

## Вплив вірусу тютюнової мозаїки та його РНК на культури клітин різного походження

А. Л. Бойко, С. С. Кир'яченко, О. Ю. Юдіна<sup>1</sup>, З. Д. Савцова<sup>1</sup>

Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
Вул. Володимирська, 64, Київ, 01033, Україна

<sup>1</sup> Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України  
Вул. Васильківська, 45, Київ, 03022, Україна

---

*У клітинах ліній ОН-1 та ПТП після трансфекції РНК вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ) відбувається складання вірусоподібних часток, які проявляють інфекційність на рослинах-індикаторах. Показано, що як лімфоїдні (ОН-1), так і епітеліальні (ПТП) клітини, починаючи з 3-ї доби після інфікування ВТМ або трансфекції його РНК, зазнають певних морфологічних змін.*

---

Вступ. У наш час поступово накопичуються відомості стосовно того, що окремі фітопатогенні віруси (або їхні нуклеїнові кислоти) за певних умов проявляють трансфекційні властивості та, можливо, здатні до репродукції в клітинах непригамних цим патогенам хазяїв, зокрема, ссавців. Нами протягом багатьох років велися дослідження по трансфекції РНК з ізолятів вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ), виділених у різних екологічних регіонах України. В первинному пошуковому скринінгу використовували ізоляти ВТМ, ідентифіковані на троянді ефіроолійній [1], бузині чорній, подорожнику великому та рослинах томату [2, 3]. Біологічні властивості ізолятів ВТМ вивчали протягом 1975—2000 рр. Первинний скринінг ізолятів за патологічною дією вели на різних видах вищих рослин та на клітинах HeLa. Відмічено, що РНК ВТМ може викликати складання вірусоподібних часток у клітинах HeLa та провокує деградацію моношару останніх шляхом цитопатогенної дії [4]. Крім того, доведено можливість репродукції ВТМ в ізольованих мітохондріях печінки щурів [5], а також показано, що при дії ВТМ та вірусу грипу на ссавців змінюється вірулентність останнього [6]. Сукупність цих даних вказує на принципову здатність ВТМ впливати на клітини ссавців, у зв'язку з чим постає проблема потенційного біоекологічного ризику і можливості дії ВТМ на регуляторні

механізми в клітинах тварин і людини та, як наслідок, розвитку певних патологічних процесів. Одночасно відомо, що при взаємодії з клітинами-мішенями одні й ті самі віруси можуть справляти різноманітні ефекти — як про-, так і протиапоптотичні або цитопроліферативну дію [7—10]. Показано, що в різних клітинах-мішенях як індукувати, так і блокувати розвиток апоптозу здатні одні й ті ж вірусіндуковані білки [8, 11].

Тому для подальшої розробки проблеми взаємодії фітовірусів з клітинами непригамних ім хазяїв доцільним є вивчення ефектів і механізмів впливу вірусів на широкий спектр клітин-мішеней непригамних хазяїв, які різнилися б за гістогенезом, фенотипічними та іншими характеристиками. Зокрема, метою даної роботи було дослідження трансфекційних властивостей і впливу інтактного ВТМ та його РНК на клітини лімфоїдного і епітеліального походження.

Матеріали і методи. Дослідження здійснювали з ізолятом ВТМ, виділеним з троянди ефіроолійної та здатним, як було показано раніше [4], індукувати складання вірусоподібних часток у клітинах HeLa. ВТМ накопичували на рослинах *Nicotiana tabacum*. Патоген виділяли і очищували методом диференційного центрифугування на ультрацентрифузі «Beckman» (США) у підвісних стаканах бакет-ротора SW-40 при 30000 об/хв,  $t = 4$  °С, протягом 1,5 год. Для достатнього ступеня очищення вірусного препарату проводили 2—3 цикли диференційного центрифугування. РНК виділяли

