

Изучение воздействия устройства Лотос на ВИЧ-инфекцию *in vitro*.

ОТЧЕТ(часть II).

В группе иммунохимии Института вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМБІ проводились исследования по изучению антивирусного эффекта при воздействии устройства Лотос на ВИЧ-инфекцию *in vitro*. С целью оптимизации условий воздействия и достижения максимального эффекта во второй серии экспериментов было предпринято многократное воздействие устройства на зараженные клетки по 30 минут при комнатной температуре 3 раза в неделю с интервалом 1 день на протяжении всего срока наблюдения (от 10 до 25 суток в зависимости от задач эксперимента). Исследования проводились по следующим направлениям.

I. Изучение влияния устройства Лотос на продукцию вируса хронически зараженными клеточными культурами.

Ранее нами было показано, что однократное воздействие устройства не оказывает заметного влияния на продукцию вируса хронически зараженными клетками линий-продуцентов СЕМ/V_gи и СЕМ/ПЕВ. Характеристика и условия культивирования этих линий описаны в отчете. Во второй серии экспериментов была поставлена задача исследовать уровень вирусной продукции при многократном воздействии устройства Лотос на протяжении более длительного срока (25дней) культивирования. Перед воздействием клетки линий-продуцентов СЕМ/V_gи и СЕМ/Т Т ТВ отмывали центрифугированием при 1000 об/мин 7 минут и ресуспендировали в свежей ростовой среде с концентрацией $0,3 \times 10^6$ в мл (подсчет клеток проводили в камере Горяева). В объеме 1,5 мл клеточную суспензию помещали в лунки 24-луночного планшета и подвергали первичному воздействию устройства. Все последующие воздействия проводились по схеме, описанной выше. С контрольными образцами поступали аналогично (за исключением воздействия устройства). Каждые 3-4 дня из лунок отбирали пробы вирусосодержащей жидкости для определения вирусного антигена методом ИФА (анти-p24, Innogenetics, Бельгия). С той же периодичностью, для поддержания оптимальной концентрации в объеме лунки, клетки рассеивали 1:3, заменяя использованную ростовую среду на свежую. Таким образом, было проведено 7 пассажей с 9-разовым воздействием устройства Лотос.

Для более точной оценки количества продуцируемого клетками вируса образцы вирусосодержащей культуральной жидкости были тестированы в ИФА в разведениях 1:3; 1:9; 1:27; 1:81 и 1:243. Результаты исследований по 2 линиям-продуцентам представлены в таблицах 1А и 1Б. Сравнительный анализ контрольных и опытных образцов показал, что под влиянием устройства независимо от номера пассажа в опытных вариантах титр вируса снижается примерно в 3 раза. Так, в контрольных пробах титр

вируса, продуцируемого клетками СЕМ/V_{tr} был не ниже 1:81 (IY пассаж) и 1:243 (YII пассаж). Тогда как в соответствующих опытных вариантах титр вируса составлял 1:27 (IY пассаж) и 1:81 (YII пассаж). Сравнивая вирусную продукцию в контрольных и опытных образцах линии-продуцента СЕМ/ШВ, можно также наблюдать тенденцию к снижению, однако менее выраженную.

Это хотя и незначительное, но достоверное снижение вирусной продукции в хронически зараженной культуре клеток может быть результатом либо вирулицидного действия устройства на внеклеточный вирус, что приводит к снижению возможной реинфекции, либо воздействие изменяет некие внутриклеточные процессы, влияющие, например на пролиферативную активность клеток и, следовательно, на продукцию вируса.

Кроме того, следует принять во внимание тот факт, что необходимость посева клеток каждые 3-4 дня приводит к тому, что популяция клеток в процессе деления постоянно обновляется, при этом лишь незначительная часть их к концу эксперимента могла быть подвержена 9-кратному воздействию устройства. Основная же часть клеток в среднем испытывала от 4 до 5 воздействий.

