

УДК 629.575:578.22

Л. М. Носач, О. Ю. Повниця, В. Л. Жовновата

Інститут мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного Національної академії наук України, Київ

## Аденовіруси як модель у дослідженнях впливу факторів космічного польоту

Надійшла до редакції 26.10.06

Умови модельованої мікрогравітації незалежно від множинності інфікування суттєво не впливали на репродукцію аденовірусу в клітинах, які піддавали клиностатуванню протягом 48 год одразу після адсорбції вірусу. Інкубування інфікованих клітин до клиностатування в стаціонарних умовах при 4 °С протягом 3 діб («передстартові» умови) не змінювало кількості інфікованих клітин відносно контролю, проте були виявлені деякі зміни морфології клітин, як округлення і агрегація. Аденовіруси, які знаходяться в рідині, не втрачають інфекційності при клиностатуванні при 4 та 20—22 °С протягом 90 і 60 днів відповідно. Розроблена модель для дослідження впливу факторів космічного польоту на взаємовідносини геномів аденовірусу і вірусу Епштейна—Барр при спільному інфікуванні лімфобластоїдних клітин.

Віруси відіграють значну роль в інфекційній патології людини. Аденовіруси мають широкий спектр патогенності. Вони викликають захворювання у людини, різних тварин (великої рогатої худоби, овець, свиней, коней, собак, кролів, мавп, мишей) та птахів (курей, гусей, індиків, качок, фазанів). Більше 50 серотипів аденовірусів людини пов'язані з інфекційними захворюваннями, які характеризуються різноманітними клінічними формами з ушкодженням очей, респіраторного, гастроентерального і урогенного тракту та тяжкістю перебігу. Аденовіруси часто викликають спалахи гострої респіраторної вірусної інфекції в дитячих колективах та серед призовників. Вони здатні також персистувати в організмі тривалий час в латентному стані і реактивуватись під впливом екзо- чи ендогенних факторів [1]. Такими факторами можуть бути фізичні фактори, фізіологічні та психологічні стреси, які виникають у космонавтів під час космічних польотів і викликають ослаблення імунної системи, пригнічують продукцію інтерферону, внаслідок чого може активуватись латентний вірус і спричинити розвиток інфекційного захворювання [9, 13, 21, 22, 23, 28]. Ризик розвитку інфекційних захворювань у космонавтів зростатиме у зв'язку з довготрива-

лими космічними польотами (на Місяць чи Марс) [19, 26]. Слід відзначити, що у пацієнтів з пригніченим імунним статусом може розвиватись диссемінована форма аденовірусної інфекції з ураженням різних внутрішніх органів, яка часто закінчується летально. Є дані про розвиток такої інфекції у дорослих і дітей, які приймали імунодепересанти після пересадки кісткового мозку, нирок та у онкохворих з пригніченим імунним статусом [7, 11, 12, 27].

В організмі людини, крім аденовірусів, можуть персистувати і інші віруси, зокрема герпесвіруси. Є дані про реактивацію у астронавтів вірусу з родини герпес-вірусів [16—18, 20, 23—25] та посилення репродукції вірусів в умовах клиностатування [8, 14, 15]. Відносно аденовірусів подібні дослідження не проводились. Немає відомостей і стосовно впливу факторів космічного польоту на взаємні стосунки різних латентних ДНК-геномних вірусів в разі їхньої можливої реактивації.