перхлоратним та фенольно-детергентним методами, зберігаючи інфекційність геному в кінцевому результаті [12]. Чистоту препаратів РНК визначали спектрофотометрично, для подальших досліджень відбирали препарати РНК, які характеризувалися величиною  $E_{260}/E_{280} = 2,4-2,6$  і  $E_{260}/E_{230} = 2,1-2,3$ . Однорідність виділеної РНК визначали електрофоретично в агарозному гелі (2 %). Інфекційність препаратів РНК перевіряли за стандартною методикою шляхом інокуляції половинок листя *Chenopodium amaranticolor*, *Datura stramonium*, *Nicotiana glutinosa*. Концентрація інфекційної РНК ВТМ у дослідах становила 20—25 мкг/мл.

У дослідах з трансфекції використовували клітини лінії ПТП (нетрансформовані клітини яєчка поросяти) та клітини ОН-1 (клітинна лінія, одержана з лімфоми, що виникла у мишей лінії А після введення їм у черевну порожнину культури *Vac. megaterium* Н) [13, 14], які були одержані з банку клітинних ліній Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України.

Використано два варіанти інфікування клітин: нативним ВТМ та РНК вірусу. Для інфікування (або трансфекції) застосовували ДЕАЕ-декстрановий метод [15]. Клітини протягом 30—45 хв інкубували з ДЕАЕ-декстраном (500 мкг/мл), потім його видаляли та вносили РНК ВТМ (200 нг/мл) або інтактний вірус (100—120 мкг/мл). Клітини з ВТМ або його РНК інкубували при  $t = 37$  °С протягом 45—60 хв, далі ВТМ або його РНК видаляли, культури відмивали розчином Хенкса і заливали середовищем 199 з сироваткою великої рогатої худоби (10 %). Контролем служили інтактні клітини та клітини, інкубовані з ДЕАЕ-декстраном. Через 24 год після інфікування (трансфекції) культури пересаджували до флаконів, які містили покривні скельця (по  $2 \cdot 10^7$  клітин) і культивували в середовищі, описаному вище. Морфологію контрольних та дослідних культур досліджували протягом 1—7 діб методом світлової мікроскопії, використовуючи забарвлення клітин гематоксилін-еозинном. Кожний варіант досліджень повторювали п'ятикратно.

Визначення синтезу вірусіндукованих білків проводили за допомогою непрямого методу імунофлюоресценції (ІФ), використовуючи антивірусну кролячу сироватку (Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН, Україна) і мічену ФІТЦ антикролячу сироватку (НДІ епідеміології та мікробіології ім. М. Ф. Гамалії, Росія), та електронної мікроскопії, які проводили за загальноприйнятими методиками [16, 17]. При негативному контрастуванні препаратів для електронної мікроскопії кори-

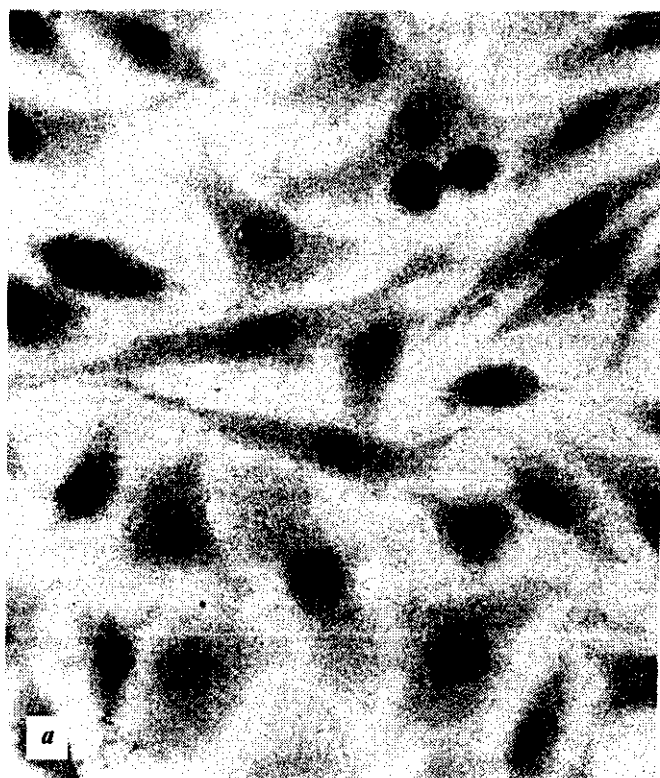
стувалися 2 %-м розчином фосфорновольфрамової кислоти, рН 7—7,4. Інфекційність новосинтезованих вірусних часток визначали шляхом біологічного титрування на згаданих вище рослинах — індикаторах ВТМ.

