УДК: 578.825: 578.826: 578.27: 615.281.8

DOI: 10.37621/JNAMSU-2019-4-476-487

«Журнал НАМН України» | 2019 | т. 25 | № 4 | С. 476–87

Робота – фіналіст конкурсу інноваційних розробок «Сходи в МАЙБУТНЄ: відзнака молодих науковців у сфері охорони здоров'я та фармацевтики», 2019 р. (друкується зі скороченнями)

Розвиток патологічного процесу та активність етіотропних препаратів у культурі клітин за вірусної коінфекції

Л. О. Білявська , О. Ю. Повниця, Ю. Б. Паньківська, С. Д. Загородня

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, вул. Заболотного, 154, м. Київ, 03143, Україна

Мета дослідження. Вивчити особливості розвитку патологічного процесу у клітинах за умови моделювання змішаної вірусної інфекції та дослідити дію противірусних препаратів за цих умов.

Матеріали та методи дослідження. Розроблено модель одночасної змішаної інфекції клітин MDBK аденовірусом людини 5 серотипу (Ад-5) та вірусом простого герпесу 1 типу (ВПГ-1). Мітохондріальну активність, ультраструктуру та стан клітинної популяції досліджували з використанням МТТ-аналізу, трансмісійної електронної мікроскопії та проточної цитометрії з барвником пропідій йодид. Інтенсивність репродукції вірусів у клітинах та їхній інфекційний титр вивчали цитоморфологічним методом. Рівень синтезу мажорних білків вірусів-асоціантів аналізували, застосовуючи проточну цитометрію та відповідні моноклональні антитіла.

Результати дослідження. У коінфікованих клітинах виявлено нижчий рівень розвитку патоморфологічних змін порівняно з моноінфекціями, що пов'язано з пригніченням репродукції вірусів-асоціантів. Встановлено, що спільне інфікування клітин ВПГ-1 та Ад-5 призводить до зниження кількості клітин із вірусіндукованими внутрішньоядерними включеннями обох вірусів до 40 % та зниження титрів вірусів на 1,6 lg та 2,6 lg відповідно. Також виявлено пригнічення синтезу основного капсидного білка та глікопротеїнів оболонки вірусу герпесу на 83 % та 64 % відповідно і менш виражене зниження кількості білка гексону аденовірусу (на 17 %). Показано, що мітохондріальна активність коінфікованих клітин порівняно з герпетичною моноінфекцією зростає до 64 %. Дослідження впливу коінфекції на клітинний цикл встановило, що кількість клітин у G1-фазі не змінюється порівняно з обома моноінфекціями, тоді як кількість апоптотичних клітин порівняно

Development of pathological process and activity of etiotropic drugs in cell culture under condition of viral co-infection

L. O. Biliavska , O. Y. Povnitsa, Y. B. Pankivska, S. D. Zagorodnya

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine, 154 Zabolotnoho St., Kyiv 03143, Ukraine

The aim of the study: to investigate the peculiarities of the development of the pathological process in cells in conditions of mixed viral infection and to study the effectiveness of antiviral drugs in this model.

Materials and methods of research. A model of simultaneous mixed infection of MDBK cells with human adenovirus serotype 5 (HAdV-5) and herpes simplex virus type 1 (HSV-1) was developed. Mitochondrial activity, ultrastructure and the state of the cell population were studied using MTT assay, transmission electron microscopy and flow cytometry with propidium iodide dye. The intensity of virus reproduction in cells and their infectious titer were studied by the cytomorphology method. The level of the synthesis of the major proteins of associate viruses was analyzed using flow cytometry and the corresponding monoclonal antibodies.

Results of the research. Co-infected cells demonstrated a lower rate of development of pathomorphological changes compared to mono-infections, related to the inhibition of the reproduction of associate viruses. It was found that the co-infection of cells with HSV-1 and HAdV-5 results in a decrease in the number of cells with virus-induced intranuclear inclusions of both viruses by up to 40 % and viruses titer by 1.6 lg and 2.6 lg, respectively. Inhibition of synthesis of major capsid protein and glycoproteins of the herpes virus by 83 % and 64 %, respectively, and a less pronounced decrease in the amount of adenovirus hexon protein (by 17 %) were also noted. It is shown that the mitochondrial activity of co-infected cells increases to 64 % in comparison with herpetic mono-infection. An analysis of the influence of co-infection on cell cycle revealed that the number of cells in G1 phase remained unchanged compared with both mono-infections, while the number of apoptotic

з герпетичною інфекцією знижується на 24 %. Аналіз ефективності офіційних препаратів Рибавірин та Ацикловір за умов змішаної інфекції показав зниження їхньої антивірусної дії відносно вірусів-асоціантів порівняно з моноінфекціями на 1–2,3 lg.

Висновки. Наявність специфічної інноваційної клітинної моделі змішаної інфекції з дослідженими аспектами перебігу асоційованих інфекцій дає можливість використовувати її для доклінічного дослідження протівірусної активності сполук та отримання нових даних про роль вірус-вірусних взаємодій у розвитку неефективності застосування протівірусних засобів у медичній практиці.

Ключові слова: змішана вірусна інфекція, цитоморфологічні зміни, клітинний цикл, репродукція вірусів-асоціантів, протівірусна активність.

Для цитування: Білявська ЛО, Повниця ОЮ, Паньківська ЮБ, Загородня СД. Розвиток патологічного процесу та активність етіотропних препаратів у культурі клітин за вірусної коінфекції. Журнал Національної академії медичних наук України. 2019;25(4):476–87. DOI: 10.37621/JNAMSU-2019-4-476-487.

Стаття надійшла до редакції 1 грудня 2019 року
Направлена на рецензування 5 грудня 2019 року
Прийнята до друку 25 грудня 2019 року

totic cells compared with herpes infection was reduced by 24 %. An analysis of the official drugs Acyclovir and Ribavirin effectiveness in conditions of mixed infection showed a reduction in their antiviral activity against associate viruses by 1 to 2.3 lg compared to mono-infections.

Conclusions. The presence of a specific innovative cellular model of mixed infection with known aspects of the course of associated infections allows it to be used for preclinical study of antiviral activity of compounds and to obtain new data of the role of viral-viral interactions in the development of inefficient application of antiviral agents in medical practice.

Key words: mixed viral infection, cytomorphological changes, cell cycle, reproduction of associate viruses, and antiviral activity.

For citation: Biliavska LO, Povnitsa OY, Pankivska YB, Zagorodnya SD. Development of pathological process and activity of etiotropic drugs in cell culture under condition of viral co-infection. Journal of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine. 2019;25(4):476–87. DOI: 10.37621/JNAMSU-2019-4-476-487.

