

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXXV, 2

SECTIO C

1980

Institut Mikrobiologii UMCS, Zakład Mikrobiologii Stosowanej

Irena SUJAK, Teresa KARPİŃSKA,
Zbigniew KAWECKI

Wpływ dodatku kationów dwuwartościowych na replikację wirusa krowianki

Влияние добавления двухвалентных катионов на репликацию вируса осповакцины

Influence of Divalent Cations on the Replication of Vaccinia Virus

WSTĘP

Do prawidłowego metabolizmu i wzrostu komórek potrzebne są odpowiednio dobrane jakościowo i ilościowo jony metali, które zachowują równowagę przemian metabolicznych komórki. W wielu przypadkach przebieg procesów metabolicznych zależy od obecności specyficznych jonów metali. Znanych jest wiele etapów syntez komórkowych kontrolowanych przy współdziałaniu jonów metali w różnych systemach syntez wtórnych oraz przy inicjacji procesów morfogenezy (2, 5, 15, 17, 24). Różnorodne działanie jonów metali i ich znaczenie dla organizmów zwierzęcych zostało szeroko opisane w literaturze polskiej w kilku pracach przeglądowych (11, 18, 25). Badając wpływ kationów na wirusy wykazano, że poszczególne etapy replikacji wirusa zależne są od obecności kationów dwuwartościowych (7, 9, 12, 14, 16), co prawdopodobnie było związane z działaniem kationów raczej na komórkę gospodarza niż na sam wirus. Uważa się bowiem, że równowaga kationów w komórce może mieć zasadnicze znaczenie przy zakażeniu komórki różnymi pasożytami wewnątrzkomórkowymi (22). Celem przedstawionej pracy było zbadanie dodatku kationów dwuwartościowych Ba^{++} , Ca^{++} i Mg^{++} na replikację wirusa krowianki w hodowli komórek Detroit 6.

MATERIAŁY I METODY

Wirus krowianki (*vaccinia virus*) izolowano ze szczepionki otrzymanej z Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Lublinie. Wirus namnażano na błonie kosmówkowo-omoczniowej zarodka kury. Do badań stosowano wirus pasażowany w hodowli komórek Detroit 6, otrzymanej z Instytutu Medycyny Morskiej w Gdańsku.

Płynty do hodowli. Do badania komórek w obecności kationów używano buforu Earle'a z 2% surowicy cielęcej. Węglan, czerwień i antybiotyki dodawano w ilościach standardowych. Stosowany w badaniach bufor Earle'a nazywano dalej podłożem minimalnym „M”.

Kationy. Sporządzano 1 M roztwory chlorków baru, wapnia i magnezu w wodzie bidestylowanej. Roztwory te używano jako materiał wyjściowy do dalszych rozcieńczeń. pH poszczególnych rozcieńczeń badanych kationów w buforze Earle'a doprowadzano do 7,0—7,2.

Toksyczność kationów. Do 6 probówek jednowarstwowej 48-godzinnej hodowli komórek Detroit 6 dodawano (po zlanii płynu odżywczego) po 2 ml odpowiedniego stężenia kationów Ba^{++} , Ca^{++} i Mg^{++} (od 10^{-3} do $10^{-7}M$) w płynie „M”. Po 48-godzinnej inkubacji w $37^{\circ}C$ rozcieńczenia kationów zlewano z hodowli. Trzy probówki z hodowlą komórek Detroit 6 z każdego rozcieńczenia danego kationu przemywano płynem „M”, trypsynowano, zawieszano w określonej ilości płynu odżywczego, obliczano ilość komórek w 1 ml i ponownie rozlewano po 2 ml do probówek. Po 48-godzinnej inkubacji w $37^{\circ}C$ jeszcze raz obliczano ilość komórek w 1 ml w celu stwierdzenia, czy komórki namnażają się normalnie w porównaniu z kontrolą, którą stanowiły hodowle komórek Detroit 6 w płynie odżywczym, opracowane w ten sam sposób. Trzy inne probówki z danego rozcieńczenia odpowiedniego kationu barwiono przyżyciowo 0,1% roztworem czerwieni obojętnej i 10% barwnikiem Giemsy. Wybarwione hodowle obserwowano pod mikroskopem.

Inaktywacja wirusa. Do odpowiedniego stężenia kationów Ba^{++} , Ca^{++} i Mg^{++} (od 10^{-3} do $10^{-7}M$) w ilości 0,9 ml dodawano 0,1 ml wirusa krowianki nie rozcieńzonego. Następnie inkubowano 1, 2, 3, 4, 5 i 6 godz. w temp. $37^{\circ}C$. Kontrolę stanowił wirus inkubowany w płynie „M”. Po odpowiednim czasie inkubacji sporządzono rozcieńczenia wirusa od 10^{-1} do 10^{-5} i zakażano 48-godziną jednowarstwową hodowlą komórek Detroit 6. Każdym rozcieńczeniem zakażano 4 probówki z hodowlą — po 0,1 ml danego rozcieńczenia na probówkę. Zakażone hodowle inkubowano w $37^{\circ}C$ przez 1 godz. w celu adsorpcji wirusa na komórkach Detroit 6. Po tym czasie ściągano nie zaadsorbowany wirus i zalewano tkankę świeżym płynem „M”, a następnie inkubowano w $37^{\circ}C$. Po 72-godzinnej inkubacji barwiono tkankę 0,1% roztworem czerwieni obojętnej. Po wybarwieniu liczono lisy. Wynik zapisywano jako średnią arytmetyczną z 4 probówek tego samego powtórzenia. Kontrolę opracowywano w ten sam sposób. Obliczano procent hamowania lub stymulacji wirusa przez dane stężenie kationu w stosunku do kontroli.