**Результати і обговорення.** Результати порівняння культур клітин, оброблених ДЕАЕ-декстраном, з інтактними клітинами показали, що після такої обробки клітини обох ліній практично не змінені. Відмічено, що після інфікування (трансфекції) клітини обох ліній пересадилися нормально, тобто початковий етап інфекції (первинна взаємодія вірусних часток або РНК з клітинами-мішенями) не вплинув на життєздатність ні лімфоїдних, ні епітеліальних клітин. При подальшому спостереженні в інфікованих клітин на 3—5-ту добу виявлялися морфологічні зміни. Для культури ОН-1 вплив інфекції ВТМ або його РНК проявляється в тому, що в моношарі з'являлися клітини (від 8 до 25 %), які значно збільшені за розміром, їхня цитоплазма рихла з вакуолізованими ділянками, часто зустрічається багатоядерність (рис. 1, А). Однак чітких змін у структурі моношару клітин не спостерігали.

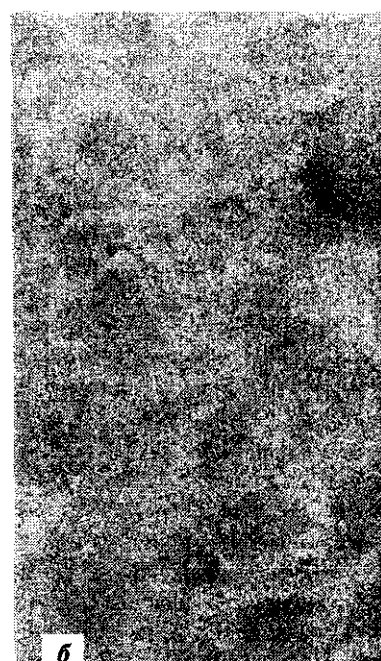
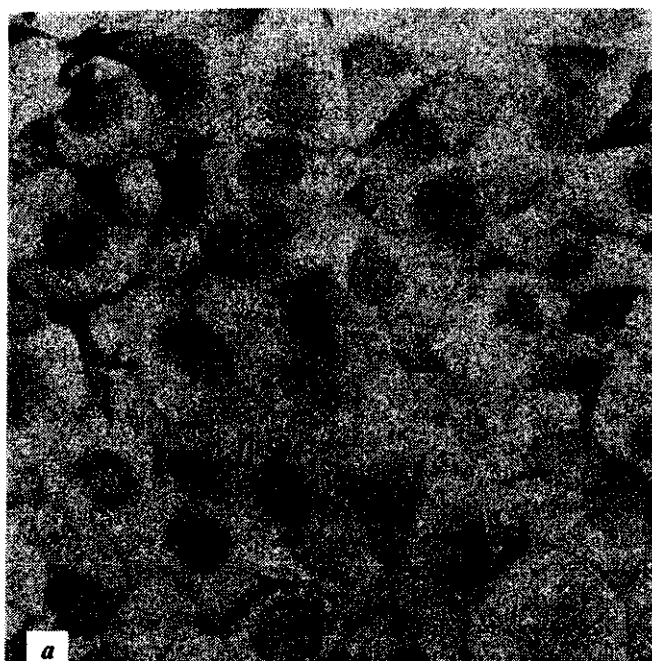
Стосовно культури клітин ПТП можна відмітити, що за розміром та морфологією контрольні і дослідні клітини не відрізняються. Але моношар останніх був менш щільним і в ньому зустрічалися сильно вакуолізовані клітини (клітини, заповнені «пухирцями») (рис. 1, Б). Відомо, що поява клітин із значною вакуолізацією ядра і цитоплазми та з «випинанням» окремих ділянок клітинної мембрани («пухирцевих» клітин), що в подальшому починають забарвлюватися вітальними барвниками, є одним з морфологічних проявів первинної реакції клітин-мішеней на дію факторів — індукторів апоптозу [18]. Проте в жодній з культур ми не спостерігали появи типових апоптичних тілець. Основною відмінністю в інфікуванні культур ВТМ і РНК вірусу було збільшення кількості морфологічно змінених клітин у варіанті з РНК.