The article was received on December 1, 2019
For review, December 5, 2019
Accepted for publication on December 25, 2019

ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРІВ

ВІДДІЛ РЕПРОДУКЦІЇ ВІРУСІВ

Загородня Світлана Дмитрівна – завідувачка, старший дослідник, к.б.н., ORCID: 0000-0002-0892-772X

Білявська Любов Олексіївна – науковий співробітник, к.б.н., ORCID: 0000-0003-3163-2492

Повниця Ольга Юріївна – науковий співробітник, к.б.н., ORCID: 0000-0003-0349-7174

Паньківська Юлія Богданівна — інженер, ORCID: 0000-0002-3344-7103

INFORMATION ABOUT AUTHORS

DEPARTMENT OF REPRODUCTION OF VIRUSES

Svitlana D. Zagorodnya – Cand. Sci. (Biology), Senior Research Fellow, Head of the Department, ORCID: 0000-0002-0892-772X

Liubov O. Biliavska – Cand. Sci. (Biology), Research Fellow, ORCID: 0000-0003-3163-2492

Olga Yu. Povnitsa – Cand. Sci. (Biology), Research Fellow, ORCID: 0000-0003-0349-7174

Yuliia B. Pankivska – Engineer, ORCID: 0000-0002-3344-7103

Liubov O. Biliavska

ORCID: 0000-0003-3163-2492

bilyavskal@ukr.net

ВСТУП

Віруси утримують стійку лідируючу позицію в структурі причин розвитку інфекційних захворювань у світі, й не лише тому, що завжди супроводжуються розвитком уражень різних відділів та систем організму, а й підвищують його сприйнятливості до розвитку вторинних інфекцій, спричинених бактеріями та вірусами [1]. Інтенсивна циркуляція вірусів, короткочасність інфекційного імунітету та високий рівень контактів серед населення створюють умови для виникнення змішаних інфекцій (коінфекцій). Частота розвитку змішаних вірусних інфекцій становить 10–40 %. Розвиток та наслідки змішаних інфекцій залежать від багатьох умов: загального фізіологічного стану організму, біологічних властивостей збудників, ступеня їхньої вірулентності й агресивності, одночасності або послідовності зараження, інтервалів між інфікуванням різними вірусами та умов навколишнього середовища [2]. Приєднання «другого» інфекційного агента може відбуватися не тільки екзогенним, а й ендогенним шляхом, коли при

ослабленні механізмів неспецифічного захисту відбувається активація наявної латентної вірусної інфекції [3–5]. Експериментальні та клінічні дослідження виявили різноманітні механізми, форми та наслідки взаємодії різних вірусів у культурі тканин та на рівні організму: одночасна інфекція може призводити до підвищення патогенезу, зміни тропізму, передачі вірусів або навіть бути необхідною умовою інфекційного процесу коінфікуючих вірусів. У інших випадках вона може бути невинною для окремих вірусів унаслідок зростання конкуренції за ресурси в клітині [3, 6, 7]. Клінічні прояви змішаних інфекцій різноманітні; так, при деяких коінфекціях не відбувається зміни характеру патологічного процесу порівняно з моноінфекцією, хоча у більшості випадків показано, що такі інфекції протікають значно важче та на їхньому фоні частіше виникають різні ускладнення. Тому в значній зоні ризику перебувають особи, які мають хронічні захворювання, цукровий діабет, серцеву недостатність, гострі захворювання печінки та нирок, які зазнали хірургічних втручань, травм тощо [7].

Особливе місце в розвитку змішаних інфекцій посідають віруси, що здатні тривалий час зберігатися в латентному стані в організмі. До таких вірусів належать ДНК-вмісні адено- та герпесвіруси. Аденовіруси здатні персистувати в організмі внаслідок ухилення від взаємодії з імунною системою та можуть реактивуватися під дією екзо- та ендогенних факторів, що особливо небезпечно для пацієнтів із вродженими чи набутими імунodefіцитами [8–10]. Реактивація герпесвірусів відбувається як у періоди пригнічення імунної системи внаслідок використання імуносупресивних препаратів чи асоційованих із хворобою стресів, так і при її активації внаслідок розвитку запальних процесів чи коінфікування іншими патогенами [11, 12]. Деякими дослідниками відзначено факт активації герпетичної та аденовірусної інфекції у вагітних жінок і новонароджених та показано високий відсоток ускладнень протікання вагітності, що характеризуються значними структурними змінами плоду, властивими для кожного із цих збудників. Тропізм вірусів до одних і тих самих тканин створює можливість одночасного інфікування організму-хазяїна з розвитком змішаної вірусної інфекції.

Клінічна діагностика змішаних інфекцій ускладнена з огляду на схожість симптомів із моноінфекціями. Встановлення достовірного діагнозу вимагає обов'язкового лабораторного підтвердження, що дасть можливість з перших годин захворювання отримати вичерпну інформацію про збудників, спрогнозувати характер перебігу і результат захворювання, правильно призначити лікування [13].

На жаль, у багатьох країнах світу обмежена кількість заходів, що застосовуються для подолання розвитку змішаних інфекцій. До них належить максимум констатація епідемічних збудників процесу, а ці дані не дають відповіді на питання, яким саме чином відбувається взаємодія вірусів між собою та роль цього процесу в зміні патогенезу збудника. А найголовнішим є те, що мало даних про дію препаратів за умов коінфекцій.

Перелік препаратів, які використовуються при вірусних захворюваннях, швидко зростає і створює об'єктивні труднощі у виборі адекватної терапії та оцінки її дії. Крім того, успіх виявлення ефективних противірусних засобів залежить не тільки від розробленої сполуки та її структури, а й від вдалого використання дієвої моделі вірусної інфекції [1]. Наразі активно проводяться *in vitro* та *in vivo* дослідження щодо розширення спектру дії існуючих ефективних антивірусних препаратів, але їх активність в умовах змішаної вірусної інфекції практично не досліджена. У той самий час відомо, що використання препарату відносно одного вірусу може значно впливати на репродукцію та поширення супутнього вірусу, знижуючи чи посилюючи ці процеси. Так, наприклад, відомо, що у клітинах, подвійно інфікованих вірусом герпесу та ВІЛ-1 (вірус імунodefіциту людини 1 типу), препарат Ацикловір знижує реплікацію ВІЛ так само ефективно, як і вірусу герпесу. Ацикловір фосфорилується герпетичною кіназою, а потім переходить до безпосереднього пригнічення зворотної транскриптази ВІЛ [14]. Однак серед ВІЛ-інфікованих пацієнтів, коінфікованих вірусом герпесу, близько 10 % мають штами вірусу, резистентні до наявних антигерпетичних препаратів. ВГС (вірус гепатиту С) та ВГВ (вірус

гепатиту В) інфекції практично не впливають на розвиток ВІЛ-інфекції, однак вона посилює реплікацію ДНК вірусів гепатиту та значно підвищує рівень смертності пацієнтів, що пов'язано з розвитком гепатоцелюлярної карциноми. Показано, що використання Тенофовіру за умов змішаної ВІЛ/ВГВ інфекції не призводить до розвитку мутацій полімерази гепатиту В, тоді як дія Ламівудину відносно ВГВ значно підсилюється та зберігається протягом кількох місяців після відміни препарату [15]. Також показано, що у пацієнтів із вірусним гепатитом вищий ризик гепатотоксичної дії антиретровірусних та інших хіміотерапевтичних засобів, що значно ускладнює проведення терапії ВІЛ-інфекції та лікування опортуністичних інфекцій [16]. Тому дослідження противірусної активності сполук із використанням моделей змішаних інфекцій є актуальним та новим напрямом антивірусного скринінгу.