Wpływ kationów na adsorpcję wirusa. Jednowarstwowe 48-godzinne hodowle komórek Detroit 6 przepłukiwano zimnym płynem M; następnie zakażano hodowlę wirusem w rozcieńczeniu $10^{-4.5}$, co odpowiadało 50 PFU/0,1 ml na probówkę i natychmiast dodawano 1,9 ml odpowiedniego rozcieńczenia kationów. Tak zakażoną hodowlą inkubowano w $4^{\circ}C$ przez 1 godz. w celu adsorpcji wirusa na komórkach Detroit 6. Po godzinie ściągano nie zaadsorbowany wirus wraz z odpowiednim stężeniem kationu. Hodowlę przepłukiwano świeżym płynem

„M” i inkubowano 72 godz. w 37°C. Po inkubacji barwiono tkankę 0,1% roztworem czerwieni obojętnej i liczono lisy. Kontrolę stanowiły hodowle komórek Detroit 6 zakażone wirusem krowianki w płynie „M” bez kationów, opracowywane w ten sam sposób. Wynik zapisywano jako średnią arytmetyczną z 4 próbek tego samego powtórzenia i obliczano procent hamowania adsorpcji w stosunku do kontroli.

Wpływ kationów na penetrację wirusa. Hodowle 48-godzinne komórek Detroit 6 zakażano odpowiednią dawką wirusa zawieszonego w płynie „M” (rozcieńczeniem $10^{-4.5}$, tj. ok. 50 PFU/0,1 ml na próbkę). Zakażone hodowle inkubowano w temp. 4°C przez 1 godz. w celu adsorpcji wirusa. Po zebraniu nie zaadsorbowanego wirusa i przepłukaniu tkanki świeżym płynem „M” zalewano ją 2 ml odpowiedniego rozcieńczenia kationów (od 10^{-3} do $10^{-7}M$) w płynie „M” i inkubowano przez 1/2 godz. w 37°C w celu penetracji wirusa. Kontrolę stanowiły próbki z hodowlą zakażoną wirusem i zalaną płynem „M” bez kationów. Po inkubacji płyn ściągano, tkankę przepłukiwano, a następnie zalewano świeżym „M” i inkubowano w temp. 37°C przez 72 godz. Po tym czasie tkankę wybarwiano czerwinią obojętną i odczytywano liczbę lysin. Procent hamowania penetracji przez kationy obliczano w stosunku do kontroli.

Wpływ kationów na replikację wirusa. Jednowarstwową hodowlę komórek Detroit 6 przepłukiwano płynem „M”. Następnie zakażano hodowlę rozcieńczeniem wirusa $10^{-4.5}$ po 0,1 ml na próbkę, co odpowiadało ok. 50 PFU i inkubowano tkankę przez 1 godz. w 37°C. Po inkubacji ściągano nie zaadsorbowany wirus, przepłukiwano tkankę świeżym płynem „M” ogrzanym do temp. 37°C. Następnie dawano 2 ml odpowiedniego rozcieńczenia kationów (10^{-3} do $10^{-7}M$). Hodowle inkubowano w temp. 37°C przez 24, 48 i 72 godz. Kontrolę stanowiły próbki zakażone tym samym rozcieńczeniem wirusa i zalane płynem „M” bez kationów.

Po 24, 48 i 72 godz. inkubacji zbierano płyny z hodowli — dla każdego stężenia kationów oddzielnie, tkankę zalewano płynem fizjologicznym po 0,5 ml na każdą próbkę i zamrażano w temp. -20°C. Określano miano wirusa w zamrożonych tkankach i płynach zebranych w odpowiednim czasie inkubacji. Zebrane płyny i tkanki zamrażano i sporządzano z nich rozcieńczenia wirusa od 10^0 do 10^{-4} . Kolejnymi rozcieńczeniami zakażano 48-godzinną jednowarstwową hodowlę komórek Detroit 6 (po 0,1 ml danego rozcieńczenia wirusa na próbkę) i inkubowano 1 godz. w temp. 37°C w celu adsorpcji wirusa. Następnie ściągano nie zaadsorbowany wirus, zalewano tkankę świeżym płynem „M” i zakażone hodowle inkubowano 72 godz. w 37°C. Kontrolę opracowywano w taki sam sposób. Po 72 godz. inkubacji tkankę barwiono czerwinią obojętną i liczono lisy. Wynik podano jako średnią arytmetyczną z 4 próbek dla każdego rozcieńczenia. Procent hamowania lub stymulacji procesu wewnątrzkomórkowej replikacji i uwalniania wirusa obliczano w stosunku do kontroli. Wszystkie doświadczenia powtarzano trzykrotnie. Wyniki podano jako średnią arytmetyczną z trzech powtórzeń.