Методом ІФ встановлено, що в інфікованих клітинах обох ліній виявляються антигени ВТМ (таблиця). Значно вищий відсоток флюоресценції (кількість клітин, в яких спостерігали флюоресценцію, на 100 підрахованих) у варіанті з РНК ВТМ може бути наслідком низької ефективності методики трансфекції по відношенню до великих біомолекул. Результати ІФ дають змогу простежити, що вищий відсоток флюоресценції клітин у випадку з РНК ВТМ корелює із збільшенням морфологічно змінених клітин при цьому варіанті інфікування. Тобто за всіма показниками транс-

БОЙКО А. Л. ТА ІН.



*A*



фекція РНК вірусу є ефективнішою, ніж інфікування нативним вірусом (таблиця).

У гомогенаті інфікованих клітин (ПТП і ОН-1) за допомогою електронного мікроскопа виявлялися вірусоподібні частки розміром 120—350 нм, що мали типову для ВТМ форму (рис. 2). Крім того, в полі зору електронного мікроскопа спостерігались окремі субдиниці та фрагменти часток різного розміру. Ці гомогенати (без додаткової концентрації) виявляли інфекційність на таких рослинах, як *Ch. amaranticolor*, *Ch. album*, *D. stramonium*, що на 10—14-й день проявляли чітко відмічену некротичну реакцію та часткове скручування листя (рис. 3). Симптоми спостерігали у 70—80 % інокульованих рослин.

Порівняння результатів, одержаних на клітинах ліній ОН-1 і ПТП, з даними проведених раніше досліджень, в яких вивчали вплив трансфекції РНК ВТМ на клітини лінії HeLa, показує, що репродукція ВТМ може відбуватися в різних за походженням клітинах — як в епітеліальних, так і в лімфоїдних. Але реакція клітин різних ліній на інфікування ВТМ має певні особливості. Найбільш різкі зміни (виражена деградація моношару) описані в клітинах лінії HeLa, одержаної з раку шийки матки, найменші зміни — в культурі нетрансформованих епітеліальних клітин (лінія ПТП). Здається ймовірним припущення щодо наявності у ВТМ онкотропних властивостей, проте це питання вимагає подальшої розробки.

Аналізуючи матеріали наших досліджень, можна також відзначити, що в клітинах ссавців ВТМ та його РНК ведуть себе неоднозначно. Процес репродукції вірусу та реплікація його геному може проходити за аналогією з рослинною клітиною. При цьому складання вірусоподібних часток залежить від реплікації геному та «запиту» ним відповідних білків, які знаходяться у клітинах ссавців.

Частота клітин, які містять антигени ВТМ (на 5-ту добу після інфікування)

Культура	Варіант зараження	Флюоресценція, %
ПТП	Інтактний ВТМ	3,4±0,8
	РНК ВТМ	14,3±2,4*
	Контроль	0,0±0,0
ОН-1	Інтактний ВТМ	4,3±1,2
	РНК ВТМ	17,6±1,9*
	Контроль	0,0±0,0

\* $p < 0,05$  порівняно з культурами, які були інфіковані інтактним ВТМ.