Метою наших досліджень було вивчення впливу умов модельованої мікрогравітації на репродукцію аденовірусу людини. Для моделювання мікрогравітації в наземних умовах проводили горизонтальне клиностатування клітин при 37 °С зі швидкістю 4 об/хв. (апарат «Клин-1»,

Таблиця 1. Вплив модельованої мікрогравітації на кількість інфікованих аденовірусом клітин та титр синтезованого вірусу

№ досліджу	Час дослідження, год	Доля інфікованих клітин, %		Титр синтезованого вірусу, ВУО/мл	
		дослід	контроль	дослід	контроль
1	48	73	58	не досліджувався	
2	24	52	39	$3 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$
2	48	59	72	$3 \cdot 10^7$	$2.3 \cdot 10^7$

НПО «Респиратор», Донецьк). Клітини Hela попередньо вирощували в стаціонарних умовах в термостаті (37 °С) протягом 24 год. Далі клітини інфікували аденовірусом за стандартною схемою, використовуючи різну множинність інфікування. Досліджувані клітини клиностатували при температурі 37 °С, а контролем були інфіковані клітини, які продовжували інкубувати при температурі 37 °С в горизонтальному стаціонарному положенні. Інтенсивність репродукції аденовірусу оцінювали за кількістю інфікованих клітин, які виявляли за наявністю в ядрах характерних ДНК-вмістних включень та за титром синтезованого вірусу [2].

В інфікованих аденовірусом клиностатованих клітинах, як і в неклиностатованих, через 24 та 48 год після інфікування виявляли внутрішньоядерні ДНК-вмістні включення, що характерно для репродукції аденовірусу в пермісивних лініях клітин [2]. За морфологією включення, які формувались в інфікованих клітинах при клиностатуванні, не відрізнялись від включень, які утворювались в інфікованих клітинах в стаціонарних умовах культивування. Результати досліджень впливу клиностатування на кількість інфікованих клітин та синтез інфекційного вірусу (табл. 1) свідчать про здатність аденовірусу репродукуватись у чутливих клітинах в умовах модельованої мікрогравітації.

Слід зазначити, якщо при клиностатуванні кількість інфікованих клітин в різних дослідах дещо відрізнялась від кількості інфікованих клітин інкубованих в стаціонарних умовах, то титри вірусу, синтезованого як в умовах клиностатування, так і в стаціонарних умовах, були практично однаковими і не відрізнялись від титру вірусу, використаного в дослідах, титр якого був  $3.7 \cdot 10^7$  ВУО/мл.

З метою виявлення можливого стимульного впливу клиностатування на перебіг реплікаційного процесу аденовірусу нами були проведені дослідження при використанні меншої інфікуючої дози вірусу — меншої за 1 ВУО/кл.

Клиностатування клітин, інфікованих з множинністю 0.8 та 0.5 ВУО/кл, протягом 48 год суттєво не впливало на кількість інфікованих клітин (відповідно 35 і 19 % у досліді та 33 і 22 % у контролі).

Таким чином, короткотривале клиностатування (48 год) інфікованих аденовірусом клітин, які до інфікування вирощували протягом 24 год у стаціонарних умовах, фактично не впливало на інтенсивність репродукції аденовірусу при використанні різної множинності інфікування (вищої і нижчої за 1 ВУО/кл).

Важливою умовою для проведення космічних досліджень є завчасна підготовка біоконтейнера до польоту. У зв'язку з цим ми дещо змінили умови проведення експерименту. Клітини вирощували при 37 °С до утворення моношару протягом 1 доби, інфікували аденовірусом (5 ВУО/кл) та інкубували при 4 °С протягом 3 діб, як передбачено технічним завданням підготовки до польоту біологічних об'єктів. Потім частину флаконів переносили в термостат та культивували при 37 °С (в горизонтальному стаціонарному положенні (контроль), а іншу частину — піддавали клиностатуванню (дослід) також при 37 °С. Клітини продовжували інкубувати протягом 48 год після початку клиностатування. В інфікованих аденовірусом клітинах, як контрольних, так і клиностатованих, через 48 год після початку клиностатування виявляли характерні внутрішньоядерні ДНК-вмістні вірусні включення (табл. 2).

Як видно з наведених даних, кількість інфікованих клітин, інкубованих в умовах клиностатування, дещо відрізняється від їхньої кількості в контролі, проте це не позначилось на титрах синтезованого аденовірусу.

