

**СВЕРДЛОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ**

*На правах рукописи*

**Н. В. БАБИКОВА**

**Аминокислотный обмен клеток НEr-2  
в норме и в условиях  
острой вирусной инфекции**

**(№ 03093 — Биологическая химия)**

**Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**СВЕРДЛОВСК  
1970**

СВЕРДЛОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ

*На правах рукописи*

Н. В. БАБИКОВА

Аминокислотный обмен клеток НEr-2  
в норме и в условиях  
острой вирусной инфекции

(№ 03093 — Биологическая химия)

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

СВЕРДЛОВСК  
1970

Работа выполнена в Свердловском научно-исследовательском институте вирусных инфекций МЗ РСФСР (директор — доктор медицинских наук, профессор **А. М. Хованова**).

Научные руководители:

Кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник **А. П. Кузовлев**.

Кандидат химических наук, доцент **В. Г. Шестаков**.

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, доцент **Ю. К. Леденцов**.

Кандидат медицинских наук, доцент **Е. Н. Рысакова**.

Внешний отзыв дает Ростовский медицинский институт.

Автореферат разослан « 5 » *марта* 1971 г.

Защита диссертации состоится « 6 » *апреля*

1971 г. в Ученом Совете Свердловского Государственного медицинского института (ул. Решина, 3).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Свердловского медицинского института (ул. Ермакова, 17).

Ученый секретарь Совета

доцент А. П. Боярский

*канд. мед. наук В. Г. Константинов*

В настоящее время метод культивирования тканей нашел широкое применение для решения многих практических и теоретических вопросов биологии и медицины. Дальнейшее развитие методов культивирования и расширение сферы применения тканевых и клеточных культур неразрывно связано с проблемой создания стандартных, высококачественных и экономически доступных питательных сред. Однако создание новых и усовершенствование существующих сред невозможно без выяснения закономерностей обменных процессов в интактных и инфицированных клетках, в частности, аминокислотного обмена, играющего решающую роль в синтезе клеточного и вирусного белка.

В результате исследований, проведенных рядом авторов (Р. Н. Этингоф с соавт., 1959; Н. З. Хазипов, Х. Ш. Казаков, 1966; Pasieka, Morgan, 1959; 1960; Sinclair, Leslie, 1959; Eagle, Piez, 1962; Küchler 1962, 1964; McCarty, 1962; Chung et al., 1960; и др.), получены общие представления об особенностях аминокислотного обмена культивируемых тканей, в то же время многие конкретные вопросы не выяснены. Так почти не изучена утилизация заменимых и незаменимых аминокислот среды 199 в процессе роста клеток и ее изменение в зависимости от аминокислотного состава среды роста и типа культивируемых тканей. Остается недостаточно освещенным вопрос о концентрации аминокислот внутри клетки и ее корреляции с содержанием аминокислот в питательной среде.

Особый интерес представляет изучение аминокислотного обмена клеток, инфицированных различными вирусами, поскольку многими исследованиями установлено, что вирусы, проникая в клетку, вызывают значительные изменения в ее метаболизме, обусловленные, в частности, синтезом вирусных компонентов.

Относительно источников веществ, необходимых для синтеза белка вирусной частицы, имеются единичные сообщения, касающиеся в основном репродукции вирусов полиомиелита, клещевого энцефалита и ящура. По данным Darnell, Eagle (1958), Eagle (1958, 1959) белок вируса полиомиелита может синтезироваться из свободных аминокислот клетки без использования аминокислот среды. Однако Halonen с соавт. (1962), Т. А. Мирютова (1968) отмечали утилизацию из питательной среды ряда

аминокислот в процессе репродукции вируса клещевого энцефалита в культивируемых клетках. Аналогичные данные были получены Л. А. Коптевой с соавт. (1964) при культивировании клеток, инфицированных вирусом ящура.

В связи с тем, что подобные работы крайне малочисленны, а приведенные в них данные противоречивы, значительный интерес представляет изучение утилизации аминокислот среды и внутриклеточного фонда клетками на различных стадиях вирусной репродукции.

Целью настоящего исследования было изучение некоторых аспектов аминокислотного обмена клеток НЕр-2 в норме и в условиях вирусной инфекции. В этом плане решались следующие конкретные задачи: изучение утилизации аминокислот среды и внутриклеточного фонда в процессе культивирования клеток НЕр-2 в полноценной и упрощенной (без заменимых аминокислот) среде 199; выяснение влияния инфекции вирусом Коксаки В3 и аденовирусом типа 1 на аминокислотный обмен клеток НЕр-2; исследование возможности использования упрощенной среды 199 для выращивания клеток НЕр-2 и накопления вирусов Коксаки В3 и аденовирусов типа 1.

