



УДК 578.825:578.826

Л. О. Білявська, Н. В. Нестерова, О. Ю. Повниця,
С. І. Войчук, Т. М. Бобко

Оцінка антивірусної активності препарату рибамідил на моделі змішаної адено-герпетичної інфекції

(Представлено академіком НАН України В. С. Підгорським)

Створено модель змішаної адено-герпетичної інфекції клітин MDBK та охарактеризовано особливості репродукції вірусів. Одночасне інфікування клітин двома вірусами призводить до взаємного пригнічення репродукції вірусів; суперінфікування клітин HSV-1/US, попередньо інфікованих HAdV-5, стимулює репродукцію HAdV-5 та пригнічує репродукцію HSV-1/US. Досліджено дію препарату рибамідил на моделі змішаної одночасної вірусної інфекції клітин. Виявлено 100% інгібування репродукції аденовірусу за умов моно- і змішаної інфекції. Показано, що при змішаній інфекції ефективність препарату відносно HSV-1/US знижується.

Аденовірус та вірус простого герпесу 1-го типу — збудники інфекційних хвороб людини, що вражають очі, респіраторний, ентеральний, уrogenітальний тракти, центральну та периферичну нервову системи, здатні тривалий час знаходитись в латентному стані та активуватись під впливом ендо- та екзогенних факторів [1, 2]. Широка розповсюдженість вірусів, їх тропізм до одних і тих самих тканин створює можливість інфікування організму кількома вірусами з розвитком змішаної інфекції. Коінфекція може включати інфікування однієї клітини кількома видами вірусів або декілька вірусів можуть інфікувати різні типи клітин у межах одного організму. Результатом цього може бути як відсутність взаємодії, так і взаємний вплив вірусів — інгібування чи стимулювання реплікації вірусів, зміни пермісивності, тропізму, латентності, патології, у тому числі імунопатології та імунологічних реакцій. Клінічні прояви змішаних інфекцій можуть бути різноманітні залежно від виду збудників, їх біологічних властивостей, взаємовідносин один з одним і з клітинами-господарями [3]. При деяких коінфекціях характер патологічного процесу не змінюється, проте часто спостерігається його посилення, а тому важливим завданням є пошук та розробка сполук, які б виявляли високу ефективність відносно обох вірусів, інгібуючи їх репродукцію та передачу. Майже не досліджена активність офіційних та нових ефективних антивірусних препаратів за умови змішаної вірус-вірусної інфекції. Тому, нашою метою було створен-

© Л. О. Білявська, Н. В. Нестерова, О. Ю. Повниця, С. І. Войчук, Т. М. Бобко, 2014

ня клітинної моделі змішаної адено-герпетичної інфекції та дослідження особливостей дії препарату рибамідил за умов коінфікування клітин.

Матеріали і методи. *Об'єкти досліджень.* Використано культуру перещеплених клітин MDBK (нирки телят), отриману з Інституту мікробіології Болгарської академії наук. Клітини культивували відповідно до стандартної методики [4].

Як модельні віруси були використані аденовірус людини 5-го серотипу (HAdV-5) та вірус простого герпесу 1-го типу (HSV-1/US), одержані з колекції Будапештського медичного університету (Угорщина) та Інституту антивірусної хіміотерапії Центру клінічної та теоретичної медицини (Німеччина). Культивували та зберігали віруси за описаними раніше методиками [5].

Препарат рибамідил (рибавірин) — 1- β -D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксіламід, аналог рибозиду імідазолкарбоксіміду, фосфат якого є ключовим продуктом біосинтезу пуринових нуклеотидів, ресинтезовано в Інституті органічного синтезу Латвійської академії наук.

