракцию клеток (А-клеток) костного мозга свиней (КМС). Титр вируса определяли по гемадсорбирующей или цитолитической активности и выражали в ГАЕ<sub>50</sub>/мл или ЦПД<sub>50</sub>/мл [10].

*Сыворотки.* В иммунологических реакциях использовали 17 серий гипериммунных сывороток свиней с титром в реакции задержки гемадсорбции (РЗГА) 1: 80-1:320 [1].

Получение немаркированных и маркированных <sup>3</sup>H-глюкозамином или <sup>14</sup>C-ацетатом натрия лизатов зараженных вирусом АЧС А-клеток, иммуноблоттинг, радиоиммунопреципитацию, электрофоретическое разделение полипептидов, определение активности ЦТЛ осуществляли, как описано ранее [5-7]. Биоаффинные сорбенты готовили с использованием CNBr-активированной сефарозы 4В и лектинов из *Canavalia ensiformis*, *Triticum vulgare*, *Clicine max*, *Ricinus communis*, *Tetragonolobus purpureas* («Sigma», США).

Таблица 1.

Характеристика изолятов и вариантов вируса АЧС, использованных в работе.

Наименование	Обозначение	Происхождение, дата изоляции	Серотип *	Вирулентность	Тип гемадсорбции
«Лиссабон-57»	Л-57	Европейский изолят 1957 г.	1	Высоковирулентный	Плотная типичная
«Лиссабон культуральный- 111»	ЛК-111	111 пассаж вируса Л-57 в культуре клеток КМС	1	Авирулентный	Плотная типичная
«Лиссабон цитолитический»	ЛЦ	Селекционированный из Л-57	1	Авирулентный	Негемадсорбирующий
«Конго-73»	К-73	Западноафриканский изолят 1973 г.	2	Высоковирулентный	Плотная типичная
«Пэтит-Энге»	П-Э	Западноафриканский изолят 1978 г.	2	Умеренно вирулентный	Негемадсорбирующий
«Мозамбик»	МОЗ	Восточноафриканский изолят	3	Высоковирулентный	Плотная типичная
«Мозамбик культуральный»	МК	200 пассаж вируса МОЗ в культуре клеток КМС	3	Авирулентный	Плотная типичная
«Франция-32»	Ф-32	Европейский изолят 1964 г.	4	Умеренно вирулентный	Плотная типичная
«Франция культуральный»	ФК	135 пассаж вируса Ф-32 в культуре клеток КМС	4	Авирулентный	Рыхлая атипичная
«Франция-негемадсорбирующий»	ФНГ	Селекционированный из Ф-32	4	Умеренно вирулентный	Негемадсорбирующий

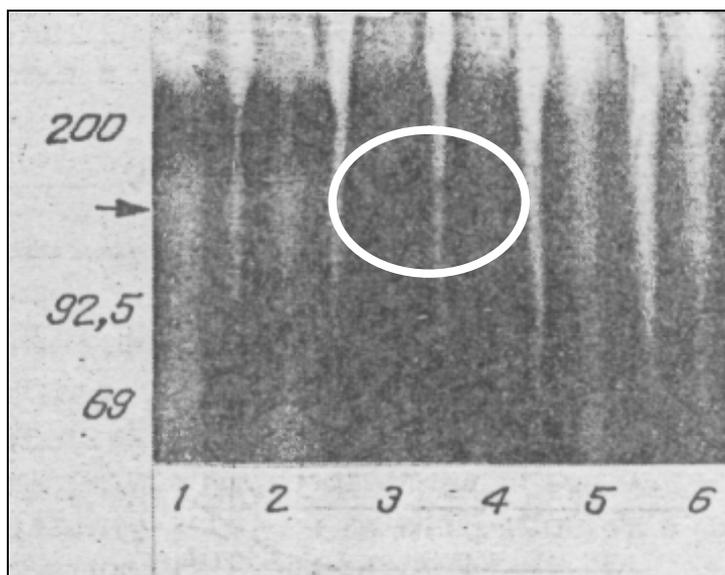
\* по данным И.Ф.Вишнякова и соавт. [1].

## Результаты и обсуждение.

Полипептидный состав гликопротеинов вируса АЧС в лизатах зараженных А-клеток КМС определяли методом биоаффинной хроматографии на сорбентах, где в качестве лигандов использовали лектины различной специфичности, с последующей идентификацией вирусспецифических полипептидов иммуноблоттингом, а также радиоиммунопреципитацией  $^3\text{H}$ -глюкозаминмеченных белков. В итоге были идентифицированы гликополипептиды с м.м. 14, 16, 19, 23, 25, 32, 34, 40-42, 54, 60, 69, 76, 110-140, 220 кД.

Установлено, что в состав олигосахаридов гликопротеинов вируса входят манноза, *N*-ацетил-*D*-глюкозамин, *N*-ацетил-*D*-галактозамин,  $\beta$ -*D*-галактоза,  $\alpha$ -*L*-фукоза. Было отмечено, что мажорный неструктурный гликополипептид с м.м. 110-140 кД (ГП 110-140) выявляется только методом радиоиммунопреципитации и лишь на треках гликополипептидов, полученных из А-клеток, инфицированных изолятами и вариантами, индуцирующими при репродукции плотную типичную гемадсорбцию (Л-57, ЛК-111, К-73, МОЗ, МК, Ф-32). В лизатах А-клеток, инфицированных негемадсорбирующими изолятами и вариантами (ЛЦ, П-Э, ФНГ) или вариантами, индуцирующими рыхлую атипичную гемадсорбцию, ГП 110-140 не выявляли. Типичная картина представлена на рисунке 1 (положение ГП 110-140 выделено кругом); в случаях использования в радиоиммунопреципитации неактивных в РЗГА антисывороток ГП 110-140 также не обнаруживали.

Принимая во внимание, что этот неструктурный гликополипептид выявляется только у гемадсорбирующих изолятов и активные в РЗГА антисыворотки используются при серотипировании изолятов вируса АЧС [1, 17], была изучена изолято(серотипо)специфичность ГП 110-140. В экспериментах использовали серологически различающиеся изоляты Л-57, МОЗ, Ф-32 и соответствующие им антисыворотки (см. таблицу 1). Установлено, что ГП 110-140 обнаруживался только в тех случаях, когда в радиоиммунопреципитации применяли гомологичные антисыворотку и лизат инфицированных А-клеток [5].



**Рисунок 1.** Радиоиммунопреципитация ГП 110-140 из лизатов А-клеток КМС, зараженных вирусом АЧС, изолят Ф-32 (треки 1-4) или вариант ФНГ (треки 5, 6) и меченных  $^3\text{H}$ -глюкозаминном. Используются неактивная (1, 2, 5, 6) и активная (3, 4) в РЗГА антисыворотки к Ф-32. Слева указаны местоположения маркеров молекулярной массы (в кД) и ГП 110-140 (стрелка и круг).