II. Влияние устройства Лотос на способность клеток заражаться ВИЧ.

Отмытые и ресуспендированные в свежей среде клетки СЕМ в концентрации $0,3 \times 10^6$ в мл помещали в лунки 24-луночного планшета в объеме 1,5 мл и подвергали воздействию устройства Лотос. Далее клетки заражали штаммами вируса ВИЧ-1/V_{tr} и ВИЧ-1 ЛИВ с множественностью инфекции 0,02 и 0,1 соответственно. В последующие дни воздействие проводилось 3 раза в неделю с интервалом 1 день по 30 минут. За развитием инфекции наблюдали в течение 10 суток, оценивая при микроскопировании цитопатическое действие (ЦПД), выражающееся в клеточной гибели и синцитиеобразовании. Каждые 3-4 дня во время замены 1/2 объема среды из лунок отбирали пробы для последующего определения концентрации вирусного антигена с помощью ИФА.

Согласно визуальным наблюдениям инфекция развивалась как в контрольных, так и в опытных вариантах, с характерным для ВИЧ-инфекции признаками ЦПД в виде клеточной гибели и синцитиеобразования. В опытных вариантах как в случае инфекции ВИЧ-1/V_{tr}, так и в случае инфекции ВИЧ-1/ШВ наблюдалась несколько большая гибель клеток. К 10 суткам инфекции во всех образцах ЦПД достигал максимального проявления, оцениваемого, как +3,5-4. Проведенный затем иммуноферментный анализ образцов, отобранных на 4 и 10 сутки инфекции, показал, что и в опытных и в контрольных клетках инфекция развивается достаточно эффективно, обнаруживая уже к 4 суткам высокий уровень вирусного антигена в культуральной жидкости (Таблица 2). Применение вышеописанного способа титрования образцов позволило обнаружить некоторые различия в количестве продуцируемого вируса в контрольных и опытных клетках (Таблица 3). Так, к

10 суткам, когда инфекция достигает максимального развития титр вируса в опытном образце не менее, чем в 3 раза ниже по сравнению с контрольным.

Для того, чтобы установить, обладает ли вирусное потомство, выращенное в опытных и контрольных клетках, одинаковой биологической активностью, свежие клетки СЕМ заражали вирусосодержащей жидкостью от 10-суточной инфекции (множественность заражения 0,02). По истечении 4 суток «новой» инфекции, как показывают результаты ИФА (табл. 4), вирусное потомство из обработанных клеток (опытный вариант) обнаруживает несколько сниженную вирулентность (в 3 раза при титре 1:81). При дальнейшем культивировании зараженных клеток (до 7 суток) продукция вируса становится столь значительной, что в разведении 1:81 обнаружить различия между опытным и контрольным вариантами не удается.

III. Влияние устройства Лотос на репликацию ВИЧ.

Клетки СЕМ в концентрации $0,3 \cdot 10^6$ в мл в объеме 1,5 мл вносили в 24-луночный планшет и заражали референс-штаммами ВИЧ_{1BRU} и ВИЧ_{1ШВ} с различной множественностью инфекции (0,1; 0,01 и 0,001). Зараженные клетки сразу же подвергались воздействию устройства Лотос 30 мин при комнатной температуре, а в последующие дни инфекции в режиме, описанном выше. Наблюдение за развитием инфекции проводили как описано в пункте II. При визуальном наблюдении вирусиндуцированного цитопатического эффекта была отмечена несколько большая гибель клеток в опытных вариантах СЕМ:BRU и СЕМ:ШВ, особенно четко проявлявшаяся при м.з. 0,01 к 7 суткам.

Согласно данным ИФА (p24) к 4 и тем более к 10 суткам репликация вируса достигает существенного уровня и в контрольных и в опытных вариантах (табл. 5). Дальнейшее титрование образцов жидкости, полученной от инфекции СЕМ:BRU с множественностью заражения 0,01 на 4 и 10 сутки показывает, что при 2-кратном воздействии устройства (4 суток) репликация вируса несколько ниже по сравнению с контрольным вариантом. К 10 суткам наблюдаемый эффект нивелируется и в пределах указанных разведений образцов не определяется (табл. 6).