WYNIKI BADAŃ

Przed badaniem wpływu kationów dwuwartościowych na replikację wirusa krowianki w hodowli komórek Detroit 6 wykonano badanie toksyczności testowanych kationów dla komórek Detroit 6 oraz wpływu

tych kationów na zewnątrzkomórkową inaktywację wirusa krowianki w 37°C. Dodanie do płynu „M” kationów Ba⁺⁺, Ca⁺⁺ i Mg⁺⁺ w stężeniach od 10⁻³ do 10⁻⁷ M oraz inkubacja komórek Detroit 6 w 37°C przez 48 godz. w obecności badanych kationów nie powodowały efektu cytotopacyjnego w hodowli. Komórki Detroit 6 po 48 godz. inkubacji z kationami dawały się normalnie pasażować i namnażały się w tym samym czasie co kontrola. Wskaźniki przyrostu komórek inkubowanych z różnymi nietoksycznymi stężeniami kationów niewiele różniły się w porównaniu ze wskaźnikiem przyrostu komórek w kontroli (tab. 1). Wskaźnik przyrostu dla komórek hodowanych w mieszaninie płynów Hanksa i Parkera z dodatkiem 10% surowicy cielęcej był wyższy, co może być związane z obecnością dużych ilości składników odżywczych. Obserwacje mikroskopowe po wybarwieniu komórek czerwienią obojętną i metodą Giemsy wykazywały nieznaczne różnice morfologiczne między komórkami inkubowa-

Tab. 1. Wpływ kationów na namnażanie komórek Detroit 6 w pierwszym pasażu po usunięciu kationów

Influence of cations on the replication of Detroit 6 cells in the first passage after removing cations

Stężenie kationu w M Concentration of cations in M	Liczba kom. ml po 48 godz. inkubacji z kationem Number of cells/ml after 48 hrs. incubation with cations	Liczba kom. ml po 48 godz. inkubacji w płynie „M” po usunięciu kationów Number of cells/ml after 48 hrs. incubation in „M” medium after removing of cations	Indeks przyrostu Increment index
Ba ⁺⁺			
10 ⁻⁴	278 666	880 000	3,1
10 ⁻³	314 200	910 000	2,8
10 ⁻⁵	300 333	895 000	2,9
10 ⁻⁶	301 000	905 000	3,0
10 ⁻⁷	294 300	960 000	3,2
Ca ⁺⁺			
10 ⁻³	300 000	925 000	3,1
10 ⁻⁴	320 000	899 000	2,8
10 ⁻⁵	298 000	980 000	3,2
10 ⁻⁶	340 000	987 000	2,9
10 ⁻⁷	315 000	975 000	3,1
Mg ⁺⁺			
10 ⁻³	305 000	967 000	3,1
10 ⁻⁴	299 000	878 000	2,9
10 ⁻⁵	289 000	890 000	3,0
10 ⁻⁶	320 000	940 000	2,9
10 ⁻⁷	311 000	920 000	2,9
Kontrola Controls			
w płynie „M” in „M” medium	304 983	950 000	3,1
w 10% H+P in 10% H+P	491 000	1 854 000	3,7

Tab. 2. Wpływ Ba^{++} , Ca^{++} , Mg^{++} na pozakomórkową inaktywację wirusa kro-
wianki w temp. $37^{\circ}C$ Influence of Ba^{++} , Ca^{++} , Mg^{++} on the extracellular inactivation of vaccinia
virus at $37^{\circ}C$