Моделювання змішаної адено-герпетичної інфекції клітин MDBK. Клітини вирощували до щільності $2 \cdot 10^6$ кл/мл, відмивали від сироватки і вносили вірус в об'єм 0,3 мл/пробірку із розрахунку: аденовірус 3, 6 чи 12 ВУО/кл (включення утворююча одиниця на клітину) та вірус простого герпесу з множинністю інфікування 0,01 чи 0,02 ВУО/кл (бляшко утворююча одиниця на клітину). Інфікування клітин проводили одночасно обома вірусами чи послідовно з різницею в 24 год, з попереднім зараженням аденовірусом. Адсорбція вірусу відбувалась протягом 1 год при 20 °С, клітини двічі відмивали від не адсорбованого вірусу розчином Хенкса ("БіоТестМед", Україна), додавали підтримуюче середовище з 45% RPMI 1640 ("Sigma", США), 45% DMEM ("БіоТестМед", Україна), 5% сироватки ембріону теляти ("Sigma", США) та інкубували в термостаті при 37 °С в атмосфері 5% CO₂. Відбір матеріалу для аналізу проводили через 24–96 год після інфікування клітин.

Визначення інфекційного титру вірусів. Інтенсивність репродукції вірусів у клітинах та інфекційний титр вірусів досліджували цитоморфологічним методом з використанням 0,01% барвника акридинового оранжевого ("Sigma", США), визначаючи відсоток інфікованих клітин, за утворенням вірусоспецифічних внутрішньоядерних включень. Метод дає можливість виявляти репродукцію вірусу, збільшення клітин із включеннями пропорційне наростанню інфекційного титру вірусу [6].

Титр вірусу (ВУО/мл) визначали за формулою:

$$\text{титр вірусу} = \frac{A \cdot B}{C},$$

де A — загальна кількість клітин з включеннями у пробірці, B — досліджуване розведення вірусу (зворотна величина), C — об'єм інокуляту.

Вплив препарату рибамідил на репродукцію вірусів визначали за редукцією числа інфікованих клітин у досліді в порівнянні з контролем за формулою [7]: Відсоток інгібування репродукції = $100 - (D \cdot 100/K)$, де K — кількість клітин з включеннями в контролі, D — кількість клітин з включеннями в досліді.

Статистичну обробку даних виконували згідно зі стандартними підходами до обчислення статистичних помилок (стандартне відхилення), використовуючи комп'ютерну програму Microsoft Excel 2010 [8].

Імунофлюоресцентний аналіз. Препарати обробляли за прямим (сироваткою миші проти HSV-1, міченою FITC, НДІ грипу, Росія) та непрямим методом (сироваткою кроля проти

