

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біології та біоінформатики

доц. Олексій Юрійович Нипорко

Протокол №__ засідання кафедри

від “__” _____ 2023 р.

РОЛЬ МІТОХОНДРІЙ У ВЗАЄМОДІЇ КЛІТИНА-ВІРУС

Випускна дипломна робота студента

4 курсу спеціальності 091 Біологія

ОП «Біологія (високі технології)»

Тяска Антона Васильовича

Науковий керівник від кафедри

доцент кафедри молекулярної

біотехнології та біоінформатики

Олексій Юрійович Нипорко

Робота виконана у Інституті мікробіології та вірусології

ім. Д.К. Заболотного.

Під керівництвом старшого дослідника, к.б.н., Н.М. Жолобак

Оцінка захисту роботи

Київ — 2023 р.

АНОТАЦІЯ

Дипломна робота бакалавра: рисунків 5, джерел 40, сторінок 43, додатків 10.

Тяско А.В. Роль мітохондрій у розвитку вірус-клітинної взаємодії. – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біологія (високі технології)». У роботі проведено аналіз сучасних знань щодо участі та ролі мітохондрій у розвитку вірус-індукованих реакцій клітини, а також в умовах *in vitro* в модельній системі вірус везикулярного стоматиту – культура клітин MA104 досліджено зміни метаболічної активності мітохондрій в процесі вірус-клітинної взаємодії. Було виявлено, що за допомогою МТТ-тесту можна легко визначити та порівняти загальну мітохондріальну активність у клітині. Отримані результати можуть бути використані для кращого розуміння процесів, які відбуваються з клітиною після взаємодії з вірусом, що може бути методологічним підґрунтям для розробки сучасних методів терапії вірусних інфекцій.

Ключові слова: мітохондрія, MA104, вірус везикулярного стоматиту, МТТ, взаємодія вірус-клітина.

Зміст

Вступ	7
Розділ 1. Огляд літератури.....	8
Мітохондріальна дисфункція	10
Вірус-мітохондріальна взаємодія.....	10
Мітохондріальна динаміка.....	11
Поточний стан досліджень за темою на основі огляду літератури	14
Розділ 2. Експериментальна частина	23
Матеріали дослідження.....	23
Хід роботи	23
Опис та обґрунтування використаних методів досліджень	25
МТТ аналіз	25
Культура клітин МА 104.....	26
Розділ 3. Результати.....	27
Аналіз можливих похибок	30
Висновок.....	33
Список використаних джерел.....	34
Додатки	39

Список скорочень

CARDIF	домен мітохондріального антивірусного сигнального білка
DAMP	молекулярні патерни, пов'язані з пошкодженням
dsRNA	Дволанцюгові вірусні РНК
E3 TRIM25	убіквітин-лігаза
ETC	ланцюг транспортування електронів
glut-1	транспортер глюкози
HCMV	Цитомегаловірус
HIF-1 α	фосфопротеїн
IFN	інтерферон
IL-4	Інтерлейкін 4
IPS-1	домен мітохондріального антивірусного сигнального білка
LGP2	внутрішньоклітинний рецептор розпізнавання патерну
MAVS	мітохондріальна антивірусна сигналізація
MDA5	внутрішньоклітинний рецептор розпізнавання патерну
NET	Позаклітинні пастки нейтрофілів
OXPPOS	Окисне фосфорилування
PAMP	молекулярні патерни, пов'язані з патогенами
pol-III	РНК-полімераза III
poly(I:C)	Поліінозин: поліцитидилова кислота
PRR	рецептор розпізнавання образів
RIG-1	внутрішньоклітинний рецептор розпізнавання патерну
RLR	RIG-I-подібні рецептори

ROS	Активні форми кисню
ssDNA	Одноланцюгова ДНК
TLR-3	Тол-подібний рецептор 3
TLR-7	Тол-подібний рецептор 7
TLR-8	Тол-подібний рецептор 8
TRAF6	Білок, який бере участь у запальних реакціях
VISA	домен мітохондріального антивірусного сигнального білка
$\Delta\Psi_m$	потенціал мітохондріальної мембрани
АФК	Активні форми кисню
ВГС	вірус гепатиту С
ВПГ-1	Вірус простого герпесу 1-го типу
ВВС	Вірус везикулярного стоматиту
ГТФ	Гуанозинтрифосфат
дцДНК	Дволанцюгова ДНК
мтДНК	Мітохондріальна ДНК
мтДНК CpG	Мітохондріальна ДНК з CpG-острівцем
рРНК	Рибосомна РНК
тРНК	Транспортна РНК
ТЦА цикл	цикл Кребса
ФАО	цикл окислення жирних кислот
DDX3	MAVS-взаємодіючий білок, що бере участь у протівірусній відповіді
PGC-1 α	активований рецептор- γ коактиватор
PINK1	індукована передбачувана кіназа 1
TRAF5	MAVS-взаємодіючий білок, що бере участь у протівірусній відповіді, та у запальних реакціях
IKKi/IKK ϵ (IKKi)	MAVS-взаємодіючий білок, що бере участь у протівірусній відповіді