Мы рассматриваем эти данные как свидетельство, что именно указанный гликопротеин обуславливает явление гемадсорбции, впервые описанное Malmguist и Nau [10].

В практическом аспекте обнаружение ГП 110-140 позволило предложить количественный метод определения серологического родства гемадсорбирующих изолятов вируса АЧС. Он основан на сравнении радиоактивности сорбированных на твердой фазе ("зерна" протеин-А-сефарозы *CL-4B*) иммунных комплексов, полученных после взаимодействия частично очищенных ионообменной хроматографией  $^3\text{H}$ -глюкозаминмеченных белков лизатов инфицированных А-клеток КМС с антителами активных в РЗГА антисывороток к различным изолятам вируса АЧС [7]. По полученным абсолютным значениям радиоактивности проб определяли процент специфичности связывания по формуле:

$$P = \frac{A - N}{B - N} \times 100,$$

где  $P$  - процент специфичности связывания,  $A$  - средняя радиоактивность за минуту для пробы в реакциях с

гетерологичными компонентами, *B* - средняя радиоактивность за минуту для пробы в реакциях с гомологичными компонентами, *N* - средняя радиоактивность за минуту для пробы с нормальной сывороткой от интактного подсвинка.

В таблице 2 представлены результаты комиссионного шифрованного опыта по определению антигенного родства прототипных изолятов четырех серотипов.

**Таблица 2.**  
**Антигенное родство изолятов вируса АЧС (%)\***.

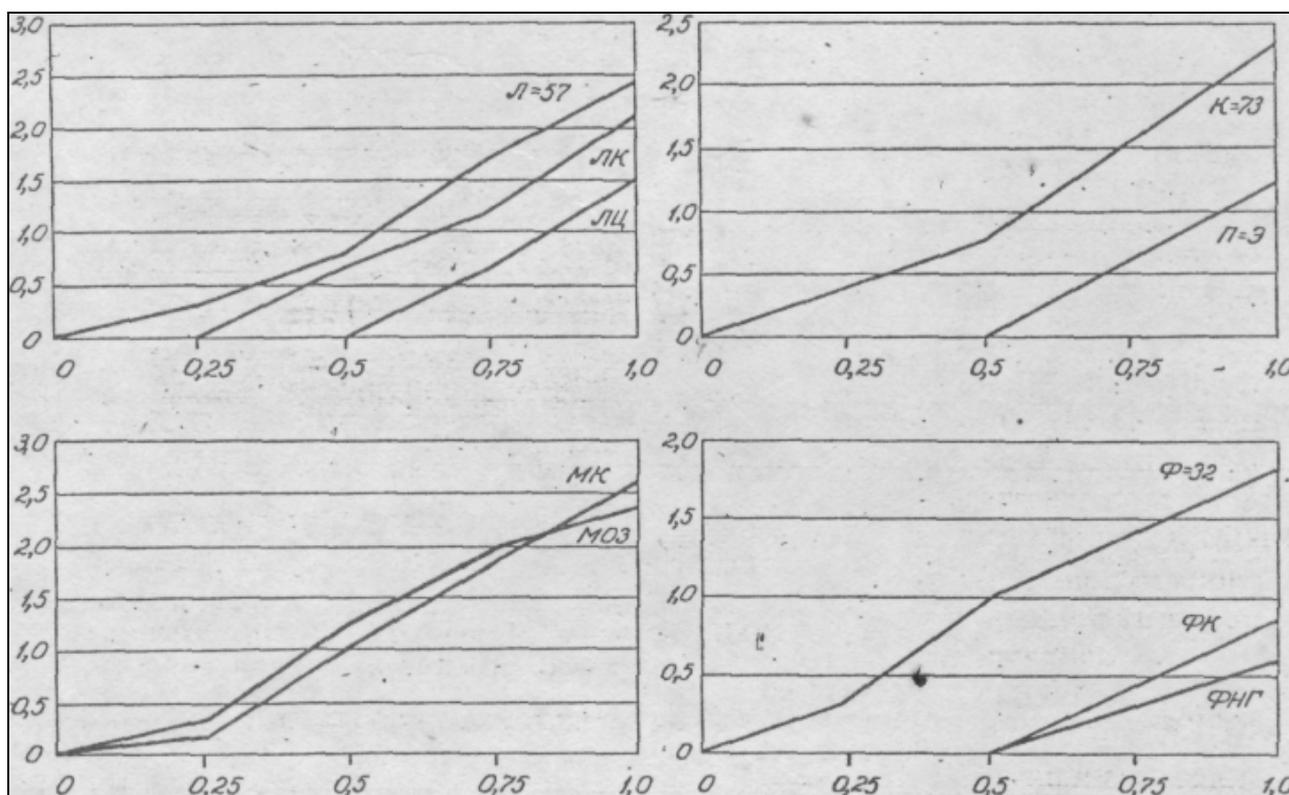
Антигены (серотип / изолят)	Антисыворотки (серотип / изолят)			
	I / Л-57	II / К-73	III / МОЗ	IV / Ф-32
I / Л-57	100	34.1 ±9.3	20.2±8.7	35.4±6.0
II / К-73	45.2±16.1	100	32.3±2.3	30.3±4.2
III / МОЗ	22.3±7.4	31.1±3.2	100	27.3±2.4
IV / Ф-32	26.1±2.3	27.3±7.2	27.3±5.0	100

\* приведены средние данные процента специфичности связывания по результатам 3-5 измерений.

Радиоактивность пробы с нормальной сывороткой обычно не превышала 3-5% от радиоактивности гомологичных проб. В большинстве проб с гетерологичными данному вирусу антисыворотками процент связывания был в пределах 20.2-35.4. Каких-либо особенностей в этом плане между европейскими (Л-57, Ф-32) и африканскими (К-73, МОЗ) изолятами не выявлено. В отличие от качественной серотипизации в РЗГА (по принципу "да/нет") [1] предложенный метод является количественным и открывает возможности определения антигенного родства изолятов вируса АЧС из различных регионов мира, а также выявления особенностей хронологической смены антигенов в процессе естественной эволюции вируса.

Далее было изучено влияние различных концентраций туникамицина на репродукцию различающихся по биологическим свойствам изолятов и вариантов вируса АЧС. Как и у подавляющего большинства оболочечных вирусов, репродукция вируса АЧС подавлялась туникамицином в нецитотидных

концентрациях [2]. Благодаря использованию широкого спектра изолятов и вариантов удалось установить различия между группами, сформированными по гемадсорбирующим свойствам безотносительно к серотиповой принадлежности. Ингибирование накопления в культуре клеток КМС вирулентных, умеренно вирулентных, авирулентных изолятов и вариантов вируса АЧС (Л-57, ЛК-111, К-73, МОЗ, МК, Ф-32), индуцирующих при репродукции плотную типичную гемадсорбцию, в присутствии 1 мкг/мл туникамицина было более выраженным, чем у умеренно вирулентных и авирулентных негемадсорбирующих изолятов и вариантов (ЛЦ, П-Э, ФНГ) и авирулентного, индуцирующего атипичную гемадсорбцию варианта ФК. Обобщенная картина феномена представлена на рисунке 2.