Ми виявили деякі відмінності морфології клиностатованих клітин в разі інкубування їх у «передстартових умовах» при температурі 4 °С. Дослідні клиностатовані клітини були дещо «ошаровані», округлені, цитоплазма збережена у вигляді вузької смужки навколо ядра. Ядра були дещо зменшеними, проте мали характерні ДНК-вмісні вірусні в основному пізні центро-

Таблиця 2. Вплив мікрогравітації на кількість інфікованих аденовірусом клітин та титр вірусу в разі передінкубації до клиностакування при 4 °С протягом 3 діб

№ дослід	Доля інфікованих клітин, %		Титр синтезованого вірусу, ВУО/мл	
	дослід	контроль	дослід	контроль
1	64	76	$1 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^7$
2	73	56	$0.8 \cdot 10^7$	$0.9 \cdot 10^7$

ядерні включення. В контрольних препаратах інфіковані клітини були полігональної форми, ядра поліморфні з різними типами внутрішньоядерних ДНК-вмісних вірусних включень.

Таким чином, умови модельованої мікрогравітації суттєво не впливають на репродукцію аденовірусу в пермісивній культурі перещеплюваної лінії клітин людини, навіть у випадку інкубування у «передстартових умовах» при 4 °С протягом 3 діб.

Нами в наземних стаціонарних умовах розпочаті дослідження з вивчення взаємовідносин двох ДНК-вмісних вірусів — аденовірусу людини і вірусу Епштейна — Барр (ВЕБ). Вибір вірусів обумовлений тим, що обидва віруси інфекційні і здатні до персистенції в організмі хазяїна, синтез вірусних ДНК і формування віріонів відбувається в ядрі інфікованої клітини, що може сприяти взаємному впливу на функціонування геномів.

Як свідчать результати наших досліджень, у лімфобластодній лінії клітин В95-8, яка трансформована ВЕБ і хронічно продукує його, у випадку суперінфекції аденовірусом синтезуються аденовірусні структурні білки і формуються інфекційні віріони [5]. Рівень цих показників в клітинах В95-8 був значно нижчий, ніж в інших лініях лімфобластодних клітин (Jurkat, Raji), не продукуючих ВЕБ, що можливо пов'язане з інтерференцією аденовірусу і ВЕБ. Методом ПЛР в клітинах В95-8 було виявлено і зниження функціонування геному ВЕБ, зокрема значне ослаблення сигналу ділянки Q геному ВЕБ з координатами 109093—109310 п.н. Разом з цим при гібридизації ДНК, виділених із неінфікованих і інфікованих аденовірусом клітин В95-8 і гідролізованих рестриктазою Hind III, із зондом, який мав послідовності гену раннього ядерного антигену EBNA-1 ВЕБ, виявлений

вплив репродукції аденовірусу на стан геному ВЕБ. Це виражалось у відсутності одного із фрагментів ДНК ВЕБ розміром 4.2 т.п.н. [3]. В клітинах В95-8, інфікованих аденовірусом, виявлені також структурні зміни клітинного геному [6].

Отримані дані свідчать, що в лімфобластодній лінії клітин В95-8, яка продукує ВЕБ, аденовірусний геном функціонує менш інтенсивно, ніж при моноінфекції пермісивних ліній клітин, проте впливає як на стан геному ВЕБ, так і на стан клітинного геному. Вважаємо доцільним використання створеної нами моделі «клітини В95-8 + аденовірус» для досліджень вірус-вірусних і вірус-клітинних взаємовідносин при дії факторів космічного польоту.

Слід зазначити, що аденовіруси можуть бути використані як модель для досліджень впливу космічних факторів на віруси, які з виділеннями людини, тварин і птахів потрапляють в оточуюче середовище і піддаються тривалому впливу різних геофізичних факторів. На відміну від інших вірусів, аденовіруси дуже стійкі і здатні тривалий час зберігатись в оточуючому середовищі. Їх виявляють протягом року в річковій та морській воді, вони стійкі до низьких температур, в ліофілізованому стані здатні зберігатись на пластику і металі до 49 діб [10]. За нашими даними зберігання аденовірусу в культуральному середовищі при температурі 4 та 22 °С протягом 2-3 місяців не знижувало інфекційний титр вірусу. Клиностакування аденовірусу за цих же умов також не впливало на його інфекційність [4].