NEMO	MAVS-взаємодіючий білок, що бере участь у протівірусній відповіді
WDR5 IRF3	MAVS-взаємодіючий білок, що бере участь у протівірусній відповіді
IRF7	MAVS-взаємодіючий білок, що бере участь у протівірусній відповіді
STING	MAVS-взаємодіючий білок, що бере участь у протівірусній відповіді
TRAF3	MAVS-взаємодіючий білок, що бере участь у протівірусній відповіді
NLRC5	Білок, який бере участь у запальних реакціях
NLRX1	Білок, який бере участь у запальних реакціях
TRAF2	Білок, який бере участь у запальних реакціях
TAK1	Білок, який бере участь у запальних реакціях
IKK α/β	Білок, який бере участь у запальних реакціях
ISRE	IFN-стимульовані елементи відповіді

Вступ

Вірусні захворювання спричиняють зростаючу частку смертей у всьому світі. Віруси маневрують механізмами клітин-господарів, намагаючись порушити стабільність внутрішньоклітинного середовища, змінивши його на сприятливе для їх реплікації. Мітохондріальна мережа дуже чутлива до фізіологічних та зовнішніх впливів, включаючи вірусні інфекції. Віруси впливають на мітохондріальні функції та метаболізм мітохондрій, а також вроджену імунну передачу сигналів. Відродження інтересу до вивчення взаємодій вірус-хазяїн в літературі за останні роки підкреслює ключову роль мітохондрій і метаболізму хазяїна в життєвих процесах вірусу.

Мітохондріальна дисфункція призводить до пошкодження мітохондрій, які утворюють токсичні сполуки. Викликані ними зміни мітохондріальної ДНК супроводжуються розвитком системної токсичності, що призводить до пошкодження багатьох органів в організмі. Мітохондріальна динаміка та мітофагія важливі для підтримки контролю якості мітохондрій та гомеостазу. Тому метаболічні антагоністи можуть бути необхідними для кращого розуміння вірусних захворювань і розробки ефективних антивірусних терапевтичних засобів.

У цьому дослідженні ми побачили, як віруси використовують мітохондріальну динаміку для власної репродукції та викликають пов'язані з цим цитопатичні зміни. Дослідження в цій сфері допоможуть краще розуміти вірус-клітинну взаємодію та можливі варіанти впливу на ті чи інші клітинні метаболічні процеси, зокрема вірус-індуковану дисфункцію мітохондрій для забезпечення гомеостазу всього організму.

Розділ 1. Огляд літератури

Мітохондрії вперше були ідентифіковані понад століття тому і спочатку їх називали «біобластами». Пізніше термін «мітохондрії» було введено Карлом Бенда і буквально означає «мітос-нитка» і «хондріон-гранула» [1]. Спочатку вважали, що роль мітохондрій у клітині полягає лише у виробленні енергії у вигляді аденозинтрифосфату (АТФ), і їх досі називають «електростанціями клітини». Однак, дослідження останніх кількох десятиліть надали переконливі докази того, що мітохондрії беруть активну участь у багатьох клітинних процесах, включаючи передачу сигналів, проліферацію та смерть. Важливо зазначити, що хоча більшість еукаріотичних клітин містять мітохондрії, розмір, кількість і їх розташування значно відрізняються залежно від потреб клітини. Наприклад, у нейрональних клітинах мітохондрії накопичуються переважно в місцях з високим рівнем споживання енергії, таких як пресинаптичні терміналі, вузли Ранв'є, конуси та гілки активного росту [3]. З огляду на роль мітохондрій у різноманітних клітинних процесах, не дивно, що пошкодження мітохондрій було причетне до патогенезу ураження органів-мішеней при різноманітних захворюваннях [4–23].

Мітохондрії є унікальними органелами, оскільки їх структура забезпечує просторове розділення метаболізму. Це дуже складні органели, які містять два фосфоліпідних двошари, завдяки чому їх можна розділити на 4 різні сегменти: зовнішня мембрана, міжмембранний простір, внутрішня мембрана і матрикс. Зовнішня мембрана органели за своїм вмістом ідентична плазматичній мембрані еукаріотичних клітин (рівне співвідношення вмісту білка до фосфоліпідів за масою). Вона містить порини, які дозволяють молекулам менше, ніж 5 кДа вільно розповсюджуватись. Однак більші білки вимагають наявності цільової послідовності, яка дозволить зв'язуватися зі специфічними транспортерами (транслоказою зовнішньої мембрани — ТЗМ і внутрішньої мембрани —

ТВМ) на мембрані для входження в органелу [26–29]. Тому зовнішня мембрана в основному служить бар'єром проникності для цитозольних компонентів.