**Рисунок 2.** Влияние ингибитора гликозилирования туникамицина на репродукцию различающихся по основным свойствам изолятов и вариантов вируса АЧС (см. таблицу 1). По оси ординат - разность титров в отсутствии и присутствии туникамицина ( $\Delta \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$ ), по оси абсцисс - концентрация туникамицина (мкг/мл).

Ранее при электронно-микроскопическом изучении морфогенеза вируса АЧС в обработанных туникамицином А-клетках была отмечена выраженная ассоциация почкующихся вирионов не только с плазмалеммой, но и в преобладающей степени с мембранами аппарата Гольджи, что приводит к подавлению экзоцитоза вирионов [4]. Поэтому наиболее вероятным объяснением причины высокой чувствительности к туникамицину гемадсорбирующих изолятов и вариантов вируса АЧС является, по-видимому, нарушение транспорта к плазматической мембране одного или нескольких гликопротеинов из-за наличия значительного количества важных для процессинга потенциальных сайтов гликозилирования, чего нет у вариантов с атипичной рыхлой гемадсорбцией или без таковой.

С помощью ингибиторов гликозилирования удалось оценить долю углеводных цепей в молекуле ГП 110-140. В присутствии свайнсона молекулярная масса изолятоспецифического гликополипептида, маркированного  $^3H$ -глюкозамином, снижалась до 95 кД, в присутствии моненсина - до 70 кД. Наличие столь значительного "углеводного облака" у изолятоспецифического гликопротеина, оцениваемого по меньшей мере в 50% массы молекулы, не может не оказывать влияния на его биологические свойства. Установлено, что средние значения молекулярной массы ГП 110-140 у изолятов Ф-32, Л-57, К-73, МОЗ составляют соответственно 115-120, 126, 130-135, 135 кД, и в той же последовательности повышаются вирулентность и количество адсорбируемых эритроцитов на зараженных этими изолятами клетках КМС [3]. Ранее было показано, что гемадсорбция при АЧС обусловлена взаимодействием олигосахаридных цепей гликопротеинов вируса с рецепторами эритроцитов [5]. Поэтому различия в молекулярных массах ГП 110-140 у изолятов вируса, вероятно, связаны с количеством углеводных цепей на молекуле. При увеличении количества олигосахаридов в составе ГП 110-140, оцениваемого по возрастанию среднего значения его молекулярной массы у перечисленных выше изолятов, возрастает вероятность "маскирования" критически важных эпитопов.

Это предположение подтверждается экспериментальными данными, согласно которым, во-первых, в присутствии туникамицина увеличивается процент цитолиза зараженных вирусом АЧС А-клеток аутологичными цитотоксическими Т-

лимфоцитами иммунных свиней. Во-вторых, повышение степени гликозилирования снижало возможность распознавания зараженных макрофагов вирусспецифическими Т-хелперами [6].

Таким образом, установлено, что в зараженных вирусом АЧС клетках КМС индуцируется 13-14 гликополипептидов с м.м. от 14 до 220 кД. В состав олигосахаридов большинства из них входят манноза, глюкозамин, галактоза. В зараженных гемадсорбирующими изолятами и вариантами А-клетках КМС впервые обнаружен изолятоспецифический мажорный неструктурный гликополипептид с м.м. 110-140 кД, олигосахариды составляют около половины его массы. Разработан метод количественного определения серологического родства гемадсорбирующих изолятов и вариантов вируса АЧС.

### **Литература.**

1. Вишняков И.Ф., Митин И.И., Курносков А.Н. и др. // Вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и эпизоотологии, Покров, 1992, Ч. 1, С. 57-62.
2. Ефимова А.А., Малахова М.С., Середа А.Д. и др. // Докл. Всесоюзн. акад. с.-х. наук., 1989, № 7, С. 38-40.
3. Макаров В.В., Вишняков И.Ф., Власов Н.А. и др. // Вопр. вирусол., 1991, № 4, С. 321-324.
4. Макаров В.В., Середа А.Д., Пиря А.А. и др. // Вопр. вирусол., 1993, № 5-6, С. 267-270.
5. Середа А.Д., Макаров В.В. // Ветеринария, 1992, № 1, С. 22-24.
6. Середа А.Д., Соловкин С.Л., Фугина Л.Г. и др. // Вопр. вирусол., 1992, №3, С. 168-170.
7. Середа А.Д., Анохина Е.Г., Фугина Л.Г. и др. // Ветеринария, 1993, № 1, С. 26-28.
8. Coggins L. // Progr. Med. Virol., 1974, 18, 48-63.
9. Garcia-Barrena B., Sanz A., Nogal L. et al. // J. Virol., 1986., v. 58, № 2, P. 385-392.
10. Malmquist W.A., Hay D. // Amer. J. Vet. Res., 1960, v. 21, P. 104-108.

11. Mebus C.A. // *Advanc. Virus Res.*, 1988, v. 35, P. 251 -269.
12. Norley S.G., Wardley R.C. // *Immunology*, 1982, v. 46, P. 75-82.
13. Norley S.G., Wardley R.C. // *Res. Vet. Sci.*, 1984, v. 37, P. 255-257.
14. Tabares E., Martines J., Martin E. et al. // *Arch. Virol.*, 1983, v. 77, № 2-4, P. 167-180.
15. Val M., del, Carrascosa J., Vinuela E. // *Virology*, 1986, v. 152, № 1, P. 39-49.
16. Val M., del, Vinuela E. // *Virus res.*, 1987, № 7, P. 297-308.
17. Vigario J.D., Terrinha A.M., Bastos A.L. et al., // *Arch. Ges. Virusforsch.*, 1970, Bd. 31, S. 387-389.
18. Vigario J.D., Terrinha A.M., Moura Nunes J.F. // *Ibid.*, 1974, Bd. 45, S. 272-277.

# **ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИЗОЛЯТОСПЕЦИФИЧЕСКОГО ГЛИКОПОЛИПЕПТИДА ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ\***

В составе оболочек очищенных вирионов вируса африканской чумы свиней (АЧС) обнаружены три гликозилированных полипептида (ГП) с молекулярной массой 51, 56, 89 кД [10] и три радиомаркированных моносахарами оболочечных компонента с молекулярной массой 9, 95, 230 кД, биохимическая природа которых не выяснена [11]. Пять вирусиндуцированных гликозилированных полипептидов с молекулярной массой 13, 33, 34, 38, 220 кД идентифицированы в инфицированных вирусом АЧС клетках *Vero* [12].