Вважаємо, що у зв'язку з вираженою стійкістю аденовіруси можуть бути використані та мають переваги з-поміж інших вірусів для досліджень патогенності, мінливості вірусів, підданих довготривалій дії факторів космічного польоту та для досліджень дії геокосмічних факторів на віруси, що перебувають у наземних умовах. Можливо, що внаслідок довготривалої дії різних факторів з'являються і нові серотипи аденовірусів. На сьогоднішній день існує 51 серотип аденовірусів людини. Довготривалі дослідження впливу різних факторів на різних представників родини *Adenoviridae* можуть сприяти з'ясуванню шляхів еволюції і мінливості вірусів, можливої участі в обміні генетичної інформації у біосфері.

1. Дяченко Н. С., Нас И., Беренчи Д. та інш. Аденовирус, клетка, организм. — Киев: Наук. думка, 1988.—232 с.
2. Носач Л. Н., Дяченко Н. С. Цитопатология аденовирусной инфекции. — Киев: Наук. думка, 1982.—124 с.
3. Носач Л. Н., Дяченко Н. С., Повница О. Ю. и др. Изучение состояния вирусных геномов в условиях смешанной инфекции лимфобластоидных клеток аденовирусом и вирусом Эпштейна—Барр // Цитология и генетика.—1998.—32, № 4.—С. 82—88.
4. Носач Л. Н., Дяченко Н. С., Тарасишин Л. А. и др. Определение в наземных условиях температурного режима, длительности пребывания аденовируса человека на орбитальных станциях и влияния клиностагирования на некоторые его свойства // Космічна наука і технологія.—2003.—9, № 1.—С. 96—101.
5. Повница О. Ю., Дяченко Н. С., Черномаз А. А. и др. Особенности репродукции аденовируса человека типа 2 в культурах лимфобластоидных клеток В- и Т-фенотипа // Микробиол. журн.—1997.—59, № 1.—С. 12—20.
6. Смирнова И. А., Кишинская Е. Г., Носач Л. Н. и др. Структурные изменения генома лимфобластоидных клеток В- и Т-фенотипа при моно- или двойном инфицировании аденовирусом и вирусом Эпштейна — Барр // Экспериментальная онкология.—2001.—23, № 1.—С. 57—60.
7. Bordigoni P., Carret A-S., Venard V., et al. Treatment of adenovirus infections in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation // Clin Infect Dis.—2001.—32.—P. 1290—1297.
8. Fuse A., Sato T. Effect of microgravity changes on virus injection in mice // J. Gravit. Physiol.—2004.—11(2).—P. 65—66.
9. Ginsberg H. S. Immune states in long-term space flights // Life Sci. Space Res.—1971.—9.—P. 1—9.
10. Gordon Y. J., Gordon R. Y., Romanowski E., Araullo-Cruz T. P. Prolonged recovery of desiccated adenoviral serotypes 5, 8 and 19 from plastic and metal surfaces in vitro // Ophthalmology.—1993.—100, N 12.—P. 1835—1840.
11. Howard D. S., Phillips G. L., Reece D. E. Adenovirus infections in hematopoietic stem cell transplant recipients // Clin. Infect Dis.—1999.—29.—P. 1494—1501.
12. La Rosa A. M., Champlin R. E., Mirza N., et al. Adenovirus infections in adult recipients of blood and marrow transplants // Clin Infect. Dis.—2001.—32.—P. 871—876.
13. Ling P. D., Lednicky J. A., Keitel W. A., et al. The dynamics of herpesvirus and polyomavirus reactivation and shedding in healthy adults: a 14-month longitudinal study // J. Infect. Dis.—2003.—187.—P. 1571—1580.
14. Long J. P., Pierson S., Hughes J. H. Rhinovirus replication in Hela cells cultured under conditions of simulated microgravity // Aviat. Space Environ Med.—1998.—69.—P. 851—856.