Донедавна вважалося, що міжмембранний простір не має специфічної функції і за своїм вмістом ідентичний цитозолу. Однак новітні дослідження показали важливу роль цього простору в підтримці мітохондріального гомеостазу, включаючи сортування білків і гомеостаз ліпідів. Внутрішня мембрана мітохондрій, мабуть, є найбільш детально вивченим компонентом клітинної мембрани через її відносну важливість в окисному фосфорилуванні. Ця мембрана містить найбільшу кількість білків на фосfolіпідний фрагмент у клітині. Ці білки є невід'ємною частиною ланцюга транспорту електронів, синтезу та транспорту АТФ. Внутрішня мембрана також відрізняється від інших мембран наявністю крист (інвагінацій мембрани), які розділяють і значущо збільшують площу поверхні. Внутрішня мембрана також менш проникна для іонів і молекул, допомагає розділити на частини мітохондріальний матрикс та цитозоль, тим самим діючи як електричний ізолятор і хімічний бар'єр. Це допомагає підтримувати градієнт електронів через мембрану, який забезпечує утворення АТФ.

Мітохондріальний матрикс клітин ссавців містить мітохондріальний ДНК (геном 16,5 кілобази), яка кодує майже 13 білків, деякі з яких беруть участь у окисному фосфорилуванні. Решта білків, необхідних для нормальної роботи мітохондрії кодуються ядерним геномом і імпортуються в мітохондрії. Матрикс також містить більшість ферментів, необхідних для циклу лимонної кислоти, яка окислює ацетил коензим А і в процесі генерує енергію у вигляді нікотинамідаденіндинуклеотиду (NADH) і флавінаденіндинуклеотиду (FADH₂). Потім ці молекули служать субстратами для окисного фосфорилування білками у внутрішній мембрані для генерування клітинної енергії в формі АТФ.

Мітохондріальна дисфункція

Останні досягнення в дослідженні ролі мітохондріальної дисфункції у спричиненні захворювань людини призвели до збільшення кількості досліджень, спрямованих на мітохондріальні білки, метаболічні процеси та подальші сигнальні шляхи. Мітохондрії можуть відчувати запалення, інфекцію та/або вплив навколишнього середовища через структурні зміни в мітохондріальних мембранах і експресію білка, що призводить до їх дисфункції [4,5,6,7]. Мітохондріальна дисфункція також впливає на метаболізм, регуляцію кальцію, скоротливість дихальних шляхів у легенях, збереження генів і білків, окислювальний стрес, проліферацію клітин і апоптоз. Мітохондрії у стані дисфункції змінюють гомеостатичні клітинні процеси, включаючи старіння [8], а також захворювання дихальних шляхів [9,10]. Таким чином, розуміння того, як динаміка мітохондрій впливає на різні захворювання, відкриє нові шляхи, які сприятимуть розробці нових терапевтичних засобів, спрямованих на відновлення функціонування мітохондрій.

Вірус-мітохондріальна взаємодія

Віруси є облігатними паразитами, реплікація та проліферація яких повністю залежить від апарату клітини-господаря. Віруси порушують метаболізм клітин-господарів і викликають значні зміни в клітинних і фізіологічних функціях [11]. Роль мітохондріальної динаміки у вірусних інфекціях все ще з'ясовується, але мітохондрії однозначно оцінюють як ключ для регуляції клітинного метаболізму та вродженого імунітету, а також багатообіцяючий шлях для подальших молекулярних досліджень вірусного патогенезу. Під час вірусних інфекцій мітохондрії стають мішенями для вірусних білків, а також зазнають впливу викликаних вірусом фізіологічних змін, таких як окислювальний стрес, гіпоксія, стрес ендоплазматичного ретикулуму (ER стрес) і порушення регуляції гомеостазу кальцію [11,12]. Імовірний метаболічний зв'язок між