Czas in- aktywacji w godz. Inactiva- tion time in hrs.	Stężenie kationu w M Cation concentra- tion in M	Liczba łysin * Number of plaques *			Procent łysin ** Plaques in % **			Zmiana liczby łysin w % w czasie *** Variations in plaque number in % in time ***		
		Ba	Ca	Mg	Ba	Ca	Mg	Ba	Ca	Mg
1	Kontrola	42	42	42	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	10^{-3}	44	41	41	104,2	97,6	97,6	104,2	97,6	97,6
	10^{-4}	43	39	40	102,4	92,8	95,2	102,4	92,8	95,2
	10^{-5}	46	38	41	109,5	90,5	97,6	109,5	90,5	97,6
	10^{-6}	45	40	42	107,1	95,2	100,0	107,1	95,2	100,0
	10^{-7}	47	46	43	111,9	109,5	102,4	111,9	109,5	102,4
2	Kontrola	41	41	41	100,0	100,0	100,0	97,6	97,6	97,6
	10^{-3}	43	39	41	104,9	95,1	100,0	102,4	92,8	97,6
	10^{-4}	43	37	41	104,9	90,2	100,0	102,4	88,1	97,6
	10^{-5}	42	40	42	102,4	97,6	102,4	100,0	95,2	100,0
	10^{-6}	41	40	41	100,0	97,6	100,0	97,6	95,2	97,6
	10^{-7}	41	42	44	100,0	102,4	107,3	97,6	100,0	97,6
3	Kontrola	37	37	37	100,0	100,0	100,0	88,1	88,1	88,1
	10^{-3}	35	38	36	94,6	102,7	97,3	81,5	90,5	85,1
	10^{-4}	33	41	37	89,2	110,8	100,0	78,5	97,6	88,1
	10^{-5}	37	43	37	100,0	116,2	100,0	88,1	102,4	88,1
	10^{-6}	36	42	29	97,3	113,3	78,4	85,1	100,0	69,0
	10^{-7}	38	41	37	102,7	110,8	100,0	90,5	97,6	88,1
4	Kontrola	34	34	34	100,0	100,0	100,0	80,1	80,1	80,1
	10^{-3}	36	32	35	105,9	94,1	102,9	85,1	76,2	81,5
	10^{-4}	38	31	33	111,8	91,2	97,1	90,5	75,0	78,6
	10^{-5}	37	34	35	108,8	100,0	102,9	88,1	80,1	81,5
	10^{-6}	35	34	36	102,9	100,0	105,9	81,5	80,1	85,1
	10^{-7}	37	35	34	108,8	102,9	100,0	88,1	81,5	80,1
5	Kontrola	28	28	28	100,0	100,0	100,0	66,7	66,7	66,7
	10^{-3}	23	30	33	82,1	101,1	117,8	54,2	71,4	78,6
	10^{-4}	23	29	32	82,1	103,6	114,3	54,2	71,4	78,6
	10^{-5}	26	29	34	92,8	103,6	121,4	54,2	69,0	76,2
	10^{-6}	25	30	33	89,3	101,1	110,7	61,9	69,0	80,9
	10^{-7}	28	31	31	100,0	100,0	100,0	59,5	71,4	78,6
6	Kontrola	24	24	24				57,1	57,1	57,1
	10^{-3}	21	25	29	81,5	104,2	120,8	50,0	59,5	69,0
	10^{-4}	21	27	27	81,5	112,5	112,5	50,0	64,3	64,3
	10^{-5}	23	25	29	95,8	104,2	120,8	54,2	59,5	69,0
	10^{-6}	20	26	26	83,3	108,3	108,3	47,6	61,9	61,9
	10^{-7}	22	26	28	91,7	108,3	116,7	52,4	61,9	66,7

* Liczba łysin w rozc. $10^{-4,5}$.* Number of plaques in dilution $10^{-4,5}$.

** Procent łysin obliczano w stosunku do kontroli w danym czasie.

** Percentage of the plaques was estimated in relation to the control in the given time.

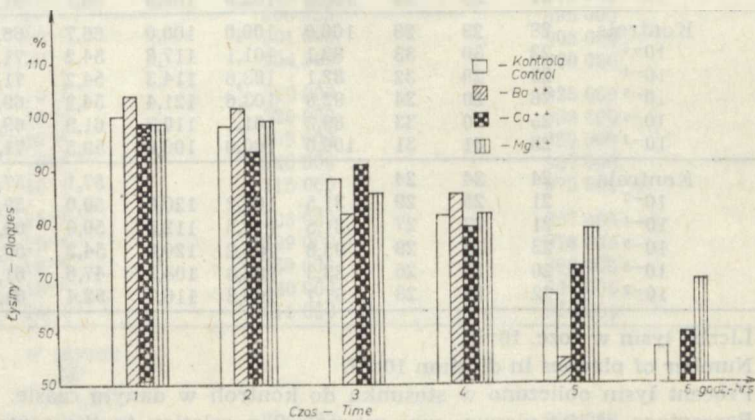
*** Zmianę liczby łysin obliczano w stosunku do kontroli po 1 godz.

*** Variations in the plaque number were estimated in relation to the control after 1 hr.

nymi z kationami a kontrolą. Dotyczyło to przede wszystkim najwyższych stężeń kationów, tj. 10^{-3} i 10^{-4} M. Komórki inkubowane z tymi stężeniami kationów były lekko zaokrąglone i silniej załamywały światło. Zmiany te nie miały jednak wpływu na dalsze namnażanie komórek w czasie 48 godz. po usunięciu kationów (tab. 1). W mniejszych stężeniach kationów zmiany te były mniej wyraźne, a w najniższych, tj. 10^{-7} M, nie obserwowano żadnych zmian mikroskopowych. Badając wpływ Ca^{++} , Ba^{++} i Mg^{++} na inaktywację pozakomórkową wirusa krowianki w 37°C wykazano, że w pierwszych dwóch godzinach inkubacji wirusa w płynie „M” z dodatkiem odpowiednich stężeń kationów oraz w kontroli miano wirusa prawie nie uległo zmianie (tab. 2). Po 5—6 godz. inkubacji nastąpił wyraźny spadek miana wirusa w kontroli, a w płynach z dodatkiem różnych stężeń kationów — nieco mniejszy niż w kontroli. Natomiast w obecności Ca^{++} i Mg^{++} obserwowano wyraźną stabilizację. Dla Ba^{++} różnice te były mniej wyraźne, a miano wirusa zbliżone do miana w kontroli (ryc. 1).