Решение поставленных вопросов позволит дать характеристику потребления интактными и зараженными клетками аминокислот питательной среды и внутриклеточного фонда и по этим данным косвенно судить о состоянии белкового обмена, который играет решающую роль в процессе жизнедеятельности клеток и репродукции вирусов. Кроме того, на основании полученных данных представляется возможным сделать заключение о целесообразности упрощения среды 199 путем исключения из ее состава заменимых аминокислот, что имеет большое практическое и экономическое значение для производства вирусологических питательных сред.

### **Материалы и методы**

Для изучения аминокислотного обмена интактных клеток были использованы перевиваемые клетки НЕр-2. Клетки культивировали в матрасах емкостью 0,25; 0,5; 1,5 литра. Условия выращивания клеток не отличались от общепринятых. В качестве питательной среды для культивирования клеток использовали безиндикаторную среду 199 и ее упрощенные варианты с исключением двух (аланин и аспарагиновая кислота) и восьми (аланин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты, серин, глицин, пролин, оксипролин, цистеин) заменимых аминокислот. Во все сре-

ды добавляли 10% сыворотки крови крупного рогатого скота. В течение 4-суточного роста клеток в культуральной жидкости определяли концентрацию аминокислот и одновременно подсчитывали количество клеток. На 3 сутки роста, когда формировался монослой, клетки использовали для определения внутриклеточной концентрации аминокислот.

Исследования аминокислотного обмена клеток в условиях вирусной инфекции проводили со взвесью клеток НЕР-2. Использование взвешенных культур клеток в настоящее время нашло широкое применение при изучении ранних стадий взаимодействия вирусов с клетками. При культивировании вирусов во взвеси сохраняются те же основные закономерности, которым подчиняется размножение вирусов в однослойных клеточных культурах (А. К. Алексеева, А. Т. Исмагулов, 1965; Н. С. Куликова и др., 1965; А. С. Новохатский, 1968). В качестве поддерживающей среды использовали безиндикаторную среду 199 и упрощенную среду 199, не содержащую заменимых аминокислот. Инфицирующими агентами были избраны ДНК-содержащий аденовирус типа 1 и РНК-содержащий вирус Коксаки В3, обладающие четко выраженным цитопатическим действием и, как показано рядом исследователей, резко изменяющие основные обменные процессы в инфицированных клетках. Вирусы были адаптированы к клеткам Нер-2 многократным пассированием. В качестве вирусосодержащего материала использовали культуральную жидкость зараженной культуры клеток НЕР-2. Титр вирусов определяли по его цитопатическому действию в культуре клеток Нер-2 и рассчитывали (в ЦПД<sub>50</sub>/мл) по методу Рида и Менча.

Суспензию клеток ( $3 \cdot 10^5$  в мл среды) разливали по 20 мл в 0,25 мл матрасы, после чего заражали вирусом Коксаки В3 и аденовирусом типа 1. Множественность заражения составляла 0,1 ЦПД<sub>50</sub> вируса на клетку. В контрольные матрасы с суспензией клеток вносили равное количество лизата незараженных клеток. Исследования вели в течение 24 часов с момента внесения вируса. Клетки и культуральную жидкость анализировали через 15, 30 минут, 1, 3, 6, 8, 24 часа после контакта клеток с вирусами. Концентрацию аминокислот в культуральной жидкости и клетках определяли методом бумажной хроматографии (Г. Н. Зайцева, Н. П. Тюленева, 1958; Т. С. Пасхина, 1964).

Для определения концентрации аминокислот в культуральной жидкости интактных и инфицированных клеток пробы подвергали депротенинизации трихлоруксусной кислотой (ТХУ) и этосольванию на ионообменной смоле дауэкс 50 в Н<sup>+</sup> форме. С этой

целью к 10 мл исследуемой жидкости (вирусо­содержащий материал предварительно прогревали при 96° в течение 3 минут) добавляли 1 мл 30% раствора ТХУ. Смесь центрифугировали и затем депротенизированную надосадочную жидкость пропускали через колонку со смолой. Адсорбированные аминокислоты элюировали 4N раствором NH<sub>4</sub>OH и затем дистиллированной водой. Соединенные элюаты выпаривали в колбе Кляйзена в вакууме. Сухой остаток растворяли в 1 мл 10% раствора изопропилового спирта. 40 мкл этого раствора по 5 мкл наносили на хроматографическую бумагу (ватман 3 ММ).