Цель настоящей работы - определить наиболее полный состав гликопротеинов вируса АЧС. Учитывая, что вирусные изоляты имеют множество серотипов, выявляемых фенотипически в реакции задержки гемадсорбции [7, 9], мы считаем попытку идентифицировать гемадсорбирующий антиген в числе прочих вирусных белков важной задачей.

## **Материалы и методы.**

Эксперименты проведены с гемадсорбирующими изолятами вируса АЧС Лиссабон-57 (Л-57), Мозамбик (МОЗ), Ф-32, не имеющими антигенного родства в реакции задержки гемадсорбции (РЗГА), и негемадсорбирующими вариантами ЛЦ и ФНГ (селекционированными соответственно из Л-57 и Ф-32). Свиньи антисыворотки к изолятам Л-57, МОЗ, Ф-32 имели титр в РЗГА 1:80-1:320. Вирус выращивали и титровали в первичной культуре клеток костного мозга свиней (КМС) или во фракции адгезивных (А) клеток КМС. При маркировании белков  $^3\text{H}$ -глюкозамином (5-10

---

\* опубликовано в журнале «Ветеринария», 1992, 1, 22-24 совместно с А.Д.Середой.

мкКи/мл, ВО «Изотоп», СССР) использовали дефицитную по глюкозе среду (1/10 от стандартной концентрации). Зараженные клетки снимали метелкой со стекла, осаждали центрифугированием в течение 30 минут при 2000 g и 2-3 раза отмывали в том же режиме. После хранения при -70°C осадок размораживали, ресуспендировали в буфере для лизиса (0.02 М трис-НСI, рН 7,2-7,4, 1% тритон X-100, 1 мМ фенилметилсульфонилфторид), крупные надмолекулярные структуры отделяли последовательным центрифугированием при 2000 g и 50 000 g по 40 минут.

Гликозилированные полипептиды выделяли из надосадков на биоаффинных сорбентах по рекомендациям фирмы «Pharmacia» [3] с использованием *CNBr*-активированной сефарозы 4В и лектинов из *Canavalia ensiformis*, *Triticum vulgare*, *Glycine max*, *Ricinus communis*, *Tetragonolobus purpureus* («Sigma», США). Для их элюирования применяли 0.2 М растворы моносахаров метил- $\alpha$ -D-маннопиранозида, N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозамина, N-ацетил- $\alpha$ -D-галактозамина,  $\beta$ -D-галактозы,  $\alpha$ -L-фукозы, соответственно. Радиоиммунопреципитацию осуществляли по Kessler [4], электрофоретическое разделение полипептидов - по Laemmli [6], электроперенос из полиакриламидного геля на нитроцеллюлозную мембрану — по Kyhse-Andersen [5]. После «забивки» 5% бычьим сывороточным альбумином на отмывочном буфере (0.02 М трис-НСI, рН 7,2-7,4, 0.05 % твин-20, 0.15 М NaCl) нитроцеллюлозные мембраны инкубировали 2 часа при 37°C с соответствующей антисывороткой в разведении 1:30-1:120, промывали и заливали конъюгатом протеина А («Pharmacia») с пероксидазой хрена («Sigma»), приготовленным по методу Nakane et al. [8]. Через 2 часа нитроцеллюлозные мембраны отмывали и инкубировали с раствором субстрата (10 мг о-дианизидина, 70 мкг H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) на 40 мл 0.05 М трис-НСI, рН 7,4).

### **Результаты исследований и обсуждение.**

Для получения наиболее полной информации о полипептидах, входящих в состав вирусспецифических гликопротеинов, использовали два методических подхода. Первый основан на выделении из лизата инфицированных А-клеток пула гликозилированных белков (вирусного и клеточного происхождения) с помощью биоаффинной хроматографии на

сорбентах (в качестве лигандов применяли лектины) и выявлении из их числа вирусспецифических полипептидов иммуноблоттингом. При выделении пула гликозилированных полипептидов применяли сорбенты, обладающие аффинитетом к различным моносахарам. Наибольшее количество вирусспецифических гликозилированных полипептидов выделяли с использованием конканавалина А (таблица). Вирусная специфичность идентифицированных полипептидов подтверждена отсутствием соответствующих полос в аналогично приготовленном лизате неинфицированных А-клеток, а углеводная - внесением на этапе связывания гликозилированных полипептидов с сорбентом 0.2 М метил- $\alpha$ -D-маннопиранозида (рисунок 1).

Интерпретируя полученные результаты, необходимо учитывать, что выявляемые биоаффинным способом гликозилированные белковые комплексы могут содержать негликозилированные полипептиды, которые на втором этапе при электрофорезе по Laemmli [6] также идентифицируются иммуноблоттингом. Поэтому использовали более корректный подход - маркирование белков инфицированных А-клеток  $^3H$ -глюкозамином с последующей иммунопреципитацией их из клеточного лизата, позволяющей выявить только гликозилированные вирусные полипептиды. Применяя лизаты А-клеток, инфицированных разными изолятами и вариантами вируса АЧС, и различные серии антисывороток, идентифицировали 14 гликозилированных полипептидов с молекулярной массой 14, 16, 19, 23, 25, 32, 34, 40-42, 54, 60, 69, 76, 110-140, 220 кД.

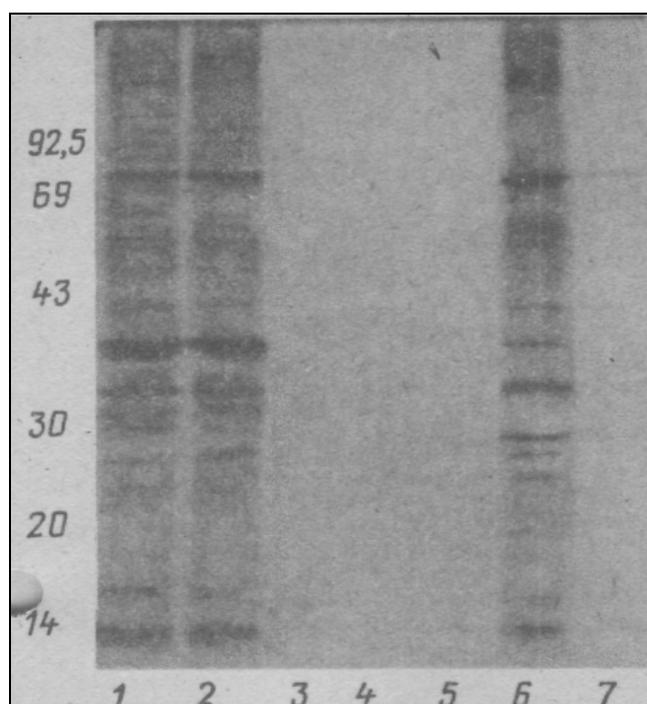
Мажорный гликополипептид с молекулярной массой 110-140 кД (ГП 110-140) регистрировали только в лизатах А-клеток, инфицированных гемадсорбирующими изолятами вируса АЧС Л-57, МОЗ и Ф-32 (рисунок 2, отмечен кругом). При использовании лизатов А-клеток, инфицированных негемадсорбирующими вариантами ЛЦ и ФНГ, или антисывороток, неактивных в РЗГА, ГП 110-140 не обнаруживался. В связи с этим сделано предположение, не является ли последний тем самым гемадсорбирующим антигеном, о котором известно с начала 60-х годов по феномену гемадсорбции [7]?