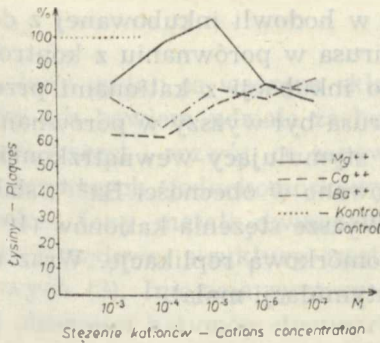
Wykazano hamujący wpływ Ba^{++} , Ca^{++} i Mg^{++} na adsorpcję wirusa krowianki w komórkach Detroit 6. Procent zahamowania adsorpcji był najwyższy w przypadkach Ca^{++} , następnie Ba^{++} w stężeniach 10^{-3} i 10^{-4} M. Dodatek Mg^{++} tylko nieznacznie wpływał na proces adsorpcji wirusa krowianki do komórek Detroit 6 (ryc. 2).

Badane kationy działały hamująco na penetrację wirusa krowianki. Najsilniejszy efekt powodowało dodanie Ca^{++} , natomiast najslabszy Mg^{++} (ryc. 3). Badano uwalnianie się wirusa do płynu utrzymującego po inkubacji 24, 48 i 72 godz. w 37°C z różnymi stężeniami kationów. W płynie

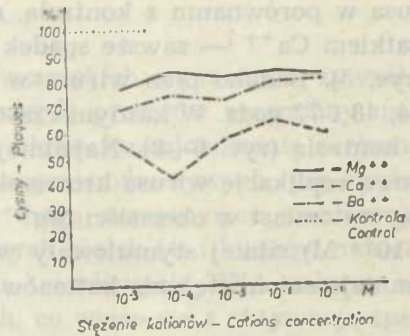


Ryc. 1. Wpływ Mg^{++} , Ca^{++} , Ba^{++} na pozakomórkową inaktywację wirusa krowianki w temp. 37°C

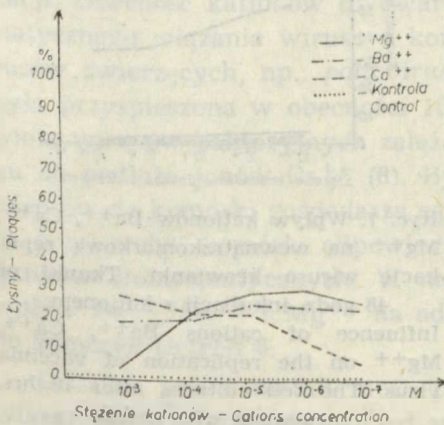
Influence of Mg^{++} , Ca^{++} , Ba^{++} on the extracellular inactivation of vaccinia virus at 37°C



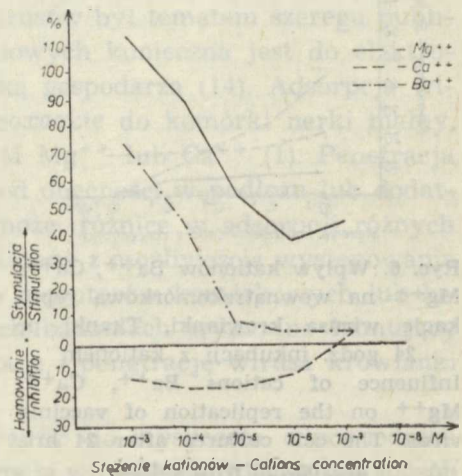
Ryc. 2. Wpływ kationów dwuwartościowych Ba⁺⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ na adsorpcję wirusa krowianki
Influence of divalent cations Ba⁺⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ on the adsorption of vaccinia virus



Ryc. 3. Wpływ kationów Ba⁺⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ na penetrację wirusa krowianki
Influence of cations Ba⁺⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ on the penetration of vaccinia virus



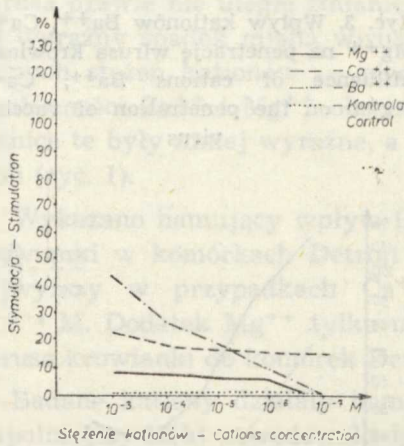
Ryc. 4. Wpływ Ba⁺⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ na wewnątrzkomórkową replikację i uwalnianie wirusa krowianki. Płyn po 48 godz.
Influence of Ba⁺⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ on the intracellular replication and release of vaccinia virus. The Medium after 48 hrs.