Рис. 2. Електронграфії ВТМ троянди ефіроолейної ( $\times 43000$ ) (а) та вірусоподібних часток, які виявлялися після трансфекції клітин лінії ОН-1 РНК ВТМ троянди ефіроолейної ( $\times 123000$ ) (б)

Тим більш відомо, що в процесі репродукції вірусу важливу роль відіграють клітинні білки, які знаходять у високоочищеному полімеразному комплексі, що бере участь у репродукції ВТМ. Так, на інфікованих листках тютюну показано, що в реплікативному комплексі ВТМ виявляють клітинний фактор елонгації синтезу білка EF1. У репродукції ВТМ беруть участь білки, один з яких споріднений за первинною структурою з фактором ініціації білкового синтезу eIF3. Показано подібність ще одного білка репродуктивного комплексу ВТМ до GCD10 дріжджів, який може відігравати певну роль в ініціації трансляції шляхом зв'язування вірусної РНК з 18S рРНК [19].

Висновки. Таким чином, при трансфекції клітин ссавців РНК ВТМ реплікація вірусної РНК, синтез вірусних білків та складання ВТМ-подібних часток, що мають інфекційну активність, спостерігаються в клітинах різного походження: епітеліаль-

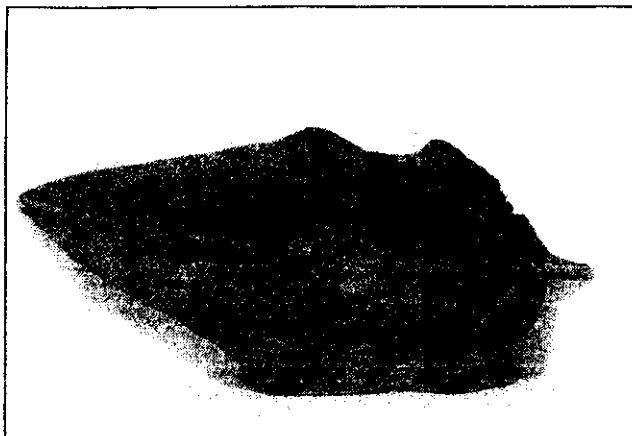


Рис. 3. Некрози на рослинах *Datura stramonium* після інюкуляції гомогенатом інфікованих клітин лінії ОН-1 (11-та доба після інюкуляції)

них (ПТП) та лімфоїдних (ОН-1). Але морфологічні зміни інфікованих ВТМ культур залежать від типу клітин: для культури ОН-1 характерними ознаками є збільшення розмірів клітин та їхня багатоядерність, для ПТП — порушення моношару і вакуолізація клітин.

A. L. Boyko, S. S. Kyrjachenko, O. Yu. Yudina, Z. D. Savtsova

Influence of TMV and RNA TMV on culture of cells different origin

Summary

The assemblage of virus-like particles, which showed the infection on plants-indicators, has been observed after transfection RNA of TMV in ОН-1 (the line is obtained from mouse lymphomas line A appeared after introduction of *Vac. megaterium* H) and PTP (the line is obtained from pig egg cells). The morphological changes of infected cells, which are correlated with accumulation virus-specific antibody in cells, were observed beginning from third day.

A. Л. Бойко, С. С. Кирьяченко, О. Ю. Юдина, З. Д. Савцова

Влияние ВТМ и его РНК на культуры клеток разного происхождения

Резюме

В клетках ОН-1 (линия, полученная из лимфомы мышей линии А, возникшей после введения *Vac. megaterium* H) и ПТП (линия получена из клеток яичка поросенка) после трансфекции РНК ВТМ наблюдали сборку вирусоподобных частиц, проявляющих инфекционность на растениях-индикаторах. Начиная с 3-х сут, наблюдаются морфологические изменения инфицированных клеток, выраженность которых коррелирует с накоплением в клетках вирусоспецифических антигенов.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Московец С. М., Бойко А. Л., Жукова Л. Н. Вирус тютюнової мозаїки на рослинах троянди // Доп. АН УССР. Серія Б.—1971.—№ 6.—С. 461—464.
2. Чернюк С. О., Кир'яченко С. С. Характеристика ізолятів