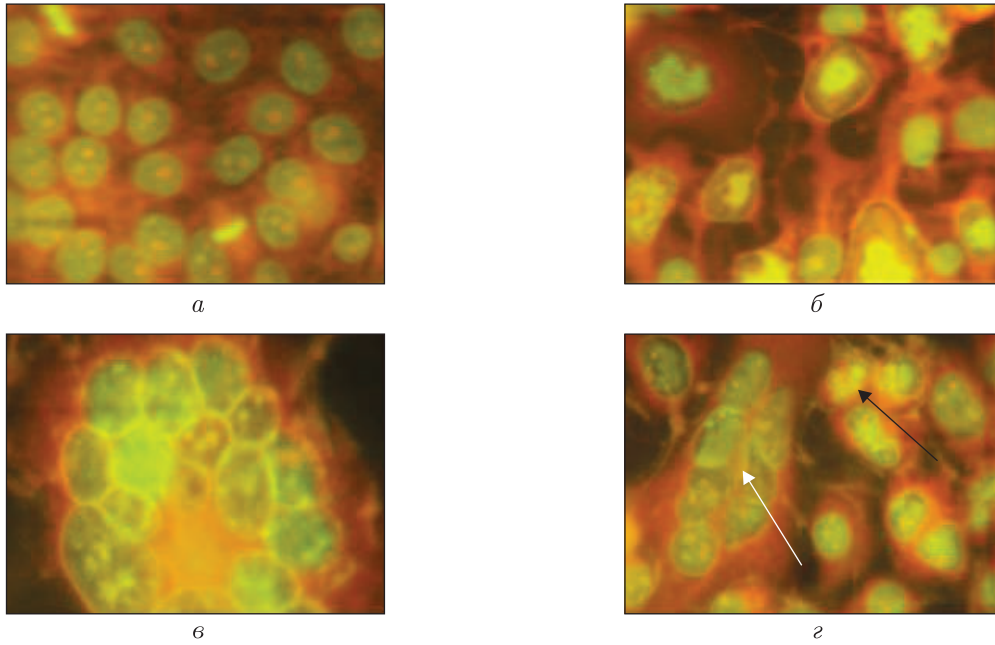


Рис. 1. Цитоморфологічний аналіз: *a* — неінфіковані клітини MDBK; *б* — HAAdV-5 включення; *в* — HSV-1/US включення; *г* — герпетичні (біла стрілка) та аденовірусні включення (чорна стрілка)

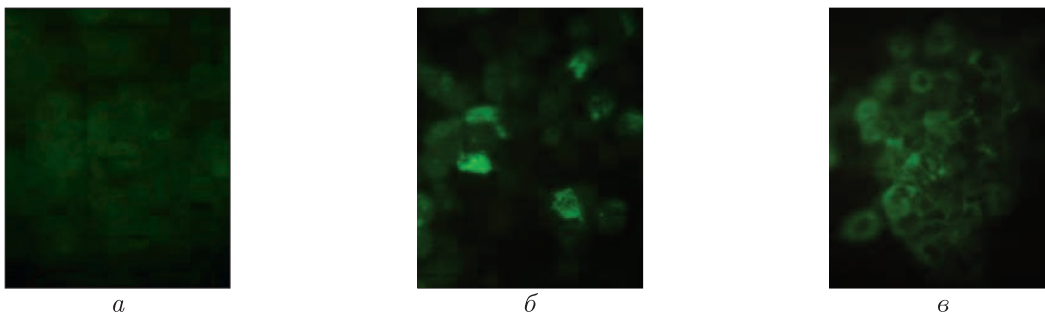


Рис. 2. Імунофлюоресцентний аналіз клітин: *a* — неінфіковані клітини MDBK; *б* — популяція клітин, коінфікованих HAAdV-5 та HSV-1/US і оброблених сироваткою кроля проти гексону аденовірусу та антисироваткою до глобулінів кроля міченою FITC; *в* — популяція клітин, коінфікованих HAAdV-5 та HSV-1/US і оброблених сироваткою миші проти HSV-1 міченою FITC

гексону аденовірусу та антисироваткою до глобулінів кроля, міченою FITC, “Thermo scientific”, США) [9, 10]. Зразки досліджували в люмінесцентному мікроскопі МЛ-2 (ЛОМО, Росія).

Електронно-мікроскопічні дослідження. Процедури, пов’язані з фіксацією клітин, їх зневодненням, заміщенням і заливанням у смоли, проводили за методикою Bozzola [11]. Ультратонкі зрізи, отримані на ультрамікротомі LKB 8800, контрастували ураніацетатом і цитратом свинцю та досліджували на мікроскопі JEM-1400 (“Jeol”, Японія).

Результати та їх обговорення. Інфіковані клітини, в яких репродукуються віруси HAdV-5 та HSV-1/US, виявляли цитоморфологічним методом за утворенням в ядрах специфічних ДНК-вмісних включень обох вірусів (рис. 1). Аденовірусні включення мають вигляд зернистого, гранулярного чи центроядерного яскраво-зеленого свічення ядра, оточеного темною, гомогенною зоною, тоді як для герпетичних включень характерне рівномірне, дифузне, димчасто-зелене свічення ядра із яскравою оранжево-зеленою ядерною мембраною. Включення містять ДНК вірусів, специфічні вірусні антигени, скупчення капсомерів вірусів (що формують паракристали) та кристалоподібні скупчення повних і не повних нуклеокапсидів. Наявність змішаної інфекції популяції клітин MDBK підтверджено методом імунофлуоресцентного аналізу (рис. 2).