Метою цієї роботи було вивчити особливості розвитку патологічного процесу в клітинах за умови моделювання змішаної вірусної інфекції та дослідити дію противірусних препаратів за цих умов.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для моделювання змішаної інфекції використано культуру епітеліальних клітин MDBK – нирки телят, аденовірус людини 5 серотипу (Ад-5) та вірус простого герпесу 1 типу (ВПГ-1). Клітини та віруси культивували відповідно до стандартних методик [17, 18]. Використовували схему одночасного (коінфекція) інфікування клітин обома вірусами, з множинністю інфікування (моі) 6 ВУО/кл (включення утворюючих одиниць на клітину) для Ад-5 і 0,01 ВУО/кл (бляшкоутворюючих одиниць на клітину) для ВПГ-1. Особливості репродукції вірусів та взаємодії з клітинами за умови змішаного інфікування досліджували через 24–72 години після зараження.

Життєздатність клітин та їхню мітохондріальну активність досліджували з використанням розчину МТТ (Sigma, США) за стандартною методикою [19]. Розвиток патологічного процесу, інтенсивність репродукції вірусів у клітинах та їхній інфекційний титр досліджували цитоморфологічним методом із використанням 0,01 % барвника акридинового оранжевого (Sigma, США), визначаючи відсоток інфікованих клітин за утворенням вірус-специфічних ДНК-вмісних внутрішньоядерних включень [20]. Зразки досліджували в люмінесцентному мікроскопі МЛ-2 (ЛОМО, Росія).

Ультраструктуру інфікованих вірусами клітин досліджували за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії згідно з методикою Bozzola, з незначними модифікаціями [21]. Зрізи клітин аналізували за допомогою мікроскопа JEM-1400 (Jeol, Японія).

Зміни стану клітинної популяції за умов змішаної інфекції виявляли, використовуючи проточну цитометрію та барвник пропідіум йодид (PI, Sigma, США) [20]. Метод дає можливість оцінити відносну кількість клітин на різних стадіях клітинного циклу, структуру клітин, а також виявити апоптотичні клітини, оскільки інтенсивність сигналу PI прямо пропорційна вмісту ДНК. Кількість аналізованих клітин на зразок становила 10 000. Інтенсивність

Рис. 1. Цитоморфологічний аналіз популяції інфікованих клітин MDBK:

1 – неінфіковані клітини;
2 – клітини, інфіковані Ад-5, аденовірусні включення у клітинах мають вигляд зернистого, гранулярного чи центрально-ядерного яскраво-зеленого свідчення, оточеного темною, гомогенною зоною;
3 – клітини, інфіковані ВПГ-1, для герпетичних включень характерне рівномірне, дифузне, димчасто-зелене свідчення ядра та яскраве оранжево-зелене свідчення ядерної мембрани;
4 – коінфіковані клітини з герпетичними синцитіями і включеннями (біла стрілка) та аденовірусними включеннями (чорна стрілка). Люмінесцентна мікроскопія, фіксування клітин 96° етиловим спиртом, фарбування барвником 0,01 % акридиновим оранжевим, x280.

Figure 1. Cytofluorimetric analysis of the population of infected MDBK cells:

1 – uninfected cells;
2 – cells infected with HAdV-5, adenovirus inclusions in the cells look like granular or center-nucleus bright green glow surrounded by a dark, homogeneous zone;
3 – cells infected with HSV-1, for herpetic inclusions is characterized by a uniform, diffuse, smoky-green glow of the nucleus and a bright orange-green glow of the nuclear membrane;
4 – co-infected cells with herpetic syncytia and inclusions (white arrow) and adenoviral inclusions (black arrow). Fluorescence microscopy, cells were fixed with 96° ethanol, stained with 0.01 % solution of acridine orange, magnification x 280.

флуоресценції клітин вимірювали проточним цитометром (Beckman Coulter Epics LX, США) з довжиною хвилі лазера 488 нм. Профілі клітинних циклів були проаналізовані за допомогою програми Flowing Software, версія 2.5.

Особливості синтезу білків вірусів-асоціантів досліджували з використанням проточної цитометрії [22] та кролячих моноспецифічних антитіл до гексона та відростка аденовірусу, отриманих за стандартною методикою Келлера, та до основного білка капсиду (Abscam, Велика Британія) і основних глікопротеїдів ВПГ-1 (Abscam, Велика Британія). Для аналізу зразків використовували проточний цитометр (Beckman Coulter Epics LX, США) із довжиною хвилі лазера 530 нм.

У роботі досліджували ефективність етіотропних препаратів Рибавірин (Rib, Sigma, США) та Ацикловір (ACV, Sigma, США) за умов змішаної інфекції, а саме аналізували їхній вплив на формування інфекційного вірусного потомства та клітинний цикл коінфікованих клітин.

Статистична обробка отриманих даних виконувалась за стандартними підходами для обчислення статистичних помилок (стандартне відхилення) за допомогою Microsoft Excel 2010. Результати відображали як середнє значення

± S.D., отримане в трьох незалежних експериментах. Для оцінки різниці між тестовим зразком та контролем використано t-тест Стюдента. Значення $p < 0,05$ вважалося статистично значущим.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження взаємодії між вірусами та її наслідків на клітинному рівні залишається одним із актуальних та важливих питань вірусології та медицини [2]. Тому для розуміння біологічної сутності змішаних інфекцій розроблено модель одночасної адено-герпетичної інфекції клітин MDBK та проведено структурно-функціональний аналіз взаємодії вірус-вірус-клітина в цій системі.

Однією серед ознак репродукції адено- та герпесвірусів є утворення в ядрах клітин специфічних включень, які можуть бути виявлені за допомогою люмінесцентного мікроскопа після фарбування клітин барвником акридиновим оранжевим, тому її використано не лише для визначення впливу змішаного інфікування на репродукцію кожного з досліджуваних вірусів, а і для аналізу морфологічних змін коінфікованих клітин (рис.1).