IV. Влияние устройства Лотос на биологическую активность вирусного потомства.

Для оценки биологической активности вирусного потомства вирусосодержащую жидкость 10-суточной инфекции СЕМ:BRU (0,01) (4-кратное воздействие) использовали для заражения «свежих» клеток СЕМ с м.з. 0,01 (см. рис.1). Визуальные наблюдения показали следующее: начиная с 3 суток от начала инфекции в пробах, зараженных контрольными образцами, обнаруживается существенно большее количество синцитиев. Для сравнения на 4 сутки в пробе, зараженной контрольным образцом вирусосодержащей жидкости (от м.з. 0,01) обнаруживается множество синцитиев, тогда как в

аналогичной пробе опытного образца синцитии к этому сроку отсутствуют совсем. Более высокий цитопатический эффект свидетельствует о более активной инфекции.

По результатам ИФА (4 сутки новой инфекции) вирулентность вирусного потомства, полученного в опытном варианте заметно ниже (~ в 10 раз) в сравнении с контрольным (табл. 7). К 7 суткам активная инфекция наблюдается как в контрольном, так и в опытном образцах параллельно при визуальной оценке и по результатам ИФА, показывающим, что определить каких-либо различий не удается.

Полученные данные свидетельствуют о том, что вирусное потомство из опытных образцов обладает пониженной репликативной активностью. Это можно объяснить либо снижением количества образующихся вирусных частиц в процессе воздействия устройства Лотос, либо образованием большого числа дефектных частиц. Какова бы ни была причина тем не менее следует отметить, что активная часть вирусного потомства с нормальными репликативными свойствами, способная вызывать активную инфекцию, сохраняется в популяции.

IV. Влияние устройства на синцитиеобразующую способность зараженных клеток.

Клетки от 10 суточной инфекции (рис. 1) сокультивировали с незараженными клетками Sup-T1 (концентрация $0,5 \cdot 10^6$ клеток в мл) в соотношении 1:2. По истечении 48 часов проводили подсчет синцитиев в лунках под микроскопом. За синцитий принимали структуру с диаметром, превышающим 3 и более диаметров нормальной клетки. Результаты этих экспериментов представлены в табл. 8.

Полученные данные отчетливо показывают, что зараженные клетки опытных образцов обладают гораздо меньшей способностью образовывать синцитии при сокультивации с незараженными клетками Sup-T1. При этом, чем меньше была исходная доза заражения (0,01 и 0,001), тем меньшее число клеток после 10 суток инфекции способно соединяться с незараженными клетками. Это наблюдается как в случае ВИЧ₁ВКИ инфекции, так и в случае ВИЧ₁ШВ-инфекции.

Процесс вирусиндуцированного синцитиеобразования основан на взаимодействии вирусных гликопротеинов gp120/gp41, экспонированных на поверхности зараженной клетки со специфическими рецепторами и корецепторами незараженной клетки CD4, CXCR4 (и др.), приводящим к слиянию клеточных мембран и образованию гигантских многоядерных структур, хорошо различимых под микроскопом.

Обнаруженные нами различия в синцитиеобразующей способности зараженных клеток контрольных и опытных образцов могут иметь в основе разные причины, как например:

- 1) содержание меньшего числа зараженных клеток с экспонированными вирусными гликопротеинами в популяции после 10 суточного культивирования;
- 2) повреждение рецепторного (и/или фузионного) сайга поверхностных вирусных гликопротеинов в результате воздействия устройства Лотос.

Заключение.