**Таблица.**  
**Полипептиды гликопротеинов вируса АЧС,**  
**выделенных из лизатов зараженных А-клеток КМС**  
**на лектинах с разной углеводной специфичностью.**

Молекулярная масса полипептидов (кД)	Лектины из:				
	<i>Canavalia ensiformis</i> ( $\alpha$ -D-манноза*)	<i>Triticum vulgare</i> (N-ацетил- $\beta$ -D- глюкозамин*)	<i>Glycine max</i> (N-ацетил- $\alpha$ -D- галактозамин*)	<i>Ricinus communis</i> ( $\beta$ -D-галактоза*)	<i>Tetragonolobus purpureus</i> ( $\alpha$ -L-фукоза*)
14	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+
19	+	-	+	-	-
22-23	+	+	+	-	-
24-25	+	+	+	+	-
26	+	+	+	+	+
29	+	+	+	-	-
30	-	+	-	-	-
34-35	+	+	-	+	-
40-42	+	+	+	+	+
47	+	+	-	-	-
54-55	+	+	-	-	-
60	+	+	+	+	+
66-67	+	+	+	+	-
71-72	+	-	+	+	-
76	+	+	+	+	-
110	+	-	-	-	-
126-130	+	-	-	-	-
140	+	+	-	-	-
150	+	+	-	-	-

\* углеводная специфичность лектина.

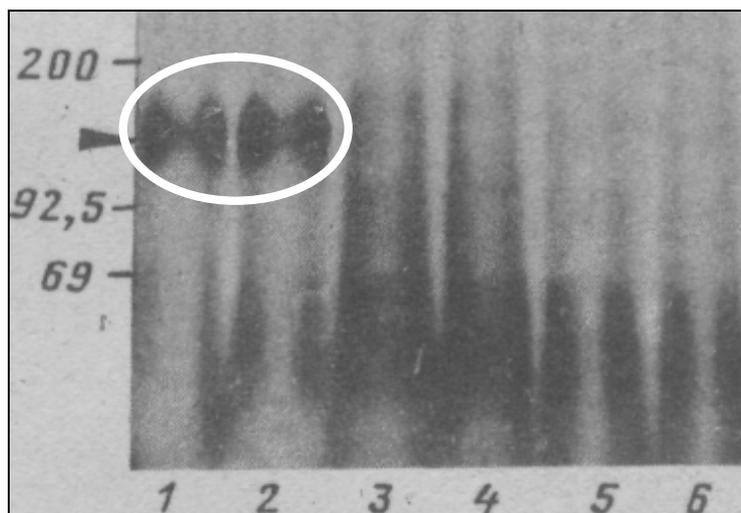
Подтвердить или опровергнуть это можно при определении специфичности ГП 110-140 в ряду серологически разных изолятов Л-57, МОЗ, Ф-32. ГП 110-140 выявляли в тех случаях, когда в радиоиммунопреципитации использовали гомологичные сыворотку и лизат инфицированных гемадсорбирующим изолятом А-клеток. При применении гетерологичных реагентов полоса



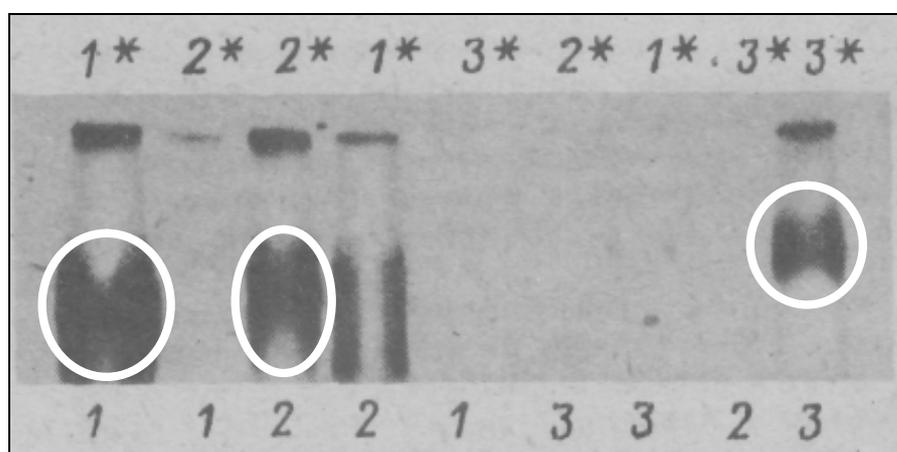
**Рисунок 1.** Блоттограмма вирусспецифических полипептидов, выявленных антисывороткой к вирусу АЧС, штамм Ф-32, в лизатах А-клеток КМС, зараженных штаммом Ф-32 (треки 1, 2) и незараженных (3, 4), в пуле сорбированных на конканавалин-А-сефарозе 4В из лизатов А-клеток КМС, незараженных (5) и заражённых штаммом Ф-32 (6), в пуле сорбированных в присутствии 10% метил- $\alpha$ -D-маннопиранозида на конканавалин-А-сефарозе 4В белков из лизатов А-клеток КМС, зараженных штаммом Ф-32 (7). Слева - маркеры молекулярной массы (кД).

на флуорограмме, соответствующая ГП 110-140, отсутствовала или была выражена значительно слабее по сравнению с регистрируемой при использовании гомологичных реагентов (рисунок 3).