- ВТМ рослин заповідника Асканія-Нова та Канівського державного заповідника // Інтродукція та збереження рослинного різноманіття.—2000.—№ 3.—С. 69—71.
3. Бойко А. Л., Степанюк С. А., Гарифулін О. М. Сиквенс кДНК С-концевої послідовності капсидного білка ВТМ-ізолята томата із району радіологічного забруднення // Біополимери і клітка.—1996.—12, № 5.—С. 101—106.
4. Бойко А. Л., Носач Л. Н., Токарчук Л. В., Дяченко Н. С. Взаємодія РНК штамма ВТМРЭ і ВМРЭ з клітками HeLa // Докл. АН УССР.—1981.—№ 3.—С. 56—60.
5. Жданов В. М. Репродукція ВТМ в ізолюваних мітохондріях печені крыси // Докл. АН СРСР.—1971.—199, № 4.—С. 944—947.
6. Тайкова Н. В., Ігнатенко Т. О., Кир'яченко С. С., Молчанець О. В. Вплив ВТМ на функціональну активність макрофагів білих мишей // 2-га Міжнар. конф. «Біоресурси та віруси» (Київ, 7—10 вересня 1998 р.).—Київ, 1998.—С. 104.
7. Eick D., Hermeking H. Viruses as pacemarkers in the evolution of defense mechanisms against cancer // Trends Genet.—1996.—12.—Р. 4—6.
8. Teodoro J. G., Branton P. E. Regulation of apoptosis by viral gene products // J. Virol.—1997.—71.—Р. 1739—1746.
9. Савцова З. Д., Гриневич Ю. А., Менек Т. А., Леонов Ю. И., Усач О. М. Вирусные инфекции, ассоциированные с онкологическими заболеваниями // Сучасні інфекції.—2000.—№ 3.—С. 70—88.
10. Бутенко З. А., Фильченков А. А. Современные представления о вирусном онкогенезе: фундаментальные и прикладные аспекты // Эксперим. онкология.—2000.—22.—С. 239—245.
11. Фильченков А. А., Стойка Р. С. Онкогенез и рак.—К.: Морионе, 1999.—184 с.
12. Атабеков И. Г. Практикум по общей вирусологии.—М.: МГУ, 1981.—190 с.
13. Затула Д. Г., Завальнюк А. К., Лисовенко Г. С., Сядро Т. А. Индукция опухолей у мышей с помощью *Vac. megaterium* H, имеющей общие антигенные детерминанты со злокачественными клетками // Эксперим. онкология.—1981.—3, № 5.—С. 48—50.
14. Затула Д. Г., Лихтенштейн В. Е., Жмарева Е. Н., Завелевич М. П., Верхуцкий П. П. Морфология перевиваемых культур мышечных лимфом, индуцированных *Vac. megaterium* H // Тр. III Всесоюз. конф. «Современные методы морфологического исследования в теоретической и практической онкологии».—Тбилиси, 1983.—С. 118.
15. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual.—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1989.—Р. 16.41—16.44.
16. Гнутова Р. В. Серология и иммунохимия вирусов растений.—М.: Наука, 1993.—301 с.
17. Киселев Н. А. Электронная микроскопия биологических макромолекул.—М.: Наука, 1965.—146 с.
18. Кудрявец Ю. И., Фильченков А. А., Абраменко И. В., Полищук Л. З., Слуквин И. Н., Белоус Н. И. Динамика апоптических событий, индуцированных фактором некроза опухолей в лейкозных клетках U-937 // Эксперим. онкология.—1996.—18.—С. 353—365.
19. Osman T. A. M., Buck K. W. The tobacco mosaic virus RNA polymerase complex contains a plant protein related to the RNA-binding subunit of yeast eIF-3 // J. Virol.—1997.—71.—Р. 6075—6082.

УДК 576.8:576.3  
Надійшла до редакції 24.012001