При репродукції HAdV-5 та HSV-1/US в клітинах MDBK інфекційні віруси виявляли вже через 24 год, через 48 год після зараження їх титр становив 7,55 та 5,5 lg ВУО/мл відповідно. Показано, що одночасне інфікування клітин двома вірусами призводило до взаємного пригнічення репродукції вірусів (табл. 1). Рівень пригнічення залежав від використаної множинності інфікування клітин вірусом герпесу та не залежав від множинності інфікування аденовірусом. Спостерігалось значне зниження кількості інфікованих клітин з вірусіндукованими включеннями для обох вірусів: HSV-1/US в 1,5–3,0 раза та для HAdV-5 в 9,4 раза.

За результатами титрування інфекційності вірусів HAdV-5 та HSV-1/US, синтезованих в епітеліальній культурі клітин за умов змішаного інфікування, встановлено зниження інфекційного титру вірусів на три порядки для аденовірусу (4,9 lg ВУО/мл) та на два порядки для герпесвірусу (3,8 lg ВУО/мл).

Таблиця 1. Формування специфічних внутрішньоядерних включень залежно від типу змішаної інфекції та множинності інфікування клітин MDBK

Варіант інфікування клітин	Множинність інфікування*	Кількість інфікованих клітин, %			
		Одночасне інфікування		Послідовне інфікування	
		HAdV-5	HSV-1/US	HAdV-5	HSV-1/US
HAdV-5	12	47	0	76	0
HAdV-5	6	26	0	—	—
HSV-1/US	0,02	0	100	—	—
HSV-1/US	0,01	0	82	0	50
HAdV-5 +	12	6	67	—	—
+ HSV-1/US	0,02				
HAdV-5 +	6	12	67	—	—
+ HSV-1/US	0,02				
HAdV-5 +	12	5	25	94	6
+ HSV-1/US	0,01				
HAdV-5 +	6	17	50	—	—
+ HSV-1/US	0,01				

*Множинність інфікування для HAdV-5 — ВУО/кл., HSV-1/US — ВУО/кл. $P < 0,05$.