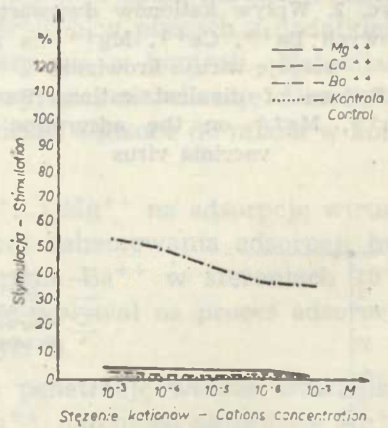
Ryc. 5. Wpływ Ba⁺⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ na wewnątrzkomórkową replikację i uwalnianie wirusa krowianki. Płyn po 72 godz.
Influence of Ba⁺⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ on the intracellular replication and release of vaccinia virus. The Medium after 72 hrs.

zebranym po 24 godz. poza sporadycznymi przypadkami nie wykryto obecności wirusa, natomiast po 48 godz. stwierdzono wirus o mianie wyższym niż w kontroli (ryc. 4). W płynie zebranym po 72 godz. inkubacji z różnymi stężeniami Ba⁺⁺ i Mg⁺⁺ następował zawsze wzrost miana wi-

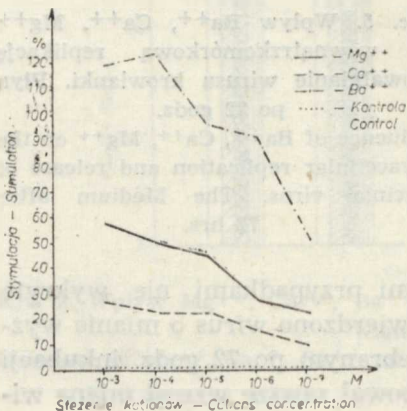
rusa w porównaniu z kontrolą, natomiast w hodowli inkubowanej z dodatkiem Ca^{++} — zawsze spadek miana wirusa w porównaniu z kontrolą (ryc. 5). Badano plon wirusa w tkance po inkubacji z kationami przez 24, 48 i 72 godz. W każdym czasie plon wirusa był wyższy w porównaniu z kontrolą (ryc. 6—8). Najsilniejszy efekt stymulujący wewnątrzkomórkową replikację wirusa krowianki obserwowano w obecności Ba^{++} , słabszy natomiast w obecności Mg^{++} i Ca^{++} . Wyższe stężenia kationów (10^{-3} i 10^{-4} M) silniej stymulowały wewnątrzkomórkową replikację. Wraz ze zmniejszeniem stężenia kationów procent stymulacji malał.



Ryc. 6. Wpływ kationów Ba^{++} , Ca^{++} , Mg^{++} na wewnątrzkomórkową replikację wirusa krowianki. Tkanki po 24 godz. inkubacji z kationem
Influence of cations Ba^{++} , Ca^{++} , Mg^{++} on the replication of vaccinia virus. The cell cultures after 24 hrs. incubation with cation



Ryc. 7. Wpływ kationów Ba^{++} , Ca^{++} , Mg^{++} na wewnątrzkomórkową replikację wirusa krowianki. Tkanki po 48 godz. inkubacji z kationem
Influence of cations Ba^{++} , Ca^{++} , Mg^{++} on the replication of vaccinia virus. The cell cultures after 48 hrs. incubation with cation



Ryc. 8. Wpływ kationów Ba^{++} , Ca^{++} , Mg^{++} na wewnątrzkomórkową replikację wirusa krowianki. Tkanki po 72 godz. inkubacji z kationem
Influence of cations Ba^{++} , Ca^{++} , Mg^{++} on the replication of vaccinia virus. The cell cultures after 72 hrs. incubation with cation

DYSKUSJA

Jony metali są ważnym składnikiem wszystkich organizmów żywych, przy ich bowiem udziale zachodzi cały szereg procesów przemiany materii, wzrost i rozwój, co zapewnia prawidłowe funkcjonowanie zarówno najprostszycy, jednokomórkowych form organizmów żywych, jak i człowieka. Jony metali dwuwartościowych mogą utrzymywać stabilizację trzeciorzędowej struktury cząstek niektórych białek (4) i kwasów nukleinowych (3). Inicjacja syntezy RNA oraz transkrypcja RNA zależne są od obecności kationów dwuwartościowych, co wiąże się z aktywacją specyficznej polimerazy RNA (17). Liczne obserwacje wykazały, że różne typy cykli metabolicznych w komórkach roślin, zwierząt i bakterii zależą od obecności odpowiedniej ilości kationów dwuwartościowych, które zapewniają utrzymanie środowiska reakcji enzymatycznych o odpowiedniej sile jonowej, wpływają na kinetykę i równowagę prawidłowych reakcji metabolicznych oraz zapewniają równowagę wiązań elektrostatycznych (19). Wpływ kationów na replikację wirusów był tematem szeregu publikacji. Obecność kationów dwuwartościowych konieczna jest do elektrostatycznego wiązania wirusa z komórką gospodarza (14). Adsorpcja wirusów zwierzęcych, np.: *poliovirus* i *coxsackie* do komórki nerki małpy, była przyspieszona w obecności 10^{-3} M Mg^{++} lub Ca^{++} (1). Penetracja wielu wirusów bakteryjnych zależała od obecności w podłożu lub dodatku do podłoża jonów Ca^{++} (8). Być może, różnice w adsorpcji różnych wirusów do komórki gospodarza są związane z możliwością występowania na powierzchni komórki odpowiednich receptorów komórkowych lub ładunków elektrostatycznych. W naszych badaniach wykazano hamujący wpływ Ba^{++} , Ca^{++} i Mg^{++} na adsorpcję i penetrację wirusa krowianki do komórek Detroit 6.