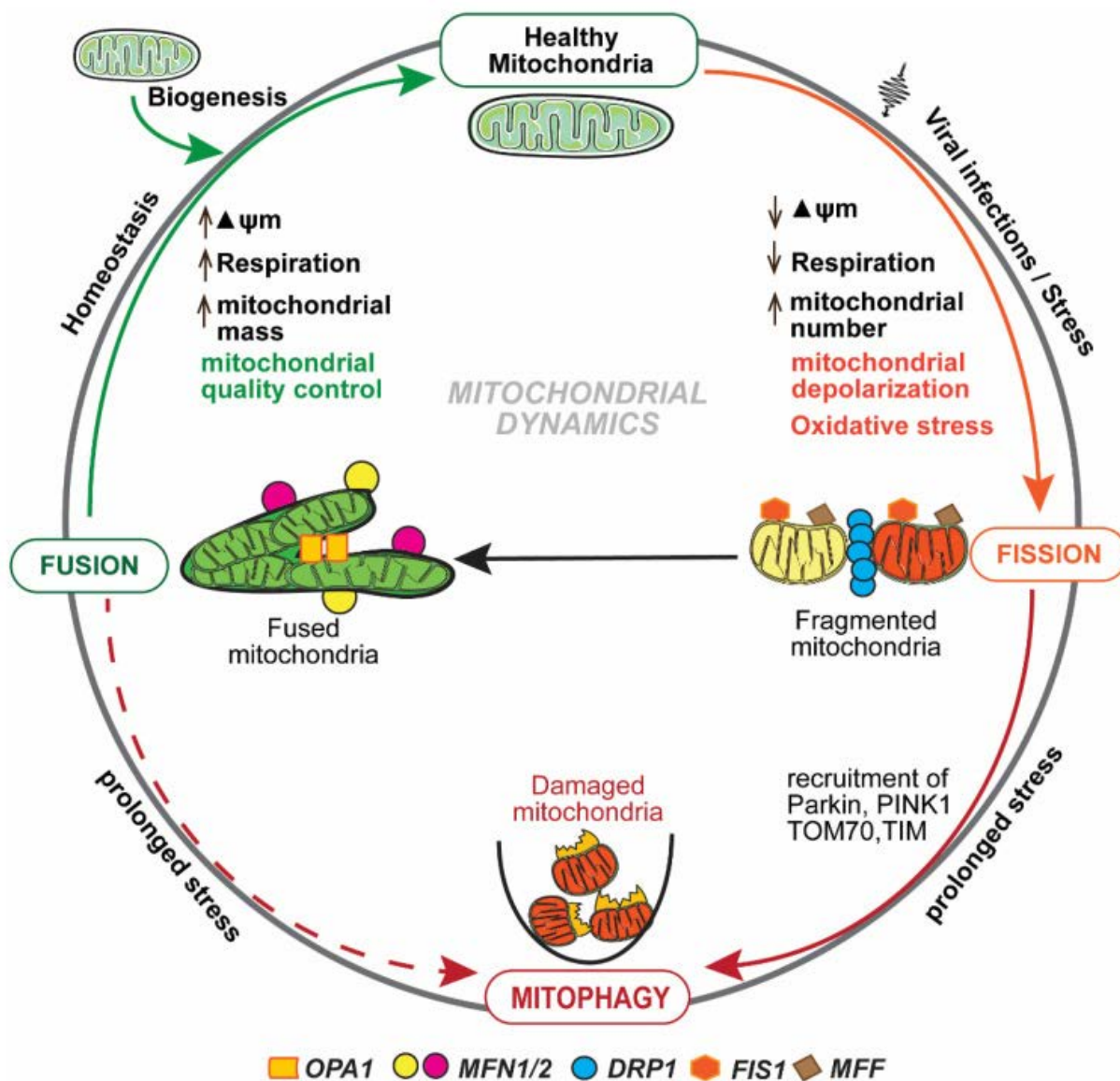
мітохондріями та вірусом грипу А, а також з вірусами герпесу був показаний ще у 1950-х роках Акерманом та його колегами [13,14]. Недавні дослідження показали як вірус гепатиту В (HBV) [15,16] і вірус гепатиту С (HCV) викликають зміни в мітохондріальній динаміці, що забезпечує формування стійкої інфекції [17,18]. Додаткові дослідження ролі мітохондріальної динаміки в патогенезі вірусів покращать наше розуміння взаємодій господар-вірус, що призведе до розробки нових антивірусних стратегій. У роботі ми обговорюємо важливість мітохондріальної біоенергетики під час специфічних вірусних інфекцій і вплив на спричинену вірусом мітохондріальну дисфункцію, що, згідно літературних даних, призводить до змін у вроджених імунних реакціях.

Мітохондріальна динаміка

Мітохондріальний біогенез – це складний процес, який включає координацію ядерних і мітохондріальних генів для забезпечення точної функції білків мітохондріального ланцюга транспортування електронів. Мітохондрії дуже динамічні, але вони не можуть утворюватися заново. Кожна мітохондрія складається з зовнішньої пористої мембрани, міжмембранного простору, внутрішньої мембрани, де відбувається ланцюг транспортування електронів (ЕТС); і мітохондріального матриксу – основного місця для метаболічних шляхів, таких як цикл ТСА і окислення жирних кислот (FAO). МтДНК людини є дволанцюговою кільцевою молекулою ДНК, що складається з 16 569 пар основ [21]. Мітохондріальний геном складається з 37 генів, які кодують 13 поліпептидів (основні гени ЕТС), 2 гени рРНК (12S і 16S рРНК) і 22 гени тРНК, необхідні для синтезу мітохондріальних білків [22]. Решта мітохондріальних білків кодуються ядерними генами, і приблизно 1500 ядерних кодованих білків беруть участь у регуляції мітохондріальних функцій у людини [23,24].

Мітохондріальний гомеостаз підтримується переважно мітохондріальною динамікою та мітофагією [25], як показано на малюнку 1.