Свободные внутриклеточные аминокислоты извлекали из клеток 3-кратным экстрагированием 8% раствором ТХУ. Объединенные экстракты центрифугировали, надосадочную жидкость обессоливали, затем адсорбированные аминокислоты элюировали и сушили в вакууме вышеуказанным способом. Сухой остаток растворяли в изопропиловом спирте и 100 мкл этого раствора наносили на хроматографическую бумагу.

Для разгонки смеси аминокислот через бумагу с нанесенными пробами 2 раза пропускали смесь: н-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (4 : 1 : 5) и 3 раза смесь из этих же ингредиентов в соотношении 40 : 15 : 5. При этом четко разделялись лизин, аргинин, аспарагиновая кислота + глутамин, серин, глицин, глутаминовая кислота + треонин, аланин, тирозин, валин, фенилаланин, лейцин + изолейцин.

Для количественного определения аминокислот полученные хроматограммы проявляли 0,5% раствором нингидрина в ацетоне, содержащем 1% лед. уксусной кислоты. После 15-минутного прогревания в сушильном шкафу при температуре 65° пятна аминокислот приобретали синюю окраску. Проявленные хроматограммы закрепляли раствором азотнокислой меди, при этом синяя окраска пятен аминокислот переходила в оранжево-красную. Окрашенные пятна вырезали, экстрагировали 75% раствором этилового спирта и фотометрировали на ФЭК-М с зеленым светофильтром. Количественную характеристику содержания аминокислот получали с помощью калибровочных графиков, построенных по данным хроматографического анализа стандартных растворов аминокислот.

Для статистической обработки полученных данных применяли критерии непараметрической статистики (В. Ю. Урбах, 1963; 1964; Л. С. Каминский, 1964; Е. В. Гублер, А. А. Генкин, 1969). В работе обсуждаются только те изменения в содержании свободных аминокислот клеток и культуральной жидкости, которые статистически достоверны.

## Результаты и их обсуждение

Проведенные исследования показали, что для клеток НЕР-2 характерно избирательное потребление аминокислот питательной среды. В течение 4-суточного роста клетки интенсивно утилизировали глутамин (общее пятно с аспарагиновой кислотой). Содержание лизина, аргинина, глицина, валина и фенилаланина изменялось незначительно, а концентрация глутаминовой кислоты в течение всего периода инкубации клеток оставалась без изменения. При культивировании клеток в среде роста значительно увеличивалось содержание аланина, что послужило основанием для исключения его из состава питательной среды. Одновременно с аланином из среды 199 была исключена аспарагиновая кислота, необходимое количество которой в клетках тканевых культур, по данным литературы, может синтезироваться внутриклеточно из глутамин или глутаминовой кислоты (Levintow et al., 1957; Eagle, 1958; Biggers, 1961; Eagle et al., 1966).

При культивировании клеток НЕР-2 в упрощенной среде 199, не содержащей аспарагиновой кислоты и аланина, отмечено резкое увеличение потребления глутаминовой кислоты по сравнению с ее потреблением из полноценной среды, что обусловлено, по-видимому, необходимостью синтеза аспарагиновой кислоты. Исключение аланина из среды культивирования не влияло на интенсивность его внутриклеточного синтеза, поскольку в процессе роста клеток в упрощенной среде он накапливался с той же скоростью, что и в полноценной среде. По-видимому, синтез аланина в клетках НЕР-2 происходит путем восстановительного аминирования пировиноградной кислоты. Аналогичные результаты были получены Pasička с соавт. (1958) для клеток I штамма и Eagle с соавт. (1965) для некоторых культур клеток человека.

Таким образом, необходимое для роста клеток количество аланина и аспарагиновой кислоты может синтезироваться внутриклеточно, независимо от наличия их в питательной среде, что позволяет использовать среду 199 без аланина и аспарагиновой кислоты для культивирования клеток НЕР-2. Подтверждением этого вывода служит и то обстоятельство, что отсутствие в среде роста этих аминокислот не влияет на пролиферативную способность клеток.

На основании полученных результатов, свидетельствующих о возможности использования для культивирования клеток среды 199, из состава которой исключены две аминокислоты (ала-

нин и аспарагиновая кислота) и данных ряда авторов (Morgan 1958; Swim, Parker, 1958; Eagle, 1959), которые отмечали потребность многих штаммов клеточных культур только в 13 незаменимых аминокислотах, нами была приготовлена среда 199, в состав которой не входили все заменимые аминокислоты (серин, глицин, глутаминовая и аспарагиновая кислоты, аланин, пролин, оксипролин), а также незаменимая аминокислота цистеин, поскольку в состав среды входил цистин.