На основании проведенных исследований было установлено:

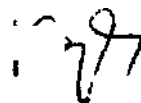
- 1) Устройство Лотос снижает продукцию вируса в хронически зараженных клеточных культурах. Несмотря на то, что обнаруженное антивирусное действие невысоко (обнаруживается только при титровании вирусосодержащего материала), тем не менее, этот факт заслуживает внимания потому, что подавление хронической инфекции является весьма трудной задачей.
- 2) Вторая серия экспериментов обнаруживает повторяемость выявленных ранее закономерностей, а именно, снижение репродукции вируса в клетках предобработанных перед заражением или при воздействии устройства сразу же после заражения клеток вирусом.
- 3) Предпринятая попытка усилить антивирусный эффект путем многократного воздействия устройства Лотос не дала ожидаемого результата. По-видимому в силу достаточно высокой пролиферативной активности используемых для заражения клеток, нельзя считать, что все клетки зараженной популяции испытывали многократное воздействие.
- 4) Более ощутимый ингибирующий эффект от воздействия устройства наблюдается при исследовании биологической активности вирусного потомства. При этом титр вируса снижается не менее, чем в 10 раз.
- 5) Значительное подавление синцитиеобразующей способности клеток дает основания сделать предположение о влиянии устройства на рецепторно-фузионные сайты вирусных гликопротеинов.

Руководитель группы иммунохимии
НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН



Карамов Э.В.

Старший научный сотрудник
группы иммунохимии
НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН



Корнилаева Г.В.

Таблица 1(А). Изучение влияния устройства «Лотос» на вирусную продукцию в хронически инфицированных культурах клеток СЕМ/Vru (А) и СЕМ/ШВ (Б).

(А) - линия-производитель СЕМ/Vru

1 пассаж					
Образцы	б/р*	1:3	1:9	1:27	1:81
Контроль ¹	2,538"	2,350	2,197	2,070	1,471
Опыт ²	2,51	2,298	2,245	2,122	1,290 (85.8%)
IV пассаж					
Контроль	2,1514	2,33	2,197	2,025	1,25
Опыт	2,4727	2,149	1,989	1,013 (44.5%)	0,397 (18.3%)
VII пассаж					
Контроль	2,502	2,35	2,233	2,184	1,819
Опыт	2,39	2,298	2,255	2,114	1,588 (85.7%)
VII пассаж					
	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
Контроль			2,064	1,915	1,170
Опыт			1,853	1,116	0,482

¹. - Контроль - клетки линии СЕМ/Vru, не подвергавшиеся воздействию.

². - Опыт - клетки линии СЕМ/Vru после воздействия устройства "Лотос" в режиме, описанном в тексте.

* - разведения вирусосодержащей культуральной жидкости (б/р - без разведения).

** - результаты ИФА (р24), выраженные в оптической плотности (492 нм).

Таблица 1 (Б).**(Б) - линия-продуцент СЕМУШВ**

Образцы	I пассаж				
	б ₀ *	1:3	1:9	1:27	1:81
Контроль ¹	2,565**	2,415	2,183	1,953	1,165
Опыт ²	2,572	2,321	2,168	1,953	0,894 (71,9%)
IV пассаж					
Контроль ¹	2,603	2,404	2,226	2,070	1,532
Опыт ²	2,521	2,236	2,095	1,645 (77,2%)	0,644 (33,3%)
VII пассаж					
Контроль ¹	2,514	2,330	2,257	2,158	2,009
Опыт ²	2,490	2,310	2,245	2,179	1,783 (87,5%)
VII пассаж					
	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
Контроль ¹		2,237	2,146	1,957	1,193
Опыт ²		2,225	2,106	1,771	0,824

1,2, *, ** - см. пояснения к таблице 1 (А).

Таблица 2. Изучение влияния устройства "Лотос" на способность клеток СЕМ заражаться ВИЧ.

Вирусный штамм	Образец	Продолжительность развития инфекции	
		4 суток	10 суток
ВИЧ-1 _в яи	Контроль ¹	2,286*	2,060
	Опыт ²	2,428	2,137
ВИЧ-1 _ш в	Контроль	2,311	2,548
	Опыт	2,201	2,112

1. Контроль - клетки СЕМ, не подвергались воздействию устройства.

2. Опыт - клетки, обрабатывали перед заражением в течение 30 мин. при комн. температуре.

* - результаты ИФА (p24), выражены в оптической плотности (образцы вирусосодержащей жидкости без разведения).


 - образцы, использованные для определения вирусного антигена в разведениях (табл. 3).