Мітохондрії утворюють трубчасту мережу, яка постійно змінюється шляхом поділу та злиття [26], і обидва ці процеси регулюються великими гуанозинтрифосфатазами (ГТФазами). [27]. Поділ і злиття мітохондрій є безперервними процесами, а дисфункціональні або пошкоджені мітохондрії усуваються за допомогою жорстко регульованого процесу, відомого як мітофагія [28]. Поділ бере участь у корекції мутацій у копіях мтДНК [29], тоді як злиття забезпечує швидкий обмін та врівноваження матричних метаболітів і рециркуляцію частково пошкоджених мітохондрій у повністю здорову мітохондріальну мережу [25]. Необоротно пошкоджені мітохондрії вибірково елімінуються мітофагією [28]. Злиття мітохондрій і мітофагія, на перший погляд, виконують однакову функцію, але насправді вони чітко доповнюють один одного і одночасно відіграють вирішальну роль у мітохондріальному гомеостазі [25,26]. Потенціал мітохондріальної мембрани ($\Delta\Psi_m$) відіграє важливу роль у процесі ідентифікації та виділення пошкоджених мітохондрій [30,31]. Під час клітинного циклу мітохондрії дотримуються моделі «поцілунок і втеча», яка сприяє злиттю протягом дуже короткого періоду (секунди), після чого відбувається зміна клітини, яка переходить до поділу [32]. Таким чином, механізми поділу, злиття та мітофагії працюють разом, щоб запобігти циркуляції пошкоджених або дисфункціональних мітохондрій в здоровому пулі мітохондрій. Якість і функція мітохондрій визначаються точним балансом між безперервним поділом і злиттям, а подальші процеси, які індукуються, виявляють величезний вплив на наслідки імунної відповіді під час вірусних інфекцій.



Малюнок 1

Мітохондріальна динаміка: поділ і злиття мітохондрій є суворо регульованими безперервними процесами для підтримання мітохондріального гомеостазу. Вірусні інфекції маневрують мітохондріальною динамікою та змінюють потенціал мітохондріальної мембрани ($\Delta\Psi_m$), функцію мтДНК і швидкість дихання. Переривання будь-якої з цих функцій/шляхів призводить до накопичення дисфункціональних мітохондрій, які елімінуються мітофагією.

Поточний стан досліджень за темою на основі огляду літератури

Віруси викликають зміни в мітохондріальних функціях, сприяючи трансляції та збірці вірусів. Одна з теорій полягає в тому, що взаємодії між вірусом і мітохондріями перешкоджають асоційованим з мітохондріями антивірусним сигнальним механізмам [33]. У вірусів гепатиту мітохондріальна антивірусна сигналізація (MAVS) відбувається через мітофузини, які взаємодіють з MAVS, щоб ініціювати ефективний антивірусний імунітет [34]. Блокування мітофузинів у клітинах призводить до втрати потенціалу мітохондріальної мембрани ($\Delta\Psi_m$), що супроводжується порушенням антивірусних імунних реакцій, що свідчить про те, що цілісність мітохондрій є важливою для функціонування вродженого антивірусного імунітету. Подібним чином підвищений $\Delta\Psi_m$ індукує апоптоз, тоді як знижений $\Delta\Psi_m$ запобігає апоптозу, а віруси, такі як цитомегаловірус людини (HCMV), знижують $\Delta\Psi_m$, щоб запобігти загибелі клітин сприяючи таким чином власній реплікації [35]. РНК ($\beta 2.7$), кодована HCMV, локалізована в мітохондріях, взаємодіє з комплексом I транспортного ланцюга електронів і інгібує клітини, що піддаються апоптозу [36], швидко знижуючи активність мітохондрій і посилюючи реплікацію вірусу. Індуковані вірусом зміни цілісності мітохондрій також призводять до активації циклу трикарбонових кислот та подальшої регуляції біосинтезу ліпідів, необхідного для оболонки вірусу, збільшення ядра та везикулярних тіл інфікованих клітин [37,38]. Під час інфікування ВГС клітини, що експресують поліпротеїн ВГС, продемонстрували посилену гліколітичну функцію, опосередковану стабілізацією HIF-1 α , з подальшим зниженням функції мітохондрій, навіть у присутності клітинного кисню, що призводить до збільшення вмісту клітинного АТФ [39]. Повідомлялося про підвищення рівня АТФ при інфекціях, спричинених гепатитом та вірусом простого герпесу-1 (ВПГ-1) [40]. Вірусні інфекції також індукують АФК, які контролюють реплікацію, змінюючи

функцію мітохондрій. При інфекції HCV накопичення дефектних мітохондрій призводить до окислювального стресу та загибелі клітин [31]. Підвищена генерація ROS у клітинах індукує MAVS нижче за течією, IRF3 та NFκB, для пригнічення реплікації вірусу, пов'язуючи захисну імунну відповідь із вірусною інфекцією. З іншого боку, мітофагія зменшує виробництво АФК шляхом видалення дисфункціональних мітохондрій для контролю загострення імунної відповіді [32]. Роль мітофагії в контролі реплікації вірусу ще належить встановити. Тим не менш, цікаво відзначити, що мітофагія захищає клітину від вразливих клітинних метаболічних станів. Ці вірусні ефекти, ймовірно, відрізняються залежно від самого вірусу та того, як він заражає, розмножується та модифікує вроджені імунні реакції клітини.