Клетки НЕР-2 культивировали на полноценной и упрощенной среде 199, содержащей только незаменимые аминокислоты, в течение 12 месяцев. За этот период было проведено 80 пассажей. Все это время клетки на обеих средах сохраняли способность к постоянному интенсивному росту. На 12 популяциях было исследовано потребление клетками аминокислот из полноценной и упрощенной среды 199.

Установлено, что в период адаптации клеток к условиям роста в упрощенной среде имело место большее потребление лизина, аргинина, глутаминовой кислоты с треонином, тирозина, валина по сравнению с потреблением этих аминокислот из полноценной среды. Концентрация остальных изучаемых аминокислот изменялась одинаково на обеих средах. В последующем, различия в потреблении некоторых аминокислот, наблюдаемые в адаптационный период, сглаживались и утилизация клетками этих аминокислот из полноценной и упрощенной среды существенно не отличалась. Клетки, растущие как в полноценной, так и в упрощенной среде, утилизировали в значительных количествах глутамин и лейцин с изолейцином и накапливали в культуральной жидкости аланин, независимо от содержания его в исходных средах.

Таким образом, замена полноценной среды 199 на упрощенную (без восьми аминокислот), за исключением некоторого периода адаптации клеток к этой среде, не вызывает значительных изменений в потреблении аминокислот клетками и не оказывает существенного влияния на пролиферативную способность клеток.

Поскольку заменимые аминокислоты почти не поступали в клетку из питательной среды, естественно встал вопрос о том, насколько полно представлены они во внутриклеточном фонде. Для выяснения этого вопроса было проведено изучение содержания свободных аминокислот в клетках НЕР-2, выросших на полноценной и упрощенной (без заменимых аминокислот) среде 199. При анализе полученных данных не было отмечено качественных различий в составе аминокислотных фондов клеток,

выросших на полноценной и упрощенной среде. Несмотря на отсутствие в питательной среде заменимых аминокислот, они были обнаружены в клетках почти в тех же концентрациях, что и в фонде клеток, выросших на полноценной среде. Так, например, содержание аланина в клетках, выросших на полноценной и упрощенной среде, составляло соответственно 0,135 и 0,130 мкМ/мл, глутаминовой кислоты — 0,181 и 0,193 мкМ/мл, глицина — 0,105 и 0,096 мкМ/мл. Эти данные позволяют думать, что биосинтетические возможности клетки, растущей на упрощенной среде, вполне достаточны для сохранения фонда заменимых аминокислот на необходимом уровне. В то же время в этих клетках увеличивалась концентрация незаменимых аминокислот, что, по-видимому, обусловлено отсутствием конкуренции с заменимыми аминокислотами за проникновение в клетку, а также необходимостью создания определенного запаса легкодоступного азота для внутриклеточного синтеза заменимых аминокислот и других азотсодержащих метаболитов.

Четкое представление о внутриклеточной аккумуляции аминокислот можно получить только при сопоставлении данных, полученных при количественном изучении аминокислот как внутри клетки, так и в среде культивирования. С этой целью одновременно с определением содержания аминокислот в клеточном фонде анализировали состав питательной среды, в которой росли клетки. Было установлено, что концентрация аминокислот в клетках значительно выше, чем в питательной среде. Концентрация заменимых и незаменимых аминокислот в клетках, выросших на полноценной среде, в 10—20 раз превышала их концентрацию в среде. В процессе роста этих клеток значительно уменьшалось содержание большинства аминокислот питательной среды, за исключением аланина, который накапливался в среде роста. Эти данные позволяют предполагать, что основным источником внутриклеточных аминокислот в клетках, растущих на полноценной среде, являются аминокислоты питательной среды, которые аккумулируются в клетках в необходимых количествах.

Результаты, полученные при изучении содержания аминокислот в упрощенной среде и в фонде клеток, выросших на этой среде, показали, что исключение заменимых аминокислот из среды роста приводит к интенсивному накоплению их в клетке. Так серин, глутаминовая кислота аккумулировались 30-кратно, а содержание аланина в клеточном фонде в 60 раз превышало количество его в среде. Однако в этих условиях накопление заменимых аминокислот в клеточном фонде происходит в основном за счет внутриклеточного синтеза. Исключение заменимых

аминокислот из питательной среды приводит к снижению уровня незаменимых аминокислот среды и интенсивному 30—40-кратному накоплению их внутри клетки, причем их концентрация в 2—3 раза выше концентрации этих аминокислот в клетках, выросших на полноценной среде.