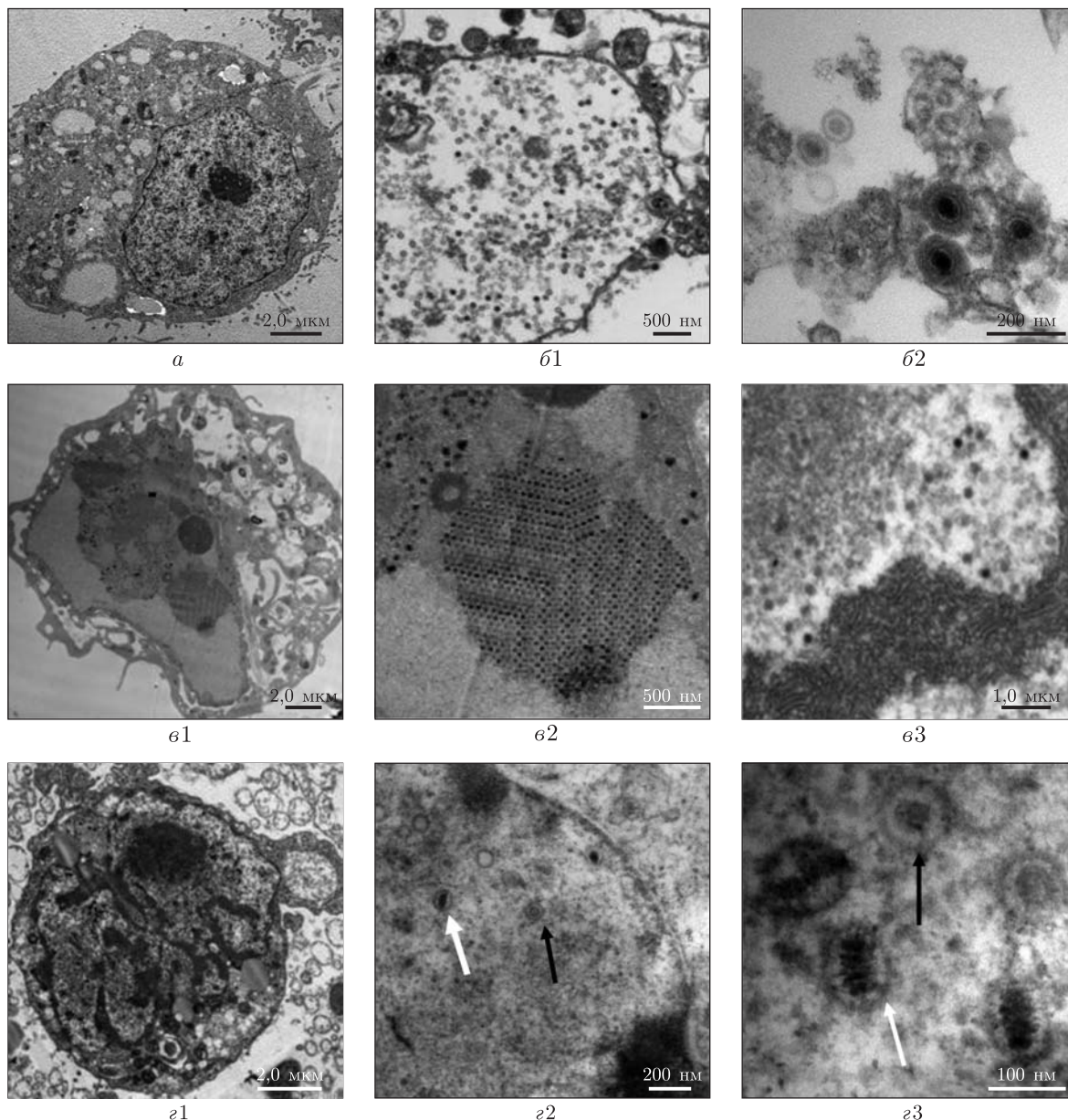


Рис. 3. Ультратонкі зрізи клітин MDBK: *a* – неінфіковані клітини; *b* – клітини, інфіковані HSV-1/US; *в* – клітини, інфіковані HAdV-5; *z* – клітини, коінфіковані HAdV-5 (чорна стрілка) та HSV-1/US (біла стрілка)

У випадку суперінфікування клітин MDBK вірусом HSV-1/US через 24 год після інфікування їх HAdV-5 спостерігалось стимулювання репродукції HAdV-5 на 24% та пригнічення репродукції вірусу герпесу на 88% (див. табл. 1).

Досліджено ультраструктуру неінфікованих та інфікованих (HAdV-5 та HSV-1/US) клітин за допомогою електронної мікроскопії (рис. 3). Інтактні клітини MDBK мали округлу чи овальну форму і велике ядро, у вакуолях виявлялись нещільні округлі тільця помірної електронної щільності, ядерний хроматин був розміщений по всьому об'єму ядра, в центрі якого спостерігали одне чи декілька великих ядерць. При моноінфекції клітин аденові-

русом чи герпесвірусом були виявлені такі зміни субклітинних структур: збільшення ядра та перегрупування хроматину до периферії (маргінація); формування вірусоспецифічних включень, в основному гранулярного і фібрилярного типу, кристалоподібних внутрішньо-ядерних скупчень повних, що містять ДНК та електроннощільну серцевину, і неповних нуклеокапсидів. Спостерігались гіпертрофія ядерної мембрани, що поєднувалась з розширенням перинуклеарного простору, та зникнення ядерця, при цьому цитоплазма характеризувалась більш вираженою вакуолізацією в порівнянні з неінфікованими клітинами. Також з'являлись численні округлі мітохондрії та трубчато-ретикулярні утворення, ендоплазматичний ретикулум більш розширений і оконтурований, а клітинна оболонка гіпертрофована і мала незвичну форму. Всі ці морфологічні зміни призводили до повної деструкції клітин на 72-гу–96-ту год.