Dodatek jonów metali może prowadzić do wysycenia odpowiednich wiązań elektrostatycznych przed adsorpcją wirusa, hamując w ten sposób jego adsorpcję do komórki gospodarza. Badane kationy działały stymulująco na wewnątrzkomórkową replikację i uwalnianie wirusa z komórek Detroit 6. Wyższe stężenia kationów, tj. 10^{-3} — 10^{-4} , silniej stymulowały wewnątrzkomórkową replikację, zmniejszone dawki kationów 10^{-5} do 10^{-7} powodowały zmniejszenie stymulacji. Podobnie Koch i Emse (7) obserwowali zwiększenie uwalniania wirusa *polio* typu I z hodowli nerki małpy w obecności jonów magnezu. Przy zmniejszonych dawkach 10^{-8} M w różnych fazach cyklu replikacyjnego wykazano zmniejszenie uwalniania wirusa. Uzależnione jest to od dawki kationu, jak wykazał Koch (6), i związane z działaniem ATP-azy, której stabilizacja przy pomocy kationów może mieć wpływ na uwalnianie wirusa (16). Scolnik i wsp., badając zapotrzebowanie na kationy dwuwartościowe syste-

mu komórka—wirus wykazali, że polimeraza DNA zależna od RNA, występująca u wirusów białaczki mysiej, raka sutka u myszy i myeloblastozy ptasiej, wymaga obecności jonów Mg^{++} do optymalnej aktywności (16). Dodanie do wczesnych enzymów aktywujących metali dwuwartościowych może powodować, że działają one jak koderepresor lub jako korepresor genu operatora, który kontroluje tworzenie syntetaz dla wtórnego metabolizmu białek w komórce (23). Jest możliwe, że wirusy w czasie ich przebywania poza komórką mogą korzystać z jonów niektórych metali jako z czynników chroniących ich przed podwyższoną temperaturą lub enzymami destrukcyjnymi. W przedstawionych wyżej badaniach obserwowano stabilizację wirusa krowianki w obecności kationów Ca^{++} i Mg^{++} w czasie 5—6 godz. inkubacji w temp. $37^{\circ}C$. Jest to zgodne z obserwacjami Wallisa (20), który wykazał, że sole magnezu zwiększają stabilność enterowirusów i reowirusów w różnych temperaturach, np.: 1 M $MgCl_2$ lub $MgSO_4$ chroni całkowicie populację poliowirusa w temp. $24^{\circ}C$ przez 25 dni i 1—2 godz. w temp. $80^{\circ}C$, podczas gdy kontrole wykazywały odpowiednio tylko 20% przeżywalności i całkowitą inaktywację. Żywa szczepionka doustna *polio* w szczelnie zakorkowanych probówkach o *pH* 6,4 może być przechowywana bez utraty aktywności ok. 1 roku w temp. $4^{\circ}C$, jeżeli zawiera 1 M $MgCl_2$ (10). Większość badań dotyczących działania kationów znalazła praktyczne zastosowanie, np. do zahamowania chorób wirusowych roślin lub przyspieszenia produkcji szczepionki wirusa *polio* oraz do przedłużenia trwałości szczepionki. Czynnione próby zmierzają do zmiany równowagi jonów metali wystarczającej do zmiany szybkości i rozmiaru replikacji wirusa, ale nie powodującej zmian biochemicznych w przemianach własnych komórki gospodarza.

PIŚMIENNICTWO

1. Bachtold J. G., Bubll H. C., Gebhard L.: The Primary Interaction of Poliomyelitis Virus with Host Cells of Tissue Culture Origin. *Virology* **4**, 582, (1957).
2. Bower-Pope D. F., Rubin H.: Magnesium and Calcium Effects on Uptake of Hexoses and Uridine by Chick Embryo Fibroblasts. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **74**, 1585 (1977).
3. Eichhorn G. L.: Metal Ions as Stabilizers of Deoxyribonucleic Acid Structure. *Nature* **194**, 474 (1962).
4. Fuwa K., Wacker W. E. C., Druyan R., Bortholomay A. F., Tallec B. L.: Nucleic Acids and Metals. II. Transition Metals as Determinants of the Conformation of Ribonucleic Acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **46**, 1298 (1960).
5. Keller U., Kleinkouf H.: Studies of the Biosynthesis of Actinomycin in Protoplasts from *Streptomyces antibioticus*. *Arch. Bioch. Biophys.* **184**, 111 (1977).