Полученные данные, свидетельствующие о повышенной концентрации аминокислот внутри клетки по сравнению с их содержанием в среде культивирования, еще раз подтверждают существующее представление о проницаемости клеточной мембраны и активном транспорте аминокислот внутрь клетки.

Таким образом, проведенные исследования показали, что отсутствие заменимых аминокислот в среде культивирования приводит к усилению биохимических процессов в клетке, обеспечивающих синтез этих аминокислот в количествах, необходимых для ее жизнедеятельности, и сохранение пролиферативной способности на том же уровне, что и при использовании полноценной среды. Эти данные позволяют высказать предположение о возможности использования среды 199, не содержащей заменимых аминокислот, для культивирования клеток НЕр-2.

Следующим этапом исследования было изучение аминокислотного обмена клеток НЕр-2 в условиях вирусной инфекции. Исследования проводили со взвесью клеток НЕр-2. В качестве поддерживающей среды использовали полноценную и упрощенную (без заменимых аминокислот) среду 199. Была изучена динамика изменения уровней аминокислот питательной среды и внутриклеточного фонда в течение 24-часовой инкубации клеток с вирусами Коксаки ВЗ и аденовирусами типа 1 при множественности заражения 0,1 ЦПД<sub>50</sub> на клетку. Особое внимание было уделено изучению ранних этапов инфекции (15, 30 минут, 1, 3, 6 часов с начала контакта с вирусами), когда изменения в обмене клетки вызываются проникшими вирусами, а не являются следствием нарушений клеточной структуры, наблюдаемых после формирования вирусных частиц.

При изучении утилизации аминокислот среды 199 инфицированными клетками выявлены значительные различия, зависящие от природы инфицирующего агента. Для клеток, зараженных вирусом Коксаки ВЗ, по сравнению с интактными клетками максимальная утилизация большинства аминокислот среды отмечена в первый час инфекции, а для клеток, зараженных аденовирусом типа 1, в этот период наблюдалось увеличение концентрации аминокислот среды поддержания. Интенсивная утилизация аминокислот этими клетками отмечена в период 1—3 часа с момента заражения. К 6 часу инфекции обоими вирусами концент-

рация аминокислот поддерживающей среды возвращалась к контрольному уровню. В период 8—24 часа для клеток, зараженных вирусом Коксаки ВЗ, наблюдалось незначительное потребление аминокислот, а при аденовирусной инфекции — увеличение концентрации аминокислот среды.

Так как основные процессы, связанные с вирусной инфекцией, протекают внутри клетки, несомненный интерес представляло изучение концентрации свободных аминокислот в зараженных клетках, которые по данным ряда авторов (Eagle, 1958; 1959; Kovacs, Stürzt, 1960; Lewis, Scoff, 1962; Pledger, Polatnick, 1962; Marquez, Hsiung, 1967; Polatnick, 1967) являются основными источниками синтеза вирусного белка.

Было установлено, что контакт клеток с вирусами приводит к значительному изменению содержания свободных внутриклеточных аминокислот. Значительное уменьшение концентрации свободных аминокислот в клетках, зараженных вирусом Коксаки ВЗ, отмечено в первые 30 минут инфекции, а в клетках, зараженных аденовирусом типа 1, наиболее интенсивное их потребление происходило в период между 1—3 часами с момента заражения. На последних этапах инфекции (6—8—24 часа) в клетках, зараженных вирусом Коксаки ВЗ и аденовирусом типа 1, имело место повторное снижение концентрации свободных внутриклеточных аминокислот, обусловленное, по-видимому, интенсивным выходом вирусов из клетки.

Для выяснения зависимости наблюдаемых изменений в аминокислотном обмене инфицированных клеток с динамикой содержания вирусов в среде было проведено количественное определение цитопатической активности вирусосодержащей культуральной жидкости. Максимальное снижение титра вируса Коксаки ВЗ наблюдалось в течение первых 15 минут инфекции, а для аденовируса типа 1 этот период продолжался в течение 3 часов. Затем инфекционный титр обоих вирусов нарастал и к 24 часам достигал величин, характерных для взятых вирусов и клеток.