Клітини, інфіковані Ад-5 / Cells infected with HAdV-5

Клітини, інфіковані ВПГ-1
Cells infected with HSV-1 **Рис. 2.**
Ультратонкі зрізи клітин MDBK. Капсиди Ад-5 (чорна стрілка) та ВПГ-1 (біла стрілка)**Figure 2.**
Ultra-thin sections of MDBK cells. HAdV-5 (black arrow) and HSV-1 (white arrow) capsids

Коінфіковані клітини / Co-infected cells

Неінфіковані клітини
Uninfected cells

Як видно із *рисунку 1*, розвиток Ад-5 та ВПГ-1 інфекцій у клітині змінює структуру та функції органел, і особливо ядра, оскільки всі основні етапи репродукції цих вірусів відбуваються саме у ньому. Перші прояви інфікування клітин спостерігаються уже через 18–24 години після зараження та проявляються в зміні розмірів і форми ядер, просвітленні їх у зв'язку з розрідженням хроматину. Ядерця збільшуються у розмірах, зміщуються до периферії ядра і згодом зникають. На 24–48 годину після інфікування ядерний хроматин стає зернистим, збирається глибами та при аденовірусній інфекції розміщується всередині ядра, формуючи центроядерні включення, а при герпетичній інфекції зміщується до периферії ядра, утворюючи кільце біля ядерної мембрани. У ядрах неінфікованих клітин аналогічні утворення не виявляються, ядерця і цитоплазма оранжевого кольору, а ядерний хроматин має вигляд рівномірно розподілених дрібних яскраво-зелених гранул. Інколи виявляли гомогенне оранжеве свічення, характерне для пікнотичних клітин, та зелене свічення хроматину під час мітозу клітини.

При моделюванні змішаної інфекції клітин MDBK також виявляли специфічні для вірусу герпесу синцитії та включення, характерні як для Ад-5, так і ВПГ-1 (*рис. 1*), однак кількість клітин із включеннями була меншою порівняно з моноінфекціями.

За допомогою трансмісійної електронної мікроскопії вивчено ультраструктуру неінфікованих (нативних) та інфікованих вірусами клітин і особливості вірусного морфогенезу (*рис. 2*). Неінфіковані клітини MDBK мали округлу чи овальну форму і велике ядро, у вакуолях виявлялись рихлі округлі тільця помірної електронної щільності, ядерний хроматин був розміщений по всьому об'єму ядра, в центрі якого спостерігали великі ядерця. Показано, що при репродукції адено- і герпесвірусів різко порушувалася морфологія клітин (*рис. 2*): виявлено збільшення ядер, маргінація хроматину до периферії, утворення кристалоподібних внутрішньоядерних скупчень повних і неповних вірусних нуклеокапсидів.

Спостерігали гіпертрофію ядерної мембрани в поєднанні з розширенням перинуклеарного простору і зник-

ненням ядерець. Цитоплазма клітин характеризується більш вираженою вакуолізацією порівняно з неінфікованими клітинами. Також з'являються численні округлі мітохондрії і трубчасто-ретикулярні утворення, ендоплазматичний ретикулум розширений. У ядрах інфікованих аденовірусом клітин виявляли паракристалічні утворення у вигляді прямолінійних трубчастих повздожних та гексагональних структур – у поперечних зрізах клітин, вони відповідають еозинофільним кристалам, які можна виявити при світловій мікроскопії, та містять вірусний білок і позбавлені нуклеїнової кислоти. Всі ці морфологічні зміни призводили до повної деструкції клітин на 72–96 годину після зараження. Описаний розподіл електронно-щільного матеріалу в ядрах інфікованих клітин відповідає місцю перебування віруспецифічних ДНК-вмісних внутрішньоядерних включень, що виявляються при фарбуванні інфікованих клітин барвником акридиновим оранжевим.

Віріони аденовірусу мали електронно-щільну оболонку з укладеним в ній електронно-щільним центральним тілом, між ними розміщена світла зона. Вірус герпесу виявляли в ядрах клітин як округле електронно-щільне тіло діаметром 60–100 нм (так звані голі капсиди). Інфекційними віріонами ВПГ-1 ставали після стадії утворення зовнішньої оболонки, що складається з мембран клітини, набуваючи її при виході з клітини (рис. 2).

Коінфіковані клітини характеризуються нижчим рівнем розвитку патоморфологічних змін і наявністю невеликої кількості вірусних капсидів. У ядрах інфікованих клітин виявляли два типи вірусних капсидів, які асоціювали з аденовірусом та вірусом простого герпесу (рис. 2). Виявлено значну кількість дефектних вірусних частинок, що мають меншу електронну щільність нуклеокапсиду, пов'язану з відсутністю нуклеїнової кислоти, що може свідчити про пригнічення репродукції вірусів.

Вивчено вплив змішаного інфікування на життєздатність клітин MDBK (рис. 3). Через 72 години після коінфікування клітин виявлено пригнічення життєздатності та мітохондріальної активності порівняно з неінфікованими клітинами (контрольні клітини) на 32 %.

Порівняно з аденовірусною моноінфекцією рівень мітохондріальної активності коінфікованих клітин майже не змінювався, тоді як порівняно з герпетичною моноінфек-

цією відбувалось його значне зростання до 64 %. Це може бути пов'язано з пригніченням розвитку в коінфікованих клітинах цитопатичних змін, викликаних репродукцією вірусу герпесу, а саме утворення синцитіїв та специфічних включень.

Блокування фаз клітинного циклу є добре встановленим механізмом, за допомогою якого віруси створюють найбільш придатні умови для їх реплікації. Зокрема, індукція S-фази є обов'язковою або, щонайменше, вигідною для літичної інфекції деяких вірусів, оскільки вони можуть реплікувати свою ДНК і здійснювати повний інфекційний цикл у клітинах, які перебувають у стадії реплікації ДНК, тобто в S-фазі клітинного циклу. Аденовірусна інфекція впливає на клітинний цикл, оскільки продукти гену E1 аденовірусу взаємодіють із pRb (білком ретинобластоми), це призводить до вивільнення фактору транскрипції E2F, що ініціює перехід від G1 до S-фази [23]. Інфікування аденовірусом низки епітеліальних клітинних ліній зумовлює синхронізацію і арешт фази G2. Ця синхронізація у фазі G2 цілком може бути важливим фактором, який сприяє збільшенню розміру клітини та її гранулярності. На відміну від цього, ВПГ-1 кодує власну ДНК-полімеразу та допоміжні білки і, отже, теоретично не вимагає індукції S-фази для підтримки своєї реплікації [24], однак, з іншого боку, є дані, що білок ICP0 вірусу герпесу може індукувати блокування клітинного циклу як на етапі переходу клітин із G1 на S-фазу, так і на G2/M-фазу циклу [25].