Натомість змішана інфекція клітин вірусами HAdV-5 та HSV-1/US характеризувалась нижчим рівнем розвитку морфологічних змін та наявністю невеликої кількості вірусних капсидів. Електронно-мікроскопічне вивчення ультраструктурних зрізів виявило багато пустих вірусних капсомерів, що на відміну від моноінфекції свідчить про пригнічення вірусної репродукції.

Створену модель одночасного змішаного інфікування клітин MDBK використали для дослідження антивірусної дії препарату рибамідил. Попередній аналіз антивірусної дії препарату рибамідил показав, що він виявляє виражену антигерпетичну та антиаденовірусну активність [12, 13]. Препарат в концентрації 62 мкг/мл, що на 99% пригнічував репродукцію обох вірусів, вносили після інфікування клітин у складі підтримуючого середовища. При вивченні дії препарату рибамідил на моноінфекцію клітин MDBK показано, що репродукція аденовірусу пригнічувалась повністю (100%), а репродукція вірусу герпесу — на 79% (в 5 разів). При коінфікуванні клітин також відмічено 100% інгібування синтезу специфічних аденовірусних включень та зменшення в 2,4 раза (59%) кількості інфікованих HSV-1/US клітин вже через 24 год дослідження. Отже, за умов змішаної інфекції ефективність препарату рибамідил відносно HSV-1/US знижувалась на 20% (табл. 2).

Таким чином, створено модель подвійної адено-герпетичної інфекції епітеліальних клітин MDBK, охарактеризовано особливості репродукції вірусів в умовах змішаної інфекції

Таблиця 2. Антивірусна дія препарату рибамідил за умов коінфекції клітин MDBK аденовірусом та вірусом герпесу

Варіант обробки клітин	Множинність інфікування*	Кількість інфікованих клітин, %		Інгібування репродукції, %	
		HAdV-5	HSV-1/US	HAdV-5	HSV-1/US
HAdV-5	3	21	0	—	—
HAdV-5 + + рибамідил**	3	0	0	100	—
HSV-1/US	0,01	0	100	—	—
HSV-1/US + + рибамідил	0,01	0	21	—	79
HAdV-5 + + HSV-1/US	3 0,01	5	95	76	5
HAdV-5 + + HSV-1/US + рибамідил	3 0,01	0	39	100	59

*Множинність інфікування для HAdV-5–БУО/кл, HSV-1/US — БУО/кл. **Концентрація 62 мкг/мл. $P < 0,05$.

та досліджено ефективність препарату рибамідил при коінфікуванні клітин. Дані дослідження важливі для розуміння можливих взаємодій між вірусами за умов пермісивності клітинної моделі для обох інфекцій та ролі даних процесів у розвитку резистентності вірусів до антивірусних препаратів.