Таблица 3. Применение метода титрования для точной оценки уровня развития инфекции в контрольных и опытных образцах клеток СЕМ, зараженных штаммом ВИЧ-1_вки после воздействия устройства (см. табл. 2).

Образец	б\р	1:3	1:9	1:27	1:81
4 суток					
Контроль ¹	2,311	0,703	0,363	0,208	0,166
Опыт ²	2,201	0,682	0,344	0,188	0,241
10 суток					
Контроль ¹	2,548	2,350	2,211	2,070	1,528
Опыт ²	2,112	1,986	1,771	0,960	0,318

Таблица 4. Оценка биологической активности вирусного потомства, выращенного в клетках СЕМ, подвергавшихся воздействию устройства перед заражением, штамм ВИЧ-1BRU.

Обозец	1:3	1:9	1:27	1:81
4 суток				
К	2,371	2,290	2,270	2,084
О	2,043	1,912	1,448	0,674
7 суток				
К	2,084	2,103	2,118	2,039
О	2,151	2,171	2,131	2,093

К - вирусодержащая жидкость контрольного образца, после 10 суток инфекции, использованная для заражения клеток СЕМ.

О - вирусодержащая жидкость опытного образца после 10 суток инфекции, использованная для заражения клеток СЕМ.

Таблица 5. Изучение влияния устройства «Лотос» на репликацию ВИЧ в клетках СЕМ, зараженных с различной множественностью инфекции (0,1; 0,01; 0,001) и подвергавшихся первичному воздействию на этапе адсорбции.

Штамм вируса	Образец	4 суток			10 суток		
		0,1	0,01	0,001	0,1	0,01	0,001
ВИЧ-1 BRU	Контроль	2,526	2,402	2,172	2,468	2,396	1,855
	Опыт	2,526	2,340	2,006	2,383	2,034	2,164
ВИЧ-1ШВ	Контроль	2,442	1,972	2,283	2,230	1,643	2,106
	Опыт	2,382	2,118	2,293	2,483	1,467	2,040


 - образцы использованные для определения вирусного антигена в разведениях (табл. 6)

Таблица 6. Титрование контрольного и опытного образца клеток СЕМ зараженных штаммом ВИЧ-1_{BRU} (см. табл.5).

Образец	множественность заражения 0,01				
	б ₀	1:3	1:9	1:27	1:81
4 суток					
К	2,402	1,999	1,188	0,550	0,286
О	2,340	1,429	0,711	0,351	0,379
10 суток					
К	2,396	2,438	2,356	2,298	2,126
О	2,034	2,432	2,384	2,244	1,976

Таблица 7. Оценка биологической активности вирусного потомства, выращенного в клетках СЕМ, при воздействии устройства в начале заражения (штамм ВИЧ-1_{вки м.з. 0,01})

Образец	б _п	1:3	1:9	1:27	1:81
4 СУТОК					
К	2542	2.425	2.314	2254	2.046
О	2.643	1.474	0.665	0.359	0.267
10 СУТОК					
К	-	2.116	2.135	2.131	2.034
О	-	2,175	2.191	2.169	2.146

К - вирусодержащая жидкость 10 - суточной инфекции без воздействия, использованная для заражения клеток линии СЕМ.

О - вирусодержащая жидкость 10 - суточной инфекции после 4-кратного воздействия, использованная для заражения клеток СЕМ.

Таблица 8. Активность синцитиеобразования при сокультивации зараженных клеток после 10 суток инфекции и 4-кратного воздействия устройства с незаряженными клетками линии Sup-T1.

Штамм вируса	образец	Множественность заражения		
		0,1	0,01	0,001
ВИЧ-1 _{BRU}	К	150*	162	164
	О	100	20 (12,3%)	11(6,7%)
ВИЧ-1 _{ШВ}	К	51	12	7
	О	56	2 (16,7%)	0

- К** - клетки от 10-суточной инфекции контрольных образцов,
О - клетки от 10-суточной инфекции опытных образцов,
 * количество синцитиев на весь объем лунки 96-луночного планшета.