

## CONTRIBUŢII LA STUDIUL ACIZILOR NUCLEINICI VIRALI

### 2. Cercetări în legătură cu acţiunea antigenă a acidului ribonucleinic al virusului Cocksackie.

(Notă preliminară).

V. Blazsek

Recent au apărut mai multe studii care se ocupă de proprietăţile antigene ale acidului dezoxiribonucleinic (de aici înainte ADN 1—11, 13). Cu ajutorul ADN de cea mai variată origine (din timus, splină, sarcomul de şoarece, hering, bacterieni etc.) în serul animalelor imunizate s-a pus în evidenţă prezenţa unor anticorpi specifici. De asemenea în serul bolnavilor de lupus eritematos s-au găsit anticorpi care reacţionează cu diferiţi ADN de origine umană şi animală. Prezenţa anticorpilor a fost pusă în evidenţă prin fixarea de complement şi cu ajutorul metodei de difuzie în agar. Dezoxiribonucleaza şi alţi agenţi care depolimerizează ADN, au inhibat reacţia. Fermentii proteolitici şi agenţii proteinodenaturanţi nu au avut nici un efect din acest punct de vedere. Cu toate că numeroase comunicări relatează despre unele rezultate pozitive, totuşi nu fiecare cercetător a reuşit să dovedească proprietatea antigenă a ADN. (12, 14, 15). Problema nu e considerată închisă, deoarece cu ajutorul

procedeele utilizate la prepararea ADN, proteina prezentă nu poate fi îndepărtată în întregime, (16) astfel încât și aceasta poate produce anticorp. În afara de acest lucru, acizii nucleinici, avind moleculele intens polare, formează foarte ușor cu proteinele complexe insolubile, care imită precipitatele imunspecifice. Aceste surse de erori nu pot fi evitate de experiențele efectuate in vitro. În legătură cu acțiunea antigenă a acidului ribonucleic (ARN) nu dispunem de date literare, deși studiarea acestei probleme este importantă și în ceea ce privește cunoașterea proprietăților antigene ale virusurilor.

La cercetarea proprietăților imunologice ale acizilor nucleinici, acizii nucleinici virali pot fi utilizați în condiții foarte bune, pe de o parte pentru că, folosind cele mai noi procedee, acizii nucleinici virali pot fi produși în stare pură, deproteinizată (17, 18, 19), iar pe de altă parte, fiindcă în cursul preparării ARN nu își pierde proprietățile biologice, păstrându-și infecțiozitatea. Această proprietate a ARN viral face posibilă efectuarea experiențelor in vivo, în care putem exclude reacția nespecifică, deoarece în caz de reacție imunspecifică de neutralizare, infecțiozitatea este suprimată.

În cursul experiențelor noastre am urmărit să stabilim dacă ARN extras din virusul Cocksackie are o acțiune antigenică și care este raportul dintre proteinele virale și acidul nucleinic extras din virus, în ceea ce privește procesele de apărare ale organismului.

Extractele de țesut infecțioase, utilizate pentru imunizare, le-am pregătit printr-un procedeu descris într-o comunicare anterioară (20), cu deosebirea că extractul a fost dializat cu o soluție de NaCl 0,14 M. După îndepărtarea substanțelor cu molecule mici am centrifugat extractul timp de o oră cu 17.000 x g., apoi am utilizat lichidul supernatant transparent. Înainte de extragerea ARN extractul a fost dializat cu un tampon, în modul descris într-o altă lucrare (20). Titrul suspensiei virale și al ARN infecțios precum și gradul de neutralizare al serului au fost efectuate pe șoareci albi a căror vîrstă nu a depășit 24 de ore. Pentru imunizare am utilizat șoareci albi de 18—24 g, aplicînd procedeu descris de Duca și colaboratorii (21).