15. Long J. P., Pierson S., Hughes J. H. Suppression of Epstein-Barr virus reactivation in lymphoid cells cultured in simulated microgravity // In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.—1999.—35, N 1.—P. 49—54.
16. Mehta S. K., Cohrs R. J., Forghani B., et al. Stress-induced subclinical reactivation of varicella zoster virus in astronauts // J. Med. Virol.—2004.—72.—P. 174—179.
17. Mehta S. K., Stowe R. P., Fieveson A. H., et al. Reactivation and shedding of cytomegalovirus in astronauts during spaceflight // J. Infect Dis.—2000.—182 (6).—P. 1761—1764.
18. Payne D. A., Mehta S. K., Tyring S. K., et al. Incidence of Epstein—Barr virus in saliva during spaceflight // Aviat. Space Environ Med.—1999.—72.—P. 1211—1213.
19. Pierson D. L. Microbial contamination of spacecraft // Gravit Space Biol Bull.—2001.—14 (2).—P. 1—6.
20. Pierson D. L., Stowe R. P., Phillips T. M., et al. Epstein-Barr virus shedding by astronauts during space flight // Brain Behav Immun.—2005.—19 (3).—P. 235—242.
21. Sonnenfeld G., Gould C. L., Williams J., Mandel A. D. Inhibited interferon production after space flight // Acta Microbiol. Hung.—1988.—35 (4).—P. 411—416.
22. Sonnenfeld G., Shearer W. T. Immune function during space flight // Nutrition.—2002.—18(10).—P. 899—903.
23. Stowe R. P., Mehta S. K., Ferrando A. A., et al. Immune responses and latent herpesvirus reactivation in spaceflight // Aviat. Space Environ Med.—2001.—72.—P. 884—891.
24. Stowe R. P., Pierson D. L., Barrett A. D. Elevated stress hormone levels relate to Epstein-Barr virus reactivation in astronauts // Psychosom. Med.—2001.—63.—P. 891—895.
25. Stowe R. P., Pierson D. L., Feeback D. L., Barrett A. D. Stress-induced reactivation of Epstein-Barr virus in astronauts // Neuroimmunomodulation.—2000.—8 (2).—P. 51—58.
26. Stowe R. P., Sams C. F., Pierson D. L. Effect of mission duration on neuroimmune responses in astronauts // Aviat. Space Environ Med.—2003.—74 (12).—P. 1281—1284.
27. Wang W. H., Wang H. L. Fulminant adenovirus hepatitis following bone marrow transplantation. A case report and brief review of the literature // Arch. Pathol. Lab. Med.—2003.—127.—P. 246—248.
28. Zayzafoon M., Meyers V. E., McDonald J. M. Microgravity: the immune response and bone // Immunol Rev.—2005.—208.—P. 267—280.

---

#### ADENOVIRUSES AS A MODEL IN THE STUDY OF THE EFFECT OF SPACE FLIGHT FACTORS

*L. M. Nosach, O. Yu. Povnitsa, V. L. Zhovnovata*

Simulated microgravity conditions, independently of multiplicity of infection, does not influence the reproduction of adenovirus in cells which were clinorotated for 48 h after adsorption of virus. The incubation of infected cells before clinorotation under static conditions at a temperature of 4 °C for three days (the conditions for keeping of cells before the flight) does not change the number of infected cells relatively to control, but some changes of cell morphology are revealed, namely round off and aggregation of cells. The adenoviruses which were exposed in the medium keep infectivity under the conditions of clinorotation at 4 and 20—22 °C over prolonged periods (90 and 60 days, respectively). A model is elaborated for investigation of the influence of space flight factors on the interaction of the adenovirus and Epstein—Barr virus genomes at combined infection of limphoblastoid cells.