При сопоставлении полученных данных с динамикой утилизации аминокислот среды и внутриклеточного фонда видно, что наблюдаемые изменения в аминокислотном обмене инфицированных клеток находятся в зависимости от стадии инфекционного процесса. Внутриклеточный период развития вируса (включая адсорбцию вируса, проникновение его в клетку и синтез компонентов) характеризуется интенсивной утилизацией зараженными клетками аминокислот как питательной среды, так и внутриклеточного фонда. Для вируса Коксаки ВЗ этот период

начинается с 15 минут и продолжается в течение первого часа, а для аденовируса типа 1 — в период между 1—3 часами с начала инфекции. Наблюдаемая повышенная утилизация аминокислот зараженными клетками в период внутриклеточного развития вируса позволяет высказать предположение об использовании аминокислот питательной среды и внутриклеточного фонда для синтеза вирусного белка.

В период выхода вируса из клетки и накопления его в среде культивирования происходит снижение интенсивности утилизации аминокислот.

Аналогичные исследования аминокислотного обмена в зараженных клетках были проведены при использовании в качестве среды поддержания упрощенной (без заменимых аминокислот) среды 199. Данные опытов показали, что отсутствие заменимых аминокислот в среде поддержания клеток, зараженных как вирусом Коксаки ВЗ, так и аденовирусом типа 1, приводит к резкому увеличению (в 2—2,5 раза) концентрации внутриклеточных аминокислот в первые 30 минут инфекции. В этот же период уменьшалось содержание аминокислот в поддерживающей среде.

Следовательно, в условиях использования упрощенной среды прежде всего создается внутриклеточный аминокислотный фонд, необходимый для репродукции вирусов, при этом используются для синтеза заменимых аминокислот, помимо внутриклеточного синтеза, незаменимые аминокислоты поддерживающей среды.

В дальнейшем не отмечено существенных различий в динамике изменения уровней аминокислот среды и внутриклеточного фонда при культивировании зараженных клеток как в полноценной, так и в упрощенной среде. После часового контакта клеток с вирусами внутриклеточные аминокислоты начинали утилизироваться. Для клеток, зараженных вирусом Коксаки ВЗ, максимальная утилизация отмечена через 3 часа, а для клеток, зараженных аденовирусом типа 1, — через 6 часов с момента контакта клеток с вирусом. В это же время потреблялись аминокислоты питательной среды.

Следовательно, в этот период происходит интенсивная утилизация зараженными клетками как аминокислот питательной среды, так и внутриклеточного фонда, используемых, по-видимому, для синтеза вирусного белка.

Через 6 часов в клетках, зараженных вирусом Коксаки ВЗ, отмечался второй подъем содержания внутриклеточных аминокислот и одновременное снижение концентрации аминокислот

среды, вслед за чем к 8 часам уровень внутриклеточных аминокислот резко снижался вплоть до 24 часа. Концентрация аминокислот поддерживающей среды уменьшалась параллельно концентрации внутриклеточных аминокислот. По-видимому, в этот период происходит новый цикл репродукции вируса.

Для клеток, зараженных аденовирусом типа 1, период между 8—24 часами характеризовался снижением концентрации внутриклеточных аминокислот и повышенном уровне аминокислот среды, по-видимому, обусловленным выходом вируса из клетки, приводящим к нарушению целостности клеточной мембраны и «утечке» части внутриклеточных аминокислот в окружающую среду.

При культивировании вирусов Коксаки ВЗ и аденовирусов типа 1 в клетках НЕР-2, среда поддержания которых не содержала заменимых аминокислот, вирусы накапливались в достаточно высоких титрах, которые существенно не отличались от титров, полученных при использовании полноценной среды 199.

Таким образом, проведенные исследования показали, что аминокислотный обмен инфицированных клеток, культивируемых в упрощенной среде, не нарушается и вирусы репродуцируются в той же мере, что и на полноценной среде. Следовательно, упрощенная среда 199, не содержащая заменимых аминокислот, вполне пригодна для получения в высоких титрах вирусов Коксаки ВЗ и аденовирусов типа 1 и, по-видимому, может быть использована для накопления ряда других вирусов, в частности, для получения диагностикумов и вакцин (Т. Л. Мирютова, 1968; Holtermann, 1969).

Использование упрощенной среды в качестве среды поддержания при репродукции вирусов дает также и определенный экономический эффект, поскольку исключение из ее состава дорогостоящих аминокислот значительно снижает ее стоимость.