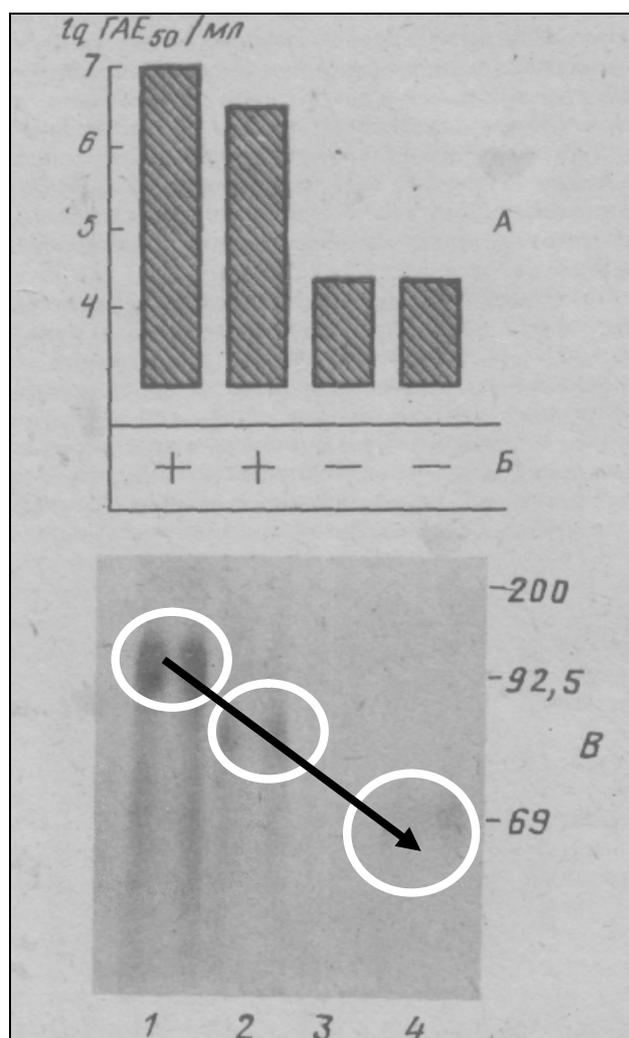
Поскольку известно, что ингибиторы гликозилирования подавляют репродукцию вируса АЧС в культуре [12], было изучено влияние свайнсолина, туникамицина, моненсина («Sigma») - препаратов, имеющих разный механизм ингибирующего действия, на синтез ГП 110-140, контролируя урожай внеклеточного вируса и гемадсорбцию. Концентрации ингибиторов, не влияющих на морфологию А-клеток, определены ранее [1].



**Рисунок 2.** Иммунопреципитация гликозилированного полипептида с м.м. 110-140 кД из меченных  $^3H$ -глюкозамином лизатов А-клеток КМС, зараженных вирусом АЧС, штамм Ф-32 [треки 1-4) или штамм ФНГ (5, 6), активной (1, 2, 5, 6) и неактивной (3, 4) в РЗГА антисывороткой к штамму Ф-32. Слева - маркеры молекулярной массы (кД). Стрелкой и в круге указано расположение ГП 110-140.



**Рисунок 3.** Иммунопреципитация гликозилированного полипептида с м.м. 110-140 кД из меченных  $^3H$ -глюкозамином лизатов зараженных вирусом АЧС А-клеток КМС: треки 1, 2, 3 - соответственно антигены Ф-32, Л-57, МОЗ с антисыворотками к Ф-32 (1\*), Л-57 (2\*), МОЗ (3\*).



**Рисунок 4. Влияние ингибиторов гликозилирования на накопление инфекционного вируса АЧС, штамм Л-57 (А), наличие (+) или отсутствие (-) гемадсорбции (Б) и молекулярную массу его изолятоспецифического гликозилированного полипептида ГП 110-140 (В) в культуре клеток КМС: 1 - без ингибитора, 2 - со свайнсоном (1 мкг/мл), 3 - с туникамицином (1 мкг/мл), 4 - с моненсином (0.5 мкг/мл) (выделено кругами). Справа - маркеры молекулярной массы (кД).**

Результаты, представленные на рисунке 4, свидетельствуют, что молекулярная масса изолятоспецифического гликозилированного полипептида ГП 110-140 в присутствии свайнсоина снижается до 95 кД, моненсина - до 70 кД, а при действии туникамицина он не обнаруживался.

В зараженных вирусом АЧС А-клетках КМС нами идентифицировано более пятнадцати полипептидов, входящих в состав вирусных гликопротеинов (см. таблицу). Это значительно

больше, чем у вирионов известных оболочечных вирусов, в том числе ДНК-содержащих. Разное количество гликозилированных полипептидов при использовании двух методических подходов объясняется тем, что в первом случае их выделяли по углеводному компоненту с идентификацией по иммунологической специфичности, а во втором - наоборот. По данным биоаффинной хроматографии в состав большинства из них входят манноза, глюкозамин, галактозамин и лишь в некоторые - фукоза.

Благодаря применению гемадсорбирующих изолятов вируса АЧС, культивированию вируса (для получения лизата) в естественно чувствительных А-клетках-мишенях, использованию высокоактивных в РЗГА антисывороток свиней удалось идентифицировать изолятоспецифический гликополипептид. Вероятно, именно из-за несоблюдения перечисленных условий этого не сделано ранее [10-12]. Обнаруженный ГП 110-140, по-видимому, имеет прямое отношение к гемадсорбирующему антигену, о существовании которого судили лишь по феномену гемадсорбции. Свидетельством этого является:

- § отсутствие характерных гантелеобразных полос в диапазоне 110-140 кД на электрофоретических треках иммунопреципитированных маркированных <sup>3</sup>H-глюкозамином полипептидов из лизатов А-клеток, зараженных негемадсорбирующими вариантами вируса АЧС;
- § отсутствие этих полос при использовании неактивных в РЗГА антисывороток;
- § отмена феномена гемадсорбции при культивировании вируса с ингибиторами гликозилирования туникамицином и моненсином.

В ходе эксперимента установлено, что олигосахаридные блоки составляют около 50% массы ГП 110-140. Наличие мощного углеводного облака вокруг него может являться существенным препятствием для иммунологического распознавания зараженных вирусом АЧС клеток-мишеней по аналогии с известными данными о ВИЧ [2].

Полученные результаты перспективны в разработке средств диагностики и защиты против АЧС.

## Литература.

1. Ефимова А.А. и соавт. // Доклады ВАСХНИЛ, 1989, № 7.
2. ADIP, 1989, № 28.
3. Affinity Chromatography. Pharmacia FC, 1983.
4. Kessler S.W. // Methods Enzymol., 1981, № 73.
5. Kyhse-Andersen J. // J. Biochem. and Biophys. Meth., 1984, № 10.
6. Laemmli U.K. // Nature, 1970, v. 227.
7. Malmquist W.A., Hay D. // Am. J. Vet. Res., 1960, № 21.
8. Nakane P.K., Kawaoi A. // J. Hist. Cyt., 1974, v. 22.
9. Plowright W. // Rev. Sci. tech. Off. int epizoot., 1986, v. 5, № 2.
10. Tabares E. et. al. // Arch. of virol., 1983, v. 77, № 2-4.
11. Val M., del et al. // Virology, 1986, v. 152, № 1.
12. Val M., del, Vinuela E. // Virus Res., 1987, v. 7, № 4.