Conținutul proteinic al suspensiei virale a fost controlat cu ajutorul metodei lui Lowry (22), folosind ca etalon albumină din ser bovin în stare cristalizată, iar conținutul proteinic al ARN a fost controlat cu reacția de microbiuret (20). Din cauza fenolului prezent în urme nu am putut utiliza în acest scop procedeul Lowry. Conținutul în ARN a fost determinat după metoda lui Brown (23).

Unele dintre animalele de experiență au fost imunizate contra virusului, iar altele contra ARN\*. Cantitatea de antigen a fost separată în așa fel încît, atît în suspensia de virus, cît și în soluția de ARN infecțios am adăugat o cantitate identică de ARN. Infecțiozitatea ARN a fost controlată cu ocazia fiecărei inoculări. În toate cazurile, am stabilit și sensibilitatea ARN față de ribonuclează. Din acest fapt am putut deduce lipsa virusului nativ. Datele referitoare la infecțiozitatea antigenilor și la conținutul proteinic și în ARN sînt trecute în tabelul Nr. 1.

Tabelul Nr. 1.

Virusul	ARN infecțios				
	ID <sub>50</sub> *	Proteine μg/ml	ARN μg/ml	ID <sub>50</sub> *	RNS μg/ml
6,6 —	2.440 —	78 —	1,8 —	—**	52,—
9,7	6.630	138	2,2	—	88

\* 10 g. ID<sub>50</sub>\*\* cu reacție microbiuret negativă.

\*\* Și pe această cale exprim mulțumirile mele doctorului Abrahăm Săndor pentru prețiosul ajutor acordat.

Rezultă din aceste date ca între conținutul proteinic al virusului și al ARN există o mare deosebire. ARN poate conține proteine numai în urme (luind în considerare sensibilitatea reacției de biuret); prin urmare în cursul imunizării efectuate cu ARN nu pot să apară antigeni față de proteine.

Reacția de neutralizare cu virus a fost produsă potrivit metodei obișnuite, iar reacția cu ARN cu gamaglobulina preparată din antiser corespunzător, deoarece ribonucleaza prezentă în ser ar fi constituit o sursă de eroare. Rezultatele experiențelor efectuate cu antiser sint trecute în tabelul Nr. 2.

Tabelul Nr. 2.

Experiența	Diluția serului:						
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Virus + AV	+	+	+	+	+	+	+
Virus + SARN	—	—	—	—	—	—	—
Virus + SN	—	—	—	—	—	—	—
ARN + AVG	—	—	—	—	—	—	—
ARN + ARNG	—	—	—	—	—	—	—

AV = ser antiviral; SARN = ser antiARN; SN = ser normal; AVG = gamaglobulină antivirală; ARNG = gamaglobulină anti ARN.

În serul animalelor imunizate cu ARN preparat din virusul Cocksackie A<sub>10</sub> (ARNG) nu am găsit anticorpi care neutralizează ARN. Serul SARN nu a neutralizat virusul, întocmai după cum gamaglobulina preparată din serul antiviral (AV) nu a neutralizat ARN. În schimb, serul animalelor imunizate cu virus avînd o cantitate similară de ARN, a conținut anticorpi la un titru mai ridicat față de virus.

Rezultatele experiențelor arată că ARN preparat din virusul Cocksackie A<sub>10</sub> nu are efect antigen și că organismul produce anticorpi numai împotriva proteinelor virusului. Admițînd că și componentul virusului ar avea un caracter antigen, atunci anticorpii împotriva ARN ar fi apărut și în serul animalelor imunizate cu virus. Se pare că anticorpii de neutralizare sint orientați împotriva învelișului proteinic al virusului total. Probabil că aceste substanțe au împiedicat fixarea de celule a particulelor virale și punerea în libertate a acidului nucleic din învelișul proteinic. În cercetările noastre viitoare vom urmări elucidarea acestei probleme, clarificînd în același timp proprietățile antigene ale proteinelor virale native fără ARN. Dacă proteina din virus se comportă și fără acid nucleic ca un antigen cu valoare completă, atunci proteina nativă din virus poate fi utilizată ca un nou vaccin mai eficace. Suprimarea și inactivarea infecțiozității virusului se pot obține prin îndepărtarea acidului nucleic, evitînd prin aceasta procedeele proteinodenaturante care reduc eficacitatea imunizării. (temperatură, formalină etc.).