На основании изложенного материала можно заключить, что процесс инфекции в клетках, зараженных ДНК-содержащим аденовирусом типа 1 и РНК-содержащим вирусом Коксаки ВЗ, характеризуется значительными изменениями аминокислотного обмена. Исследования, проведенные на различных стадиях инфекционного процесса, показали, что внутриклеточный период развития вирусов, когда осуществляется синтез его компонентов, совпадает с усиленным потреблением зараженными клетками как аминокислот питательной среды, так и внутриклеточных аминокислот, что позволяет высказать предположение об использовании этих аминокислот для синтеза вирусного белка.

Полученные результаты дают основание думать, что амино-

кислотному обмену инфицированной клетки принадлежит важная роль в репродукции вирусов. Представляется целесообразной дальнейшая работа по усовершенствованию используемых в настоящее время вирусологических питательных сред. Выявление закономерностей потребления аминокислот в условиях вирусной инфекции важно для разработки методов получения новых диагностических препаратов. Исходя из данных, представленных в настоящей работе, кажутся перспективными дальнейшие исследования в этом направлении, в частности, выяснение механизмов, регулирующих аминокислотный обмен инфицированной клетки, выявление соотношения между синтезом клеточного и вирусного белка и утилизацией аминокислот, широкое изучение особенностей потребления аминокислот отдельными клеточными линиями, исследование влияния различных вирусов на внутриклеточные процессы и т. д. Изучение аминокислотного обмена инфицированных клеток позволяет получить новые сведения об особенностях патогенеза вирусных инфекций.

### Выводы

1. С помощью метода бумажной хроматографии выявлены некоторые особенности аминокислотного обмена клеток НЕр-2 в норме и в условиях вирусной инфекции.

2. Клетки НЕр-2 избирательно утилизируют аминокислоты среды культивирования. На 4 сутки роста отмечено значительное снижение концентрации глутамина, серина, тирозина, треонина, лейцина с изолейцином и увеличение количества аланина. Концентрация остальных изучаемых аминокислот изменяется незначительно.

3. При культивировании клеток в среде 199, не содержащей аспарагиновой кислоты и аланина, последний накапливается в среде в тех же количествах, что и в полноценной среде 199. Отсутствие аланина и аспарагиновой кислоты в среде роста не влияет на пролиферацию клеток.

4. Исключение из состава среды 199 всех заменимых аминокислот и цистеина, после некоторого периода адаптации клеток к этой среде, не приводит к существенным изменениям утилизации клетками незаменимых аминокислот среды. Не выявлено существенных различий в пролиферативной способности клеток НЕр-2, культивируемых в полноценной и упрощенной среде, что свидетельствует о возможности использования упрощенной среды для культивирования клеток НЕр-2.

5. Отсутствие в среде роста заменимых аминокислот не влия-

яет на их внутриклеточный уровень. В фонде клеток, выросших на этой среде, наблюдается увеличение концентрации незаменимых аминокислот.

6. При заражении клеток вирусом Коксаки ВЗ и аденовирусом типа 1 наблюдаются значительные изменения аминокислотного обмена клеток, степень которых находится в зависимости от стадии инфекционного процесса. Внутриклеточный период развития вируса характеризуется интенсивной утилизацией инфицированными клетками аминокислот среды и внутриклеточного фонда; в период выхода вируса из клетки и накопления его в среде культивирования происходит снижение интенсивности утилизации аминокислот.

7. При изучении динамики изменения содержания аминокислот среды 199 в период 24-часовой инкубации клеток с вирусом Коксаки ВЗ и аденовирусом типа 1 выявлены определенные различия: максимальная утилизация аминокислот среды клетками, зараженными вирусом Коксаки ВЗ, отмечена в первый час инфекции, а клетками, зараженными аденовирусом типа 1, — в период 1—3 часа после внесения вируса.

8. В процессе репродукции вирусов в клетке изменяется концентрация свободных внутриклеточных аминокислот. Значительное уменьшение концентрации аминокислот в клетках, зараженных вирусом Коксаки ВЗ, отмечено в первые 30 минут инфекции, а в клетках, зараженных аденовирусом типа 1, — в период между 1—3 часом инфекции.

9. При использовании упрощенной среды 199 (без заменимых аминокислот) в качестве среды поддержания инфицированных клеток не выявлено существенных различий в динамике изменения концентрации аминокислот полноценной и упрощенной среды 199. В клетках, инфицированных вирусом Коксаки ВЗ, наиболее интенсивная утилизация аминокислот отмечена в первые 30 минут и затем после 6 часов контакта с вирусом. Для аденовирусной инфекции характерно уменьшение концентрации аминокислот среды в период между 1—6 часом с момента заражения.