Мітохондрії походять від симбіотичних бактерій, але еволюціонували разом зі своїм господарем, оскільки більшість мітохондріальних білків кодується ядром. Однак мітохондріальний геном кодує білки, критичні для дихання. Мітохондрії відіграють центральну роль у клітинному метаболізмі, оскільки ключові шляхи, такі як ТСА, FAO, окисне фосфорилування (OXPHOS), буферизація кальцію та біосинтез гему, відбуваються в мітохондріях [33]. Чітко встановлено, що АТФ утворюється у мітохондріях шляхом окисного фосфорилування [2]. Зв'язок між ядром, мітохондріями та цитозолем необхідний для підтримки належної функції мітохондрій і клітинного гомеостазу [34]. Мітохондріальна дисфункція має серйозні фізіологічні наслідки, які, як доведено, призводять до патогенезу багатьох нейродегенеративних розладів, раку, запалення, метаболічного синдрому, серцевих дисфункцій та вірусних захворювань [35,36]. Під час контакту з відповідним інфекційним агентом відбувається активація рецепторів розпізнавання образів (PRR), що надсилають сигнали до мітохондрій, які потім перемикають метаболічний перехід від окисного фосфорилування до гліколізу, щоб підготувати клітини для ефективної

боротьби з патогенами [39], роблячи мітохондрії основною мішенню під час мікробного ураження. У ряді досліджень показано, що клітини вродженого імунітету під впливом різних стимулів виникають унікальні метаболічні ознаки, необхідні для подальшої імунної функції [35,40].

Ферменти, які беруть участь у метаболізмі, широко досліджуються через їх схожість з імунними регуляторами. Було показано, що метилкротоніл-КоА-карбоксилаза 1 пов'язана з TRAF6 і посилює передачу сигналів MAVS, щоб індукувати секрецію антивірусного інтерферону (IFN) типу I [51]. Було також показано, що IFN типу I індукують ФАО та окисне фосфорилування [22,23]. Метаболічні проміжні продукти циклу ТСА, такі як сукцинат, фумарат і цитрат, пов'язані з різними процесами, які включені у запальні шляхи як у вроджених, так і в адаптованих імунних клітинах. Перевага метаболічних шляхів для імунних клітин залежить від кількох факторів, включаючи тип клітини, стан диференціації, умови активації та клітинне мікрооточення [25]. Макрофаги, стимульовані LPS та IFN, віддають перевагу гліколізу, але при стимуляції IL-4 макрофаги віддають перевагу OXPHOS та FAO для задоволення енергетичних потреб клітини [54]. Дендритні клітини віддають перевагу гліколізу після того, як вони інфіковані та активовані через PRR [24]. Цікаво відзначити, що спочиваючі Т-лімфоцити і Т-лімфоцити пам'яті «покладаються» на OXPHOS, а проліферуючі Т-лімфоцити віддають перевагу гліколізу через посилення регуляції транспортера глюкози glut-1 [25]. Нейтрофіли беруть участь у гліколізі, включаючи вивільнення позаклітинних пасток нейтрофілів (NET) з підвищеною експресією glut-1 і гліколітичною функцією [26]. Активовані В-лімфоцити піддаються метаболічному перепрограмуванню відповідно до біоенергетичних і біосинтетичних потреб. Плазматичні клітини унікальні тим, що вони поглинають більше глюкози та глутаміну для посилення як гліколізу, так і мітохондріального OXPHOS, необхідного для сприяння виживанню клітин [27,28].

Вроджена імунна відповідь відіграє вирішальну роль як у виявленні, так і в регулюванні інфекційних уражень. Розпізнавання інсульту за допомогою PRR запускає специфічні вроджені імунні клітини та їх відповідний рецептор і ліганд, що також призводить до швидкої реакції на додаткові імунні клітини захворювання. Ця рання вроджена імунна сигналізація є центральною для розпізнавання інфікуючих вірусів, стимулювання рекрутування додаткових імунних клітин до ділянки, активації специфічної адаптивної імунної відповіді та індукції виробництва молекул, необхідних для боротьби з інфекцією для усунення патогену, а також відновлення пошкоджених тканин [29,30].

Структура та функція мітохондрій можуть впливати на вроджену імунну відповідь. Найбільш безпосередній вплив мітохондрій на імунну відповідь відбувається через пошкодження мітохондрій, хоча це також може виникнути в результаті нормальної фізіології та функціонування мітохондрій. Вроджена імунна система спеціально розпізнає молекулярні патерни, пов'язані з патогенами (PAMP) і молекулярні патерни, пов'язані з пошкодженням (DAMP), як сигналізатори, щоб викликати відповідну імунну відповідь [39]. Вивільнення алярмінів мітохондріями відбувається через клітинний стрес і втрату гомеостазу. DAMP, що вивільняються мітохондріями, включають неметильовану мтДНК CpG [21], ROS [12], кардіоліпін [32] і n-формілпептиди (n-fp) [33]. Точний механізм вивільнення цих мітохондріальних алармінів досі невідомий. Однак численні дослідження показали, що в основному це відбувається через втрату цілісності мітохондріальної мембрани. Важливо, що ці молекули розпізнаються окремими рецепторами та запускають специфічні запальні шляхи, які відновлюють нормальну функцію клітин.