Observațiile noastre sint confirmate de următoarele fapte, care fac verosimilă ipoteza formulată mai sus: potrivit constatarilor lui *Castermans* (24) ARN nu are importanță în antigenii de transplantare. *Appleveard* (25), după ce a îndepărtat vaccina virus, a izolat din filtratul culturii de țesut antigeni de natură proteinică (fără acid nucleic!), care a epuizat serul imunic împotriva vaccinei. *Leobenstein* (26) a arătat că proteina nativă a virusului mozaicului de tutun (care nu conține acid nucleic!) previne infecțiile virotice, probabil datorită umplerii receptorilor celulei vegetale atacabile prin virus.

Sosit la redacție: 8 iulie 1961.

#### Bibliografie

1. SEVAG M. G., D. B. LACKMAN, J. SMOLENS: J. Biol. Chem. (1938) 124, 425;
2. LACKMAN, D., S. MUDD, M. G. SEVAG, J. S. MOLENS, M. WIENER: J. Immunol. (1941) 40,1; 3. BLIX V., C. N. ILAND, M. STACEY: Br. J. Exp. Pathol. (1954) 35, 241;

4. CIAMOVA, K. G.: Bull. Eksp. Biol. Med. (1958) 45/2, 89;
5. GOSTYEV, V. S.: Konf. po Nukleinovaia Kislota, Moscova (1959);
6. CIAMOVA, V. S.: idem;
7. PALCZUK, N. G. J., PLESCIA, O. J., W. BRAUN: Fed. Proc. (1961) 20, 22;
8. GROSSMAN, L., D. STOLLAR, K. HERRINGTON: Fed. Proc. (1961) 20, 353;
9. STOLLAR, D., LEVINE, L.: Fed. Proc. (1961) 20, 13;
10. DEICHER, H. R. G., H. HOLMAN, H. G. KUNKEL: J. Exp. Med. (1959) 109, 997;
11. SELIGMANN M.: Immunopathology, I. Intern. Symp. Basel (Selisberg, (1958);
12. OTH. A. A. CASTERMANS: Transplantation Bull. (1959) 6, 418;
13. COLTER J. S., K. A. O. ELLEM: Nature (1961) 190, 550;
14. HASKOVA V., I. HILGERT, M. HRUBESOVA, Z. POKORNA: Folia biol. (Praha) (1959) 5, 304;
15. AVERY O. T., C. M. Mc. LEOD, M. Mc. CARTY: J. Exp. Med. (1944) 79, 137;
16. PHILIPS J. H., W. BRAUN, O. J. PLESCIA: Nature (1958), 181, 573;
17. TOVARNICKII V. I., TIHONENKO T. I.: Usp. sovr. Biol (1960) 49, 2;
18. SPIRIN A. C.: Usp. sovr. biol., (1960) 50, 261;
19. PORTOCALA R.: Stud. cerc. Inframicrobiol, (1960) 11, 597;
20. BLAZSEK V.: Rev. Med. (1961) 7, 3;
21. DUCA E., E. TOMESCU, M. DUCA, A. BOȚAN: Stud. Cerc. Inframicrobiol. (1959) 10, 459;
22. LOWRY O. H., N. J. ROSEBRAUGH, A. L. FARR, R. J. RANDELL: J. Biol. Chem. (1951) 193, 265;
23. BROWN, H. A., Arch. Biochem. (1946);
24. CASTERMANS, A.: Nature (1961) 189, 504;
25. APPLEYARD, G.: Nature (1961) 190, 465;
26. LOEBENSTEIN G.: Nature (1960) 185, 122.