Вплив вірусних моно- та коінфекцій на мітотичні процеси в клітинах та клітинний цикл досліджено проточною цитометрією. Виявлено значні зміни у циклі інфікованих клітин (рис. 4 а, б), при аденовірусній та герпетичній моноінфекціях спостерігається збільшення кількості апоптотичних клітин до 11 та 30 %, відповідно (що у 2,5 та 7,2 раза більше, ніж у неінфікованих клітин). Також спостерігали перехід клітин із G1-фази у S і збільшення кількості клітин у цій фазі до 33 та 25 % відповідно (що у 2 та 1,5 раза більше, ніж у неінфікованих клітин), що вказує на інтенсивний синтез вірусної ДНК. При герпетичній інфекції виявлено зменшення кількості клітин на 40 % у G2/M-фазі порівняно з неінфікованими клітинами. Також слід зазначити, що низька кількість клітин у G1-фазі (удвічі менше, ніж у неінфікованих) свідчить про блокування мітотичної

Рис. 3. Ааналіз життєздатності та мітохондріальної активності коінфікованих клітин. MTT-аналіз

Figure 3. Analysis of viability and mitochondrial activity of co-infected cells using MTT-assay

Рис. 4. Аналіз стану клітинної популяції за умов змішаної інфекції: профілі клітинного циклу (а) та особливості клітинного циклу (б) моно- та коінфікованих клітин. Інтенсивність флуоресценції клітин вимірювали проточним цитометром з довжиною хвилі лазера 488 нм. Профілі клітинного циклу аналізували за допомогою програмного забезпечення Flowing Software, версія 2.5. Результати, що відповідають кількості клітин у G1, S та G2/M фазах циклу отримано у трьох незалежних експериментах та представлено як середнє значення $\pm$ S.D.

Figure 4. The analysis of the cell population state under conditions of mixed infection: cell cycle profiles (a) and cell cycle features (b) of mono- and co-infected cells. The cells' fluorescence intensity was measured by a flow cytometer with laser wavelength 488 nm. Cell cycle profiles were analyzed with the Flowing Software, version 2.5. Results corresponding to the percentage of cells in G1, S, and G2/M phases of three independent experiments are presented as mean $\pm$ S.D.

фази клітинного циклу, ріст та розвиток клітин, а також направлення всіх клітинних механізмів на репродукцію вірусів. За умов змішаної інфекції виявлено, що кількість клітин у G1-фазі не змінювалася порівняно з обома моноінфекціями, тоді як кількість апоптотичних клітин знизилася на 24 % порівняно з герпетичною інфекцією. Також спостерігали збільшення кількості клітин у S-фазі на 23 % порівняно з ВПГ-1 інфекцією, кількість клітин була подібна до аденовірусної моноінфекції, що, можливо, свідчить про інтенсивніший синтез аденовірусної ДНК в коінфікованих клітинах.

Відомо, що основними результатами взаємодії двох і більше збудників у процесі змішаної інфекції може бути [26]: 1) незалежна репродукція вірусів; 2) екзальтація – посилення репродукції одного або всіх асоціантів; 3) ін-

терференція – інгібування репродукції одного або всіх асоціантів; 4) комплементация – специфічна залежність репродукції одного вірусу від іншого. Тому наступним етапом роботи було дослідження та характеристика особливостей репродукції вірусів-асоціантів у розробленій модельній системі. Показано, що спільне інфікування клітин ВПГ-1 та Ад-5 призводить до значного зниження кількості клітин з вірусіндукованими внутрішньоядерними включеннями обох вірусів (до 40 %) (рис. 5 а1). Проведено дослідження повноцінності та інфекційності вірусів-асоціантів, а саме визначено титр вірусів, отриманих *de novo*, та рівень реплікації їхньої ДНК. За умов змішаної інфекції виявлено зниження титрів ВПГ-1 та Ад-5 на 1,6 lg та 2,6 lg (рис. 5 а2), тоді як реплікація ДНК обох вірусів знижувалася незначно (до 6 %) (дані не представлено).

Рис. 5. Вплив змішаної інфекції на репродукцію вірусів-асоціантів:

a – цитоморфологічний аналіз коінфікованих клітин MDBK, люмінесцентна мікроскопія, фарбування 0,01 % акридиновим оранжевим: **1** – зміна кількості клітин із віруспецифічними внутрішньоядерними включеннями, **2** – зміна титру вірусів, синтезованих *de novo*, **b** – особливості синтезу білків вірусів за умови змішаної адено-герпетичної інфекції, проточна цитометрія, використані антитіла: **1** – антитіла кроля до гексону та відростка Ад-5, **2** – антитіла кроля до основного білка капсиду та основних глікопротеїдів ВПГ-1, зв'язування антитіл з вірусними білками виявляли з використанням антитіл до імуноглобулінів кроля, кон'югованих з FITC.

Figure 5. The effect of mixed infection on the reproduction of associated viruses:

a – cytomorphological analysis of coinfecting MDBK cells, fluorescent microscopy, staining with 0.01% acridine orange: **1** – change the number of the cells with virus-specific inclusion bodies, **2** – change the titer of viruses synthesized *de novo*, **b** – features of protein synthesis of viruses under conditions of mixed adeno-herpetic infection, flow cytometry, used antibodies: **1** – rabbit antibodies to hexon and fiber of HAdV-5, **2** – rabbit antibodies to the main capsid protein and to the membrane glycoproteins of HSV-1, binding of antibodies to viral proteins was detected using antibodies to rabbit immunoglobulins conjugated FITC.

Рівень синтезу структурних компонентів віріону – білків є одним із ключових моментів репродукції вірусу, адже недостатня їх кількість гальмує процес вірусного морфогенезу та утворення нових інфекційних вірусних часток. З використанням методу проточної цитометрії досліджено рівень синтезу деяких мажорних білків вірусів за умови коінфікування клітин. Виявлено значне інгібування синтезу основного капсидного білка та глікопротеїнів оболонки вірусу герпесу (83 % та 64 %, відповідно) (рис. 5 b2) і менш виражене зниження кількості білка гексону аденовірусу (17 %) (рис. 5 b1). Відомо, що одним із механізмів взаємного пригнічення процесу утворення білків може бути інгібування трансляції мРНК в інфікованій клітині. Наприклад, суперінфікування ВПГ-1 клітинної лінії ембріонів щурів, трансформованих аденовірусом 5 серотипу, призводить до інгібування накопичення специфічних аденовірусних ролу(А) мРНК у цитоплазмі та інгібування синтезу білка більше, ніж на 50 % [27]. Віруси родин аде-но-, пікорна-, ортоміксо-, параміксовірусів можуть при-

зводити до інтерференції реплікації вірусу простого герпесу, що закінчується абортивною інфекцією [28, 7], це може призводити до скорочення продукції деяких вірусних ферментів (тимідинкінази) та вірусної ДНК і низького виходу інфекційного вірусу. Таким чином, можна зробити висновок, що виявлене нами пригнічення репродукції вірусів за умов змішаної інфекції може відбуватися на етапі трансляції.