1. *Kinchington P., Romanowski E., Gordon G.* Prospects for adenovirus antivirals // *J. Antimicrob. Chemotherapy.* – 2005. – **55**. – P. 424–429.
2. *Ершов Ф. И., Коваленко А. Л., Романцов М. Г. и др.* Герпетическая инфекция: вопросы патогенеза, методические подходы к терапии: Руководство для врачей / Под. ред. М. Г. Романцова, С. Ю. Голубева. – Москва, 1997. – 97 с.
3. *Da Palma T., Doonan B. P., Trager N. M., Kasman L. M.* A systematic approach to virus-virus interactions // *Virus Res.* – 2010. – **149**, No 1. – P. 1–9.
4. *European Collection of Animal Cell Cultures Catalog.* – 4th ed. – Porton Down, Salisbury (UK) PHLS Centre of Applied Microbiology and Research. – 1990. – 386 p.
5. *Berencsi Gy., Dyachenko N. S., Tarassishin L. A. et al.* Changes of adenovirus hexon associated with different passage history of Ad h1 // *Acta microbial. Hung.* – 1986. – **33**, No 3. – P. 233–243.
6. *Носач Л. Н., Дяченко Н. С.* Цитопатология аденовирусной инфекции. – Киев: Наук. думка, 1982. – 124 с.
7. *Носач Л. Н., Повница О. Ю.* Доклиническое исследование специфического антивирусного действия лекарственных средств в культуре клеток на модели аденовируса. Методические рекомендации // *Вестн. фармакологии и фармации.* – 2007. – № 9. – С. 52–64.
8. *Ланач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – Киев: Морион, 2001. – 408 с.
9. *Bordin P., Merlin U., Pugina P.* Reliability of the herpes simplex virus immunofluorescent test in corneal disease // *Eur. J. Ophthalmol.* – 1992. – No 2, Iss. 4. – P. 175–178.
10. *Gardner P. S., McGuckin R., McQuillin J.* Adenovirus demonstrated by immunofluorescence // *Br. Med. J.* – 1972. – No 3. – P. 175.
11. *Bozzola J. J.* Conventional Specimen Preparation Techniques for Transmission Electron Microscopy of Cultured Cells // *Electron microscopy: methods and protocols.* – 2nd ed. / Ed. by John K. – Totowa: Humana Press, 2007. – P. 1–18.
12. *Носач Л. Н., Дяченко Н. С., Жовноватая В. Л.* Антиаденовирусная активность субстанции и лекарственной формы рибамидила // *Мікробіол. журн.* – 2009. – **71**, № 5. – С. 60–67.
13. *De Clercq E.* Antiviral agents: characteristic activity spectrum depending on the molecular target with which they interact // *Adv. Virus. Res.* – 1993. – **42**. – P. 1–55.

*Інститут мікробіології і вірусології
ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ*

Надійшло до редакції 11.07.2014

**Л. А. Белявская, Н. В. Нестерова, О. Ю. Повница, С. И. Войчук,
Т. Н. Бобко**

Оценка антивирусной активности препарата рибамидил на модели смешанной адено-герпетической инфекции

Создана модель смешанной адено-герпетической инфекции клеток MDBK и охарактеризованы особенности репродукции вирусов. Одновременное инфицирование клеток двумя вирусами приводит к взаимному подавлению репродукции вирусов; суперинфицирование клеток HSV-1/US, предварительно инфицированных HAdV-5, стимулирует репродукцию HAdV-5 и подавляет репродукцию HSV-1/US. Изучено действие препарата рибамидил на модели смешанной одновременной вирусной инфекции клеток. Выявлено 100% ингибирование репродукции аденовируса в условиях моно- и смешанной инфекции. Показано, что в условиях смешанной инфекции эффективность препарата рибамидил относительно HSV-1/US снижается.

L. O. Biliavska, N. V. Nesterova, O. Yu. Povnitsa, S. I. Voychuk, T. N. Bobko

Estimation of the antiviral activity of ribamidil within the model of mixed adeno-herpetic infection

A model of mixed adeno-herpetic infection of cells MDBK is developed, and features of the reproduction of viruses are described. The simultaneous infection of cells caused the inhibition of reproduction of both viruses. The amplification of HadV-5 reproduction and the inhibition of HSV-1/US reproduction in the case where cells were superinfected by herpesvirus are shown. The efficiency of ribamidil has been studied under conditions of mixed infection of cells. 100% inhibition of the adenovirus reproduction by ribamidil under the conditions of mono- and mixed infections is detected. Under the conditions of mixed infection, the efficiency of ribamidil against HSV-1 decreases.