10. Отсутствие заменимых аминокислот в среде поддержания зараженных клеток приводит к 2—3-кратному увеличению концентрации свободных внутриклеточных аминокислот в первые 30 минут инфекции. В дальнейшем не отмечено существенных различий в динамике изменения уровней внутриклеточных аминокислот в зависимости от аминокислотного состава среды, хотя в клетках, выращенных в упрощенной среде, они регистрируются несколько позже. В клетках, зараженных вирусом Кокса-

ки ВЗ, минимальная концентрация внутриклеточных аминокислот отмечена после 3 часов, а в клетках, зараженных аденовирусом типа 1, — после 6 часов контакта клеток с вирусами.

11. Степень репродукции вируса Коксаки ВЗ и аденовируса типа 1 в клетках НЕр-2 была одинаковой, независимо от присутствия или исключения из среды поддержания заменимых аминокислот, что позволяет рекомендовать упрощенную среду 199 для накопления вышеуказанных вирусов.

#### **Основные материалы диссертации представлены в следующих работах**

1. Н. В. Бабилова, Л. П. Молевич, В. Г. Шестаков. Утилизация аминокислот среды 199 культурой клеток НЕр-2 при заражении аденовирусами типа 1. В сб. Острые респираторные вирусные инфекции. Свердловск, 1966, 113—114.

2. Л. П. Молевич, Н. В. Бабилова, В. Г. Шестаков. Исследование взаимосвязи утилизации аспарагиновой и глутаминовой кислот клетками НЕр-2 с активностью их трансаминаз в норме и при заражении аденовирусами типа 1. Там же, 114—115.

3. Н. В. Бабилова, В. Г. Шестаков, Л. П. Молевич. Утилизация аминокислот среды 199 перевиваемыми клетками НЕр-2 при заражении вирусом Коксаки ВЗ. В сб. Эпштейн-Барр вирусные инфекции. Свердловск, 1967, 32—33.

4. Н. В. Бабилова, В. Г. Шестаков. Влияние аденовирусов типа 1 на транспорт аминокислот через биологическую мембрану. В сб. Острые респираторные вирусные инфекции. Киев, 1967, 58.

5. Н. В. Бабилова. Сравнительное изучение утилизации аминокислот из полноценной и упрощенной (по аминокислотному составу) среды 199 клетками НЕр-2. В сб. Актуальные проблемы вирусных инфекций. Материалы XV сессии института полиомиелита и вирусных энцефалитов. М., 1968, 71—72.

6. А. П. Кузовлев, Н. В. Бабилова. Влияние вируса Коксаки ВЗ и аденовируса типа 1 на утилизацию аминокислот из среды 199 клетками НЕр-2. Там же, 58—59.

7. Н. В. Бабилова. Зависимость концентрации аминокислот в клетках НЕр-2 от аминокислотного состава среды 199. В сб. Вопросы общей вирусологии. Эпштейн-Барр вирусные инфекции, корь. Материалы XVI сессии института полиомиелита и вирусных энцефалитов. М., 1969, 81—82.

8. Н. В. Бабилова, А. П. Кузовлев. Влияние вируса Коксаки ВЗ на аминокислотный обмен клеток НЕр-2, переживающих в

среде 199 с исключением заменимых аминокислот. Там же, 133—134.

9. Н. В. Бабилова. Влияние вирусной инфекции на аминокислотный обмен клеток НEr-2. В сб. Этиология, эпидемиология вирусных инфекций у человека на Урале. Материалы научной конференции, посвященной 50-летию Свердловского института вирусных инфекций. Свердловск, 1970, 19—21.

10. А. П. Кузовлев, Н. В. Бабилова. Аминокислотный обмен клеток НEr-2 при заражении их вирусом Коксаки В3. В сб. Энтеровирусные инфекции. Свердловск, 1970, 143—149.

11. Н. В. Бабилова, А. П. Кузовлев, Н. П. Глинских. Потребление незаменимых аминокислот клетками НEr-2 из модифицированной среды 199. Там же, 160—165.

12. Н. В. Бабилова, А. П. Кузовлев. Содержание аминокислот в клетках НEr-2, выращенных на полноценной и упрощенной среде 199. Там же, 166—171.

13. Н. П. Глинских, Ф. Я. Зусман, Н. В. Бабилова. Характеристика клеток НEr-2 при культивировании на средах с различным содержанием аминокислот. Там же, 172—175.