Розуміння взаємодії вірусів між собою за умови змішаного інфікування важливе для розробки нових та ефективніших шляхів боротьби з цими вірусними інфекціями. Найбільшого успіху в хіміотерапії адено- та герпесвірусних інфекцій досягнуто з вивченням аномальних нуклеозидів і нуклеотидів, які є інгібіторами вірусних полімераз та включаються у синтез нового ланцюга нуклеїнових кислот [29, 30]. Оскільки репродукція вірусів залежить від функціональної та енергетичної системи клітини, нами досліджено зміни циклу коінфікованих клітин за обробки їх такими противірусними препаратами, як Рибавірин та Ацикловір.

Рис. 6. Вплив протівірусних препаратів на цикл інфікованих клітин MDBK: особливості клітинного циклу моно- (а, б) та коінфікованих клітин (с), оброблених препаратами.

Проточна цитометрія та фарбування клітин йодидом пропідію. Профілі клітинних циклів аналізували за допомогою програмного забезпечення Flowing Software, версія 2.5. Результати, що відповідають кількості клітин у G1, S та G2/M фазах циклу, отримано у трьох незалежних експериментах та представлено як середнє значення $\pm$ S.D.

Figure 6. The effect of antiviral drugs on the cycle of infected MDBK cells: features of the cell cycle of mono- (a, b) and co-infected cells (c) after drugs treatment. Flow cytometry and propidium iodide staining of cells. Cell cycle profiles were analyzed with the Flowing Software, version 2.5. Results corresponding to the percentage of cells in G1, S, and G2/M phases of three independent experiments are presented as mean $\pm$ S.D.

За умов моноінфекцій використання препаратів призводить до збільшення кількості клітин у G1-фазі в 1,8–2,7 рази, а кількість апоптотичних клітин зменшується в 1,1–3,3 рази порівняно з контрольними значеннями вірусів (рис. 6 а, б). Також слід зазначити, що використання обох препаратів призводило до значного зниження кількості клітин у G2/M фазі (1,1–2,2 рази). Препарат ACV не змінював розподілу клітин за фазами циклу при аденовірусній інфекції, що вказує на його

неефективність, тоді як за умов герпетичної інфекції відбувається нормалізація клітинного циклу порівняно з профілем неінфікованих клітин (рис. 6 а). Показано дозозалежний вплив Rib на клітинний цикл за герпетичної та аденовірусної моноінфекцій, а саме із зниженням його концентрації спостерігається зменшення кількості клітин у G1-фазі та зміна кількості апоптотичних клітин, що свідчить про зниження його антивірусної активності (рис. 6 б).

ТАБЛИЦЯ 1 / TABLE 1

ВПЛИВ СПОЛУК НА УТВОРЕННЯ ПОВНОЦІННОГО ТА ІНФЕКЦІЙНОГО ПОТОМСТВА ВІРУСІВ ЗА УМОВ МОНО- ТА ЗМІШАНОЇ ІНФЕКЦІЙ / EFFECT OF THE DRUGS ON THE FORMATION OF COMPLETE AND INFECTIOUS OFFSPRING OF VIRUSES IN THE CONDITIONS OF MONO- AND MIXED INFECTIONS

Препарати (мкг/мл) / Drugs (µg/ml)		Моноінфекція / Monoinfection				Змішана інфекція / Co-infection			
		ВПГ-1 / HSV-1		Ад-5 / HAdV-5		ВПГ-1 / HSV-1		Ад-5 / HAdV-5	
		Титр Ig ВУО/мл / Titer, Ig IFU/mL	Інгібув. Ig / Inhib. Ig	Титр Ig ВУО/ мл / Titer, Ig IFU/mL	Інгібув. Ig / Inhib. Ig	Титр Ig ВУО/ мл / Titer, Ig IFU/mL	Інгібув. Ig / Inhib. Ig	Титр Ig ВУО/мл / Titer, Ig IFU/mL	Інгібув. Ig / Inhib. Ig
ACV	20	1,81	3,57	6,95	0,19	2,33	1,65	4,56	0,05
	4	2,40	2,98	6,99	0,15	2,72	1,26	4,56	0,05
	0,8	2,73	2,66	7,07	0,07	2,79	1,19	4,58	0,03
Rib	125	4,62	0,77	3,30	3,84	3,09	0,89	3,07	1,54
	62	4,76	0,63	5,35	1,79	3,36	0,62	3,97	0,64
	31	4,83	0,55	5,62	1,52	3,52	0,46	4,10	0,51
KB/VC	5,39	-	7,14	-	3,98	-	4,61	-	-

Примітка: Інгіб. – інгібування, KB – контроль вірусу / Note: Inhib. – inhibition, VC – virus control.

Використання препаратів за умов змішаної інфекції призводить до зниження кількості клітин у S-фазі в 1,7–2,5 раза, апоптотичних клітин у 1,2–1,6 раза та їх збільшення у G1-фазі в 2–2,6 раза (рис. 6 с). Активність ACV відносно вірусу герпесу за змішаної інфекції була дещо нижчою, ніж за моноінфекції, оскільки спостерігалось зменшення кількості апоптотичних клітин у 1,6 раза, тоді як за умов моноінфекції зниження було у 3,3 раза. При застосуванні Rib за умов змішаної інфекції його активність була подібною до активності при обох моноінфекціях. Таким чином, показано високу здатність досліджуваних препаратів нормалізувати життєздатність та цикл клітин як за умов моно-, так і змішаних інфекцій.

Проведено дослідження з визначення титрів вірусів-асоціантів, отриманих *de novo*, після обробки їх препаратами (табл. 1). Головним критерієм ефективності препарату відносно вірусу є інгібування репродукції вірусу за рахунок зниження його інфекційного титру. Зниження титру вірусу на 2 lg і більше (або на 99 % і більше) порівняно з контролем вірусу свідчить про виражену противірусну активність, від 1 до 2 lg – про помірну активність, на 1 lg і менше – про відносну активність [31].

Слід зазначити виражену протигерпетичну активність ACV та протиаденовірусну активність Rib за умов моноінфекцій, оскільки титри вірусів, синтезованих *de novo*, знижувався на 3,7 та 3,8 lg відповідно. Rib проявляв відносну протигерпетичну дію як за моно- так і за змішаної інфекції, адже максимально знижував титр ВПГ-1 на 0,9 lg. Використання ACV за умов змішаної інфекції призводить до пригнічення репродукції ВПГ-1 на 1,2–1,7 lg, що вказує на зниження його ефективності відносно вірусу герпесу залежно від використаної концентрації на 1,5–1,9 lg. За умов змішаної інфекції препарат Rib втрачав виражену проти-

аденовірусну активність, оскільки знижував титр аденовірусу на лише на 0,5–1,5 lg, що на 1–2,3 lg нижче порівняно з моноінфекцією.