## **СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГП 110-140 ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ\***

Возбудитель африканской чумы свиней (АЧС) - ДНК-содержащий арбовирус, поражает только представителей семейства *Suidae*. Помимо природного африканского нозоареала АЧС энзоотична в Южной Европе, имела неоднократное распространение в зоне Карибского бассейна, в Южной Америке, наблюдались вспышки в Бельгии и Нидерландах. Клинические признаки АЧС зависят от вирулентности вируса, значительно снижающейся в естественных условиях по мере продолжительности циркуляции возбудителя в конкретном регионе (от стада до страны). Выжившие после переболевания свиньи становятся устойчивыми к заражению гомологичным изолятом, но не защищены от гибели после инфицирования гетерологичным по месту или времени выделения вирулентным изолятом [1, 9]. Отсутствие в крови переболевших животных вируснейтрализующих антител (при высоком уровне антител, определяемых, например, иммунофлуоресценцией) затрудняет определение антигенов гомологичных групп вируса и идентификацию его протективных белков. Антигенная вариабельность изолятов вируса АЧС известна по результатам реакции задержки гемадсорбции (РЗГА) и комплементзависимого цитолиза; дифференцировать изоляты пытались по картам рестрикции ДНК и взаимодействию с моноклональными антителами [6, 7, 10, 11, 13-15].

---

\* опубликовано в журнале «Ветеринария», 1993, 1, 26-28 совместно с А.Д.Середой, Е.Г.Анохиной и Л.Г.Фугиной.

В лизатах, зараженных гемадсорбирующими штаммами вируса А-клеток костного мозга свиней (КМС), нами идентифицирован изолятоспецифический гликополипептид (ГП) с молекулярной массой 110-140 кД [5]. В данной статье сообщается об относительно простом методе серотиповой дифференциации гемадсорбирующих изолятов по ГП 110-140, физико-химических свойствах последнего и способе его очистки.

### **Материалы и методы.**

Работа проведена с гемадсорбирующими изолятами вируса АЧС Лиссабон-57 (Л-57), Конго-73 (К-73), Мозамбик (МОЗ), Ф-32, не имеющими антигенного родства в РЗГА [3]. Использованные в иммунологических реакциях 11 серий антисывороток к этим изолятам имели в РЗГА титр 1:80-1:320 [2, 4]. Вирус выращивали в первичной культуре А-клеток КМС, получение маркированных  $^4\text{C}$ -ацетатом натрия или  $^3\text{H}$ -глюкозамином лизатов из зараженных вирусом АЧС А-клеток и радиоиммунопреципитацию осуществляли по ранее описанной методике [5]. Полипептиды разделяли электрофоретически, изоэлектрофокусировали в гранулированном геле *Ультрадекс* («Pharmacia») [8, 12]. Ионообменную хроматографию проводили на *ДЭАЭ-сефацел* («Pharmacia»), уравновешенном буфером для лизиса клеток (0.02 М трис-НСI, рН 7.4, 1 % тритон X-100, 1 мМ фенилметилсульфонилфлюорид). Белки с сорбента ступенчато элюировали 0.00-1.00 М NaCl. Для определения серологического родства изолятов по ГП 110-140 в каждую пробу к 100 мкл зерен протеин-А-сефарозы *CL-4B* («Pharmacia»), уравновешенной буфером (0.02 М трис-НСI, рН 7.4, 1 % тритон X-100, 0.15 М NaCl), добавляли 50 мкл антисыворотки и инкубировали в течение 2 часов при 37°C, затем зерна шестикратно отмывали буфером и 18 часов инкубировали сорбент с препаратом  $^3\text{H}$ -глюкозаминмаркированного «антигена», полученного из  $2 \times 10^6$  зараженных А-клеток, в объеме 1 мл при 4°C. Зерна сорбента вновь шестикратно отмывали буфером и 5 минут кипятили в 150 мкл буфера, состоящего из 0.125 М трис-НСI, рН 6.8, 4% додецилсульфата натрия (ДСН), 20% глицерина, 10% 2-меркаптоэтанола. Радиоактивность аликвот по 100 мкл каждой пробы с «антигеном» определяли на сцинтилляционном

счетчике «Mark II» и выражали в процентах от радиоактивности данного «антигена», инкубированного с гомологичной сывороткой.

### Результаты исследований.

На флуорограмме маркированных  $^3\text{H}$ -глюкозамином мажорных полипептидов вируса АЧС до и после ступенчатого фракционирования методом ионообменной хроматографии видно, что ГП 110-140 (выделено кругом), элюированный 0.25 М NaCl, удалось отделить от гликолизированных компонентов вируса с молекулярной массой 50-80 кД, которые не сорбировались на ДЭАЭ-сефацеле в уравнивающем буфере (рисунок 1).