6. Koch A.: Wozmożnaja swiaz' mieżdu urowniem rozmnożenia poliowirusa i konformacyjej kationpieronosiaszczej ATP-azy kletok hoziaina. Wopr. wirus 5, 627 (1971).
7. Koch A., Emse G.: Action of Cation Transfer ATP-aze Inhibitors on Efficiency of Inhibition with Poliovirus. Acta Microb. Acad. Sci. Hung. 17, 127 (1970).
8. Luria S. E., Stainer D. L.: The Role of Calcium in the Penetration of Bacteriophage T5 into Its Host. Jour. Bact. 67, 635, (1954).
9. Lodish H. F., Froshauer S.: Binding of Viral Glycoprotein in RNA to Endoplasmic Reticulum Membranes is Disrupted by Puromycin. J. Cell. Biull. 24, 358 (1977).
10. Melnick J. L., Wallis C.: Effect of pH on Thermal Stabilization of Poliovirus Vaccine by Magnesium Chloride. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 112, 894 (1963).
11. Muszyńska G.: Jony w katalizie enzymatycznej. Post. Bioch. 16, (1970).
12. Paranchych W.: Stages in Phage R 17 Infection. The Role of Divalent Cations. Virology 28, 90 (1966).
13. Podoplekin V. D., Ivanova T. J.: Stabilization of ECHO Virus Haemagglutinins. I. Thermal Inactivation of Haemagglutinins and Their Cationic Stabilization. Acta Virol. 10, 89 (1966).
14. Puck T. P., Goren A., Clive J.: The Mechanism of Virus Attachment to Host Cells. I The Role of Ions in the Primary Reaction. J. Exp. Med. 93, 65 (1951).
15. Sachdev P., Deb D. L.: Effect of Zinc on Protein and RNA Content in Wheat Plant. J. Sci. Food. Agric. 28, 958 (1977).
16. Scolnick E., Ronds E., Aeronson S. A., Tadoro G. J.: RNA-dependent DNA Polymerase Activity in Five RNA Viruses, Divalent Cation Requirements. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 61, 1789 (1970).
17. Speckhard D. C., Wu F. Y. H., Wu C. W.: Role of the Intrinsic Metal in RNA Polymerase from *Escherichia coli*. In vivo Substitution of Tightly Bound Zinc with Cobalt. Biochemistry 16, 5228 (1977).
18. Szmigielski S., Litwin J.: Cynk w fizjologii i patologii człowieka. Post. Hig. Med. Dośw. 18, 613 (1964).
19. Twu J. S., Horaz R. K., Brefthauer: Nucleotide Pyrophosphatase from Yeast. The Presence of Bound Zinc. Arch. Biochem. Biophys. 184, 249 (1977).
20. Wallis C., Melnick J. L.: Magnesium Chloride Enhancement of Cell Susceptibility to Poliovirus. Virology 16, 122 (1962).
21. Weinberg E. D.: Trace Metal Control of Specific Biosynthetic Processes. Perspectives Biol. Med. 5, 432 (1962).
22. Weinberg E. D.: Roles of Metallic Ions in Host-Parasite Interactions. Bact. Rev. 30, 136 (1966).
23. Weinberg E. D.: Biosynthesis of Secondary Metabolites. Roles of Trace Metals. Adv. Microb. Physiol. Ed. A. H. Rose, J. F. Wilkinson Acad. Press. 4, 1 (1970).
24. Wishnia A., Boussert A. S.: The Non-specific Role of Mg^{++} in Ribosomal Subunit Association Kinetics and Equilibrium in the Presence of the Other Divalent Ions. J. Mol. Biol. 116, 577 (1977).
25. Wysokińska Z.: Mikroelementy o charakterze metabolicznym i ich znaczenie dla ustroju zwierzęcia. Post. Hig. Med. Dośw. 18, 593 (1964).

РЕЗЮМЕ

Изучено влияние добавления двухвалентных катионов бария, кальция и магния на репликацию вируса осповакцины в культуре клеток *Detroit 6*. Эти катионы тормозят адсорбцию и пенетрацию вируса, но стимулируют внутриклеточную репликацию и освобождение вируса из клетки. Эти же катионы действуют стабилизирующе на вирус, находящийся вне клетки. Полученные данные сравнены с данными, приведенными в литературе.

SUMMARY

The effect of divalent cations of barium, calcium and magnesium on the replication of vaccinia virus in Detroit 6 cell cultures was investigated. The results have shown that the cations used in the experiments caused inhibition of the adsorption and penetration of vaccinia virus but stimulated its replication and release. Extracellular particles of vaccinia virus were stabilized by the examined cations.