Отже, дослідження інфекційності вірусів в умовах коінфекції показало зниження антивірусної дії препаратів відносно вірусів-асоціантів. Ефективність противірусних препаратів може залежати від вірусного навантаження після початку терапії. При змішаній інфекції клітин спостерігається високе вірусне навантаження на клітину, що може впливати на ступінь стійкості вірусів до лікарських препаратів [32]. Виявлена нетипова дія препаратів у випадку змішаної адено-герпетичної інфекції вказує на необхідність проведення скринінгу противірусних препаратів не лише на експериментальних моно-, але і на змішаних інфекціях, оскільки йдеться не лише про утворення резистентних штамів у процесі репродукції вірусів (унаслідок утворення рекомбінантів, мутантів тощо), а і про інгібування функціональної активності специфічних мішеней при репродукції вірусів-асоціантів, що може призводити до неефективного використання противірусних засобів у медичній практиці.

ВИСНОВКИ

Створена модельна система змішаної вірусної інфекції, в якій проаналізовано взаємодію кількох вірусів. Проведено дослідження мітохондріальної активності, структури клітин, аналіз клітинного циклу та виявлено пригнічення розвитку патоморфологічних змін за умов їх змішаного інфікування порівняно з моноінфекціями, що може бути пов'язано із взаємним пригніченням розвитку вірусних інфекцій у клітинах за рахунок зниження синтезу мажорних білків вірусів. Дослідження противірусної дії егіотропних препаратів Адикловір та Рибавірин із засто-

суванням інноваційної моделі адено-герпетичної інфекції показало значну втрату їхньої активності. Проте необхідним є проведення детальніших молекулярно-біологічних досліджень регуляторних елементів геному вірусів-асоціантів, важливих для їх транскрипції, трансляції та реплікації, що дасть можливість зрозуміти, на яких саме етапах відбувається взаємодія між вірусами, визначити особливості розвитку вірусних інфекцій у цих системах та виявити причини і механізми неефективності препаратів за умов змішаної інфекції.

Таким чином, наявність специфічної та адекватної клітинної моделі змішаної вірусної інфекції з дослідженими аспектами перебігу асоційованих інфекцій дає можливість використовувати її для доклінічного дослідження нових сполук із потенційною протівірусною активністю, для аналізу сучасного арсеналу протівірусних препаратів та отримання нових даних про роль вірус-вірусних взаємодій у розвитку резистентності до відомих етіотропних протівірусних засобів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ / REFERENCES

1. De Clercq E, Li EG. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. *Clin. Microbiol. Rev.* 2016 Jul;29:695–747. DOI:10.1128/CMR.00102-15.
2. Kumar N, Sharma S, Barua S, Tripathi BN, Rouse BT. Virological and Immunological Outcomes of Coinfections. *Clin Microbiol Rev.* 2018 Jul;31(4): e00111–17. DOI: 10.1128/CMR.00111-17.
3. Sedarati F, Javier RT, Stevens JG. Pathogenesis of a Lethal Mixed Infection in Mice with Two Nonneuroinvasive Herpes Simplex Virus Strains. *J. Virology.* 1988 Aug;62(8):3037–9. PMID: 2839719.
4. Ghanem H, Shoman H, Nabil M, Tabl A. Prevalence of Epstein-Barr virus infection in Hepatitis C Patients. *Egypt. Acad. J. Biolog. Sci.* 2014 June;6(1):29–36. DOI: 10.21608/eajbsg.2014.16627.
5. Szostek S, Zawilinska B, Kopec J, Kosz-Vnenchak M. Herpesviruses as possible cofactors in HPV-16-related oncogenesis. *Acta biochimica Polonica.* 2009 June;56(2):337–42. DOI: 10.18388/abp.2009_2466.
6. Barnabas RV, Celum C. Infectious Co-factors in HIV-1 transmission Herpes Simplex Virus type-2 and HIV-1: New Insights and interventions. *Curr HIV Res.* 2012 Apr;10(3):228–37. DOI: 10.2174/157016212800618156.
7. Da Palma T, Doonan BP, Trager NM, Kasman LM. A systematic approach to virus-virus interactions. *Virus Research.* 2010 Apr;149(1):1–9. DOI: 10.1016/j.virusres.2010.01.002.
8. Ghebremedhin B. Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* 2014 Mar;4:26–33. DOI: 10.1556/EuJMI.4.2014.1.2.
9. Garnett CT, Erdman D, Xu W, Gooding LR. Prevalence and quantitation of species C adenovirus DNA in human mucosal lymphocytes. *J Virol.* 2002 Nov;76(21):10608–16. DOI: 10.1128/jvi.76.21.10608-10616.2002.
10. Echavarria M. Adenoviruses in immunocompromised hosts. *Clin. Microbiol.* 2008 Oct. 21(4):704–15. DOI: 10.1128/CMR.00052-07.
11. Szczubialka K, Pyrc K, Nowakowska M. In search for effective and definitive treatment of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infections. *RSC Advances.* 2016 Jan;6(2):1058–75. DOI: 10.1039/c5ra22896d.
12. Arvin A, Campadelli-Fiame G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, et al. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. Cambridge University Press; 2007.
13. Nickbakhsh S, Mair M, Matthews L, Reeve R, Johnson P, Thorburn F, et al. Virus-virus interactions impact the population dynamics of influenza and the common cold. *PNAS* 2019 Dec;116(52):27142–50. DOI: 10.1073/pnas.1911083116.
14. McMahon AM. The antiherpetic drug acyclovir inhibits HIV replication and selects the V75I reverse transcriptase multidrug resistance mutation. *J Biol Chem.* 2008 Nov;283(46):31289–93. DOI: 10.1074/jbc.C800188200.
15. Audsley J, Arrifin N, Yuen L, Ayres A, Crowe S, Bartholomeusz A, et al. Prolonged use of tenofovir in HIV/hepatitis B virus (HBV)-coinfected individuals does not lead to HBV polymerase mutations and is associated with persistence of lamivudine HBV polymerase mutations. *HIV Med.* 2009 Apr;10(4):229–35. DOI: 10.1111/j.1468-1293.2008.00675.x.
16. Lisco A, Vanpouille C, Margolis L. Co-infecting viruses as determinants of HIV. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2009 Feb;6(1):5–12. DOI: 10.1007/s11904-009-0002-3.
17. Green M, Loewenstein PM. Human adenoviruses: propagation, purification, quantification, and storage. *Curr. Protoc. Microbiol.* 2006 Jan, Chapter 14:14C.1.1–14C.1.19. DOI: 10.1002/9780471729259.mc14c01s00.
18. Blaho JA, Morton ER, Yedowitz JC. Herpes simplex virus: propagation, quantification, and storage *Curr Protoc Microbiol.* 2005 Oct; Chapter 14: Unit 14E.1. DOI: 10.1002/9780471729259.mc14e01s00.
19. Andrighetti-Fröhner RV, Creczynski-Pasa TB, Barardi CRM, Simões CMO. Cytotoxicity and Potential Antiviral Evaluation of Violacein Produced by Chromobacterium violaceum CR. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98(6):843–8. DOI: 10.1590/S0074-02762003000600023.
20. Biliavska L, Pankivska Y, Povnitsa O, Zagorodnya S, Gudzh G, Shermolovich Y. Anti-Adenoviral Activity of 2-(3-Chlorotetrahydrofuran-2-yl)-4-Tosyl-5-(Perfluoropropyl)-1,2,3-Triazole. *Medicina.* 2018 Nov;54(5):81. DOI: 10.3390/medicina54050081.
21. Bozzola JJ. Conventional Specimen Preparation Techniques for Transmission Electron Microscopy of Cultured Cells. *Electron microscopy: methods and protocols.* 2nd ed. / Edited by John Kuo; 2007.
22. Wold, W, Tollefson A. Adenovirus Methods and Protocols. 2nd ed. Humana Press Inc.: Totowa, NJ, USA; 2007. 245p. ISBN 978-1-59745-166-6.
23. Sandhu K, Al-Rubeai M. Monitoring of the Adenovirus Production Process by Flow Cytometry. *Biotechnol Prog.* 2008 Feb;24:250–60. DOI: 10.1021/bp070198s.
24. Trapp-Fragner L, Bencherit D, Chabanne-Vautier D, Vern Y, Remy S, Boutet-Robinet E, et al. Cell Cycle Modulation by Marek's Disease Virus: The Tegument Protein VP22 Triggers S-Phase Arrest and DNA Damage in Proliferating Cells. *PLOS ONE.* 2014 Jun;9(6):1–14. DOI: 10.1371/journal.pone.0100004.
25. Ehmann GL, McLean TI, Bachenheimer SL. Herpes simplex virus type 1 infection imposes a G(1)/S block in asynchronously growing cells and prevents G(1) entry in quiescent cells. *Virology.* 2000 Feb;267:335–49. DOI: 10.1006/viro.1999.0147.
26. Waner J. Mixed viral infections: detection and management. *Clinical Microbiology Reviews.* *Clin Microbiol Rev.* 1994 Apr;7(2):143–51. DOI: 10.1128/cmr.7.2.143.
27. Spector D, Pizer L. Herpes virus infection modifies adenovirus RNA metabolism in adenovirus type 5-transformed cells. *J Virol.* 1978 Jul;27(1):1–12. Available from: PMC354134.
28. Flamand L, Menezes J. Cyclic AMP-responsive element-dependent activation of Epstein-Barr virus zebra promoter by human herpesvirus 6. *J. Virol.* 1996 Mar;70(3):1784–91. PMID: PMC190004.
29. Wayne MMY, Sing CW. Anti-Viral Drugs for Human Adenoviruses. *Pharmaceuticals (Basel).* 2010 Oct;3(10):3343–54. DOI: 10.3390/ph3103343.
30. Field HJ, Hodge RA. Recent developments in anti-herpesvirus drugs. *Br Med Bull.* 2013 Apr;106:213–49. DOI: 10.1093/bmb/ldt011.
31. Kohn LK, Foglio MA, Rodrigues RA, Sousa IM, Martini MC, Padilla MA, et al. In vitro antiviral activities of extracts of plants of The Brazilian cerrado against the avian metapneumovirus (aMPV). *Brazilian J Poultry Sci.* 2015;17:275–80. DOI: 10.1590/1516-635X1703275-280.
32. Cummings KW, Levy DN, Wodarz D. Increased burst size in multiply infected cells can alter basic virus dynamics. *Biol Direct.* 2012 May;7:16. DOI: 10.1186/1745-6150-7-16.

РЕЗЮМЕ

Развитие патологического процесса и активность этиотропных препаратов в культуре клеток в условиях вирусной коинфекции

Л. А. Белявская , О. Ю. Повница,
Ю. Б. Паньковская, С. Д. Загородняя

Институт микробиологии и вирусологии
им. Д. К. Заболотного НАН Украины,
ул. Заболотного, 154, Киев 03143, Украина

Цель исследования. Изучить особенности развития патологического процесса в клетках при моделировании смешанной вирусной инфекции и исследовать действие противовирусных препаратов при таких условиях.

Материалы и методы исследования. Разработанная модель одновременной смешанной инфекции клеток MDBK аденовирусом человека 5 серотипа (Ад-5) и вирусом простого герпеса 1 типа (ВПГ-1). Митохондриальную активность, ультраструктуру и состояние клеточной популяции исследовали с использованием МТТ-анализа, трансмиссионной электронной микроскопии и проточной цитометрии с красителем пропидий йодид. Интенсивность репродукции вирусов в клетках, их инфекционный титр изучали цитоморфологическим методом. Уровень синтеза мажорных белков вирусов-ассоциантов анализировали применяя проточную цитометрию и соответствующие моноклональные антитела.

Результаты исследования. В коинфицированных клетках обнаружено снижение развития патоморфологических изменений по сравнению с моноинфекциями, что связано с угнетением репродукции вирусов-ассоциантов. Установлено, что совместное инфицирование клеток ВПГ-1 и Ад-5 приводит к снижению количества клеток с вирусиндуцированными внутриядерными включениями обоих вирусов до 40% и снижению титров виру-

сов на 1,6 lg и 2,6 lg, соответственно. Также выявлено угнетение синтеза основного капсидного белка и гликопротеинов оболочки вируса герпеса на 83 % и 64 %, соответственно, и менее выраженное снижение количества белка гексона аденовируса (на 17 %). Показано, что митохондриальная активность коинфицированных клеток по сравнению с герпетической моноинфекцией возрастает до 64 %. Исследование влияния коинфекции на клеточный цикл установило, что количество клеток в G1 фазе не меняется по сравнению с обеими моноинфекциями, тогда как количество апоптотических клеток по сравнению с герпетической инфекцией снижается на 24 %. Анализ официальных препаратов Рибавирин и Ацикловир в условиях смешанной инфекции показал снижение их противовирусного действия в отношении вирусов-ассоциантов по сравнению с моноинфекциями на 1–2,3 lg.

Выводы. Наличие специфической инновационной клеточной модели смешанной инфекции с исследованными аспектами течения ассоциированных инфекций позволяет использовать ее для доклинического исследования противовирусной активности соединений и получения новых данных о роли вирус-вирусных взаимодействий в развитии неэффективности применения противовирусных средств в медицинской практике.

Ключевые слова: смешанная вирусная инфекция, цитоморфологические изменения, клеточный цикл, репродукция вирусов-ассоциантов, противовирусная активность.

Для цитирования: Белявская ЛА, Повница ОЮ, Паньковская ЮБ, Загородняя СД. Развитие патологического процесса и активность этиотропных препаратов в культуре клеток в условиях вирусной коинфекции. Журнал Национальной академии медицинских наук Украины. 2019;25(4): 476-87. DOI: 10.37621/JNAMSU-2019-4-476-487.

Статья поступила в редакцию 1 декабря 2019 | Направлена на рецензирование 5 декабря 2019 | Принята в печать 25 декабря 2019