Вірусні геноми зазвичай реплікуються в цитоплазмі клітини-господаря, де вони не розпізнаються TLR, такими як TLR3, TLR7 або TLR8, через локалізацію TLR в ендосомах [34]. Проте на РНК-віруси клітина може

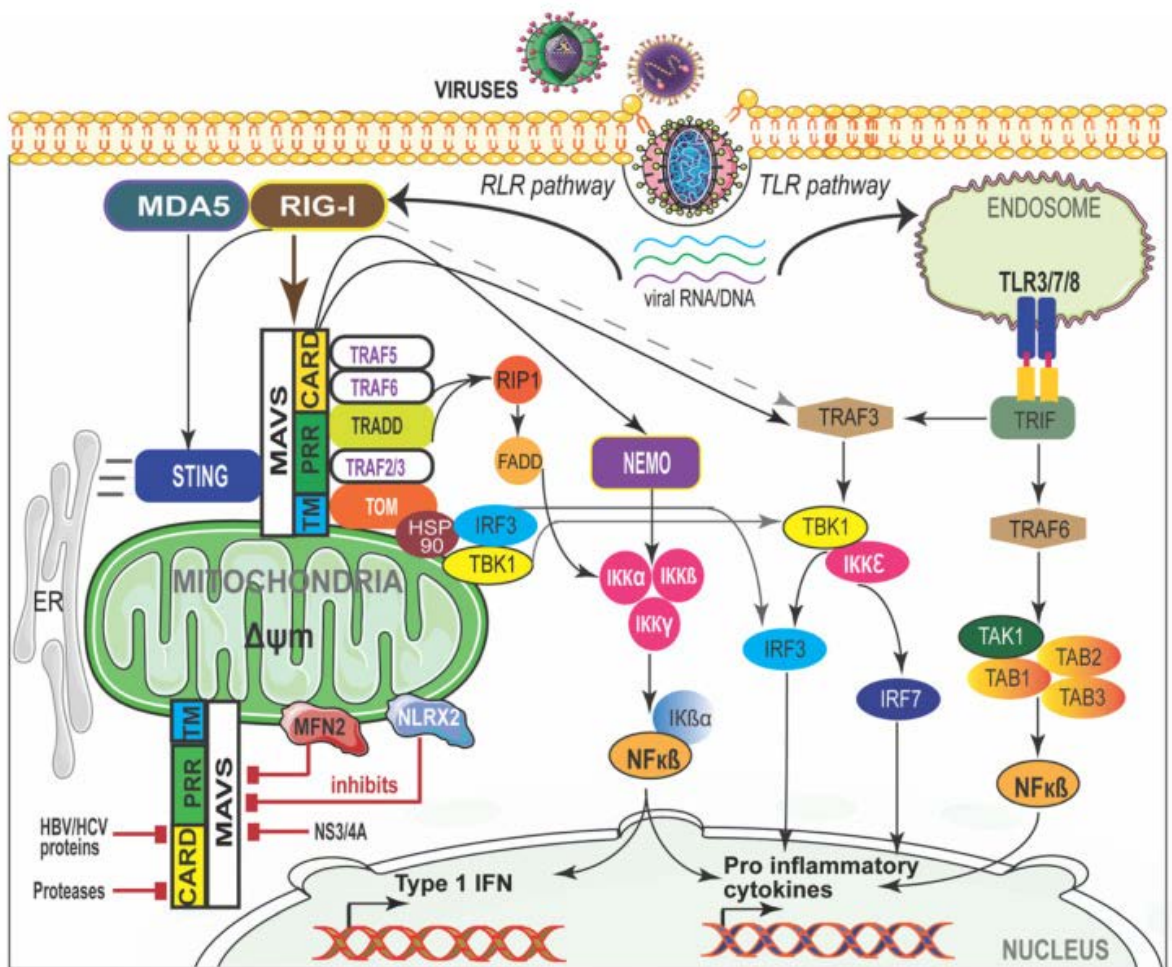
реагувати навіть за їх присутності в цитозолі за допомогою RIG-I-подібних рецепторів (RLR), таких як ген-1, індукований ретиноевою кислотою (RIG-I), ген-5, пов'язаний з диференціацією меланоми (MDA5) і (LGP2). Тоді як RIG-I та MDA-5 є прототипом PRR, LGP2 є регулятором сигналізації RIG-I та MDA5 [35]. Як ssRNA, так і dsRNA є відомими лігандами RIG-I та MDA5 [36]. RIG-I також може сприймати полімери РНК, утворені РНК-полімеразою III (pol III) з шаблонів ДНК, опосередковано виявляючи дцДНК внутрішньоклітинних патогенів [37]. RIG-I та MDA5 є цитозольними геліказами з АТФ-азною активністю та складаються з регуляторного С-кінцевого домену, який зв'язується з вірусною РНК, але N-кінцевий домен складається з двох тандемних доменів CARD (домени активації та рекрутування каспаз) [38]. АТФ-азна активність цих геліказ є критичною для транслокації вздовж дцРНК і для виявлення CARD, які маскуються С-кінцевим доменом [29]. Як тільки розпізнаються специфічні структури 5'-трифосфатної РНК, убіквітин-лігази E3 TRIM25 і RIPLET підсилюють поліубіквітування RIG-I, пов'язане з лізином 63, звільняючи CARD від репресії регуляторного домену [20]. Ця конформаційна зміна призводить до істотної взаємодії між двома доменами CARD RIG-I або MDA5 з доменом CARD мітохондріального антивірусного сигнального білка (MAVS; також відомий як CARDIF, IPS-1 або VISA) [21,22]. MAVS, локалізований у зовнішній мембрані мітохондрій, діє як центральна сигнальна молекула в сигнальному шляху RLR, зв'язуючи розпізнавання вірусної РНК вище за течією з активацією сигналу нижче.