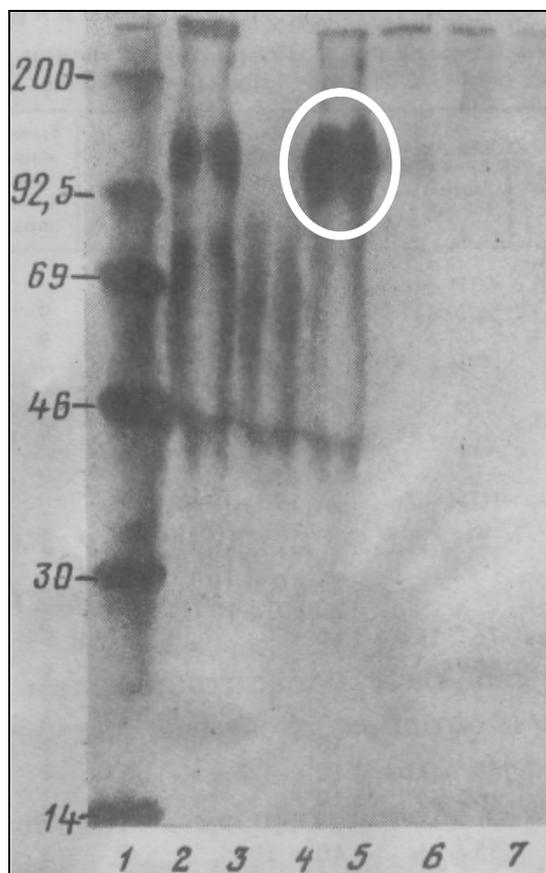


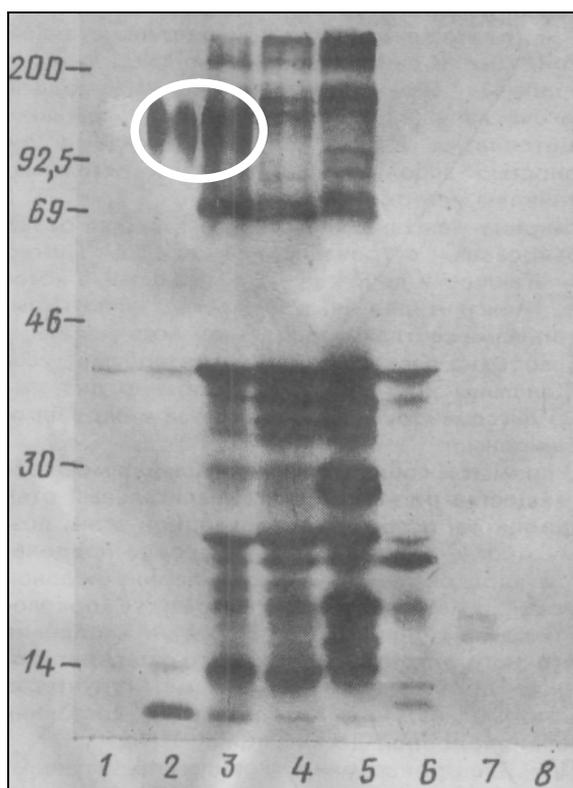
Рисунок 1. Флуорограмма фракционированных методом ионообменной хроматографии маркированных  $^3\text{H}$ -глюкозамином мажорных гликопротеинов вируса АЧС, изолят Ф-32. Содержимое фракций после иммунопреципитации подвергали электрофорезу в ДСН-9.5% полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях. 1 - маркеры молекулярной массы (кД), 2 - мажорные гликопротеины лизата зараженных клеток, 3-7 - элюатов 0.00 М, 0.125 М, 0.25 М, 0.50 М, 1.00 М NaCl.

Полученный таким образом препарат использовали в качестве «антигена» для установления серологического родства изолятов вируса АЧС. Этот метод основан на определении радиоактивности сорбированных на твердой фазе (зерна протеин-*A*-сефарозы *CL-4B*) иммунных комплексов, образованных после взаимодействия «антигенов» с антителами из активных в РЗГА гипериммунных сывороток свиней. В большинстве проб с гетерологичными реагентами специфичность связывания составляла 21.7-35.5%, каких-либо особенностей по этому показателю между европейскими (Л-57, Ф-32) и африканскими (К-73, МОЗ) изолятами не выявили (таблица). В отличие от качественной серотипизации в реакции задержки гемадсорбции (да / нет) предложенный метод является количественным и открывает возможности определения антигенного родства изолятов вируса АЧС из различных регионов мира, выявления особенностей хронологической смены детерминант в процессе естественной эволюции вируса.

**Таблица.**  
**Специфичность связывания (%) ГП 110-140 в гомо- и гетерологичных реакциях, n=6**

Антиген (штамм / серотип)	Специфическая сыворотка (штамм / серотип)			
	Л-57 / I	К-73 / II	МОЗ / III	Ф-32 / IV
К-73 / II	45.5±15.5	100.0	26.6±8.3	23.0±9.6
МОЗ / III	21.7±7.1	35.5±8.2	100.0	32.5±15.1
Ф-32 / IV	25.5±1.5	26.0±10.6	25.5±3.5	100.0

Совпадение в ряде случаев иммунотипа вируса с его серотипом в РЗГА позволяет предположить, что ГП 110-140 — наиболее вероятный кандидат в протективные белки вируса АЧС [13, 14]. Это обуславливает необходимость разработки способов его очистки в препаративных количествах и изучения физико-химических свойств. Анализ полипептидного состава фракций, полученных после разделения маркированных <sup>14</sup>C-ацетатом натрия белков «антигена» изолята Ф-32 методом изоэлектрофокусирования в гранулированном геле, показал, что из белков вируса АЧС наиболее низкую изоточку (pI) 4.3-4.8 имеет ГП 110-140 (рисунок 2, выделено кругом).



**Рисунок 2.** Флуорограмма фракционированных изоэлектрофокусированием в гранулированном геле и градиенте рН *Сефалитов 4-9* маркированных  $^{14}\text{C}$ -ацетатом натрия белков «антигена» вируса АЧС, изолят Ф-32. Содержимое фракций после иммунопреципитации подвергали электрофорезу в ДСН-9.5% полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях. Треки 1-8 - фракции с рН 3.53, 4.27, 4.72, 5.19, 5.83, 6.45, 7.25, 8.26, соответственно. Слева - местоположение маркеров молекулярной массы (кД).

Это свойство ГП 110-140 позволяет очищать его из лизата зараженных А-клеток КМС последовательным сочетанием методов ионообменной хроматографии, изоэлектрофокусирования в гранулированном геле и аффинной хроматографии на иммуносорбенте, где в качестве лиганда используют IgG из активной в РЗГА гомологичной гипериммунной сыворотки свиней. Выход ГП 110-140 из 5 литров зараженной монослойной культуры КМС составлял 50-150 мкг, что достаточно для изучения его биологических, иммунологических и физико-химических свойств.

Средние значения молекулярной массы изолятоспецифического гликополипептида варьируют у различных изолятов от 115 до 135 кД; у наиболее вирулентных из числа изученных МОЗ и К-73 они составляют соответственно 135 и 130-

135 кД, у менее вирулентных Л-57 и Ф-32 - 126 и 115-120 кД. Поскольку молекулярная масса ГП 110-140 в значительной степени определяется олигосахаридными блоками [5], вероятно, что установленные различия связаны с большей степенью его гликозилирования у изолятов К-73 и МОЗ. В этом случае просматривается прямая связь между степенью гликозилирования ГП 110-140 и количеством адсорбированных на зараженных клетках эритроцитов в связи с вирулентностью изолятов по опубликованному нами ранее данным [3].

### **Заключение.**

Таким образом, разработан количественный метод определения серологического родства гемадсорбирующих изолятов вируса АЧС. Изолятоспецифический ГП 110-140 охарактеризован по молекулярной массе и изоэлектрической точке. На основании результатов изучения физико-химических свойств ГП 110-140 предложен метод его препаративной очистки из лизата зараженных А-клеток КМС.

### **Литература.**

1. Бакулов И.А., Макаров В.В. // Вест. с.-х. науки, 1990, 3.
2. Вишняков И.Ф. // Ветеринария, 1986, № 2.
3. Макаров В.В. и соавт. // Вопр. вирусол., 1991, № 4.
4. Методические рекомендации по изучению клеточного иммунитета у свиней при вирусных инфекциях. Покров, ВНИИВВиМ, 1988.
5. Середа А.Д., Макаров В.В. // Ветеринария, 1992, № 1.
6. Coggins L. // Prog. Med. Virol., 1974, v. 18.
7. Garcia-Barrena B. // J. Virol., 1986, v. 58, № 2.
8. Laemmli U.K. // Nature, 1970, v. 227.
9. Mebus C.A. // Adv. virus Res., 1988, v. 35.
10. Norley S.G., Wardley R.S. // Immunology, 1982, v. 46.
11. Pan I.C. et al. // Virus Res., 1988, v. 9, № 2-3.
12. Radola B. // J. VBA, 1973, v. 295.
13. Vigario J.D. et al. // Arch. Gesamte Virusforsch., 1970, v. 31.
14. Vigario J.D. et al. // Arch. Gesamte Virusforsch., 1974, v. 45.
15. Wesley R.D., Tuthill A.E. // Prevent. Vet. Med., 1984, v. 2.