MAVS необхідний для локалізації в мітохондріях, щоб виконувати свою функцію, що вказує на те, що мітохондріальне середовище є важливим для передачі сигналу [31]. У мишей з дефіцитом MAVS не вдалося індукувати продукцію IFN типу I, і специфічна імунна відповідь проти poly(I:C) свідчить про істотну роль MAVS у противірусному вродженому імунитеті [33,34]. Імунне розпізнавання, опосередковане RIG-I і MDA5, і взаємодія

MAVS показані на малюнку 2. Взаємодія між RIG-I або MDA5 і MAVS залучає складний інтерактом для трансдукції імунної сигналізації. MAVS-взаємодіючі білки, що беруть участь у противірусній відповіді, це TRAF3, TRAF5, IKK α /IKK β (IKK α), NEMO, DDX3, WDR5 IRF3, IRF7 і STING. Білки, які беруть участь у запальних реакціях, це NLRC5, NLRX1, TRAF2, TRAF5, TRAF6, TAK1 і IKK α / β [35,36]. MAVS також взаємодіє з мітохондріальними білками, такими як Mfn1, Mfn2, Tom70 і VDAC1; білки, що беруть участь у загибелі клітин (TRADD, FADD, RIP1) або аутофагії (Atg5-Atg12); і з кіназами (IKK α , PLK1, c-Abl, c-Src) або убіквітин-лігазами E3 (PCBP2/AIP4, RNF5 і RNF125), які сприяють посттрансляційним модифікаціям MAVS [36,37]. Багато з цих білків є незамінними та відіграють важливу роль у канонічному шляху RLR, який є центральним для противірусних вроджених імунних відповідей. Після активації MAVS формує сигнальну платформу та рекрутує TNF рецептор-асоційований фактор (TRAF) 3 і TRAF6, індукуючи ІФН типу I [38] і запальні реакції [29] відповідно. Клітини TRAF3 $^{-/-}$ показали порушення відповіді IFN типу I проти вірусних інфекцій [40]. TRAF3 разом із білком-модулятором NF- κ B NEMO [16], активатором NF- κ B, асоційованим із членом сімейства TRAF (TANK) [31] та білком 1, асоційованим з NAK (NAP1) [22], регулює активність двох неканонічних IKK-споріднених кіназ, TANK-зв'язуюча кіназа 1 (TBK1) та індукцйбельна І κ B кіназа (IKK α). Фосфорилування регуляторних факторів інтерферону (IRF), IRF3 та IRF7, за допомогою TBK1 та IKK α призводить до індукції генів IFN типу I та набору IFN-індукованих генів, які зв'язуються з IFN-стимульованими елементами відповіді (ISRE) у ядрі [23].

MAVS активує IRF3 через убіквітинзв'язувальні домени NEMO, тоді як сам NEMO активує TBK1 [34] через TRAF3 [35]. FAS-асоційований білок, що містить домен смерті (FADD), також був виявлений у комплексі з MAVS, який активує NF- κ B нижче за MAVS через FADD/каспаза-8-

залежний шлях [36]. TRADD, білок-адаптер рецептора фактора некрозу пухлини (TNFR1), залучається до MAVS і індукує активацію IRF3 і NF-κB, ініціюючи утворення комплексу з TRAF3, TANK, FADD і RIP1 [27]. RIG-I-опосередкована активація NF-κB вимагає MAVS і комплексу адаптерних білків CARD9 і Vcl-10 [28]. RIG-I також зв'язується з адаптерним білком ASC і стимулює каспазу-1-залежну активацію інфламасоми за допомогою механізму, незалежного від MAVS, що свідчить про те, що RIG-I активує інфламасому у відповідь на певні РНК-віруси [28,29,30].



Малюнок 2

Взаємодія RIG-I/MDA-5 і MAVS при вірусних захворюваннях. Цитозольна вірусна РНК/ДНК розпізнається шляхами RLR та/або TLR. RIG-I-подібні рецептори (RLR) і MDA-5 активують MAVS через CARD і рекрутують сигнальні молекули, щоб індукувати канонічний ядерний фактор-κB (NF-κB). NF-κB транслокується в ядро та ініціює експресію генів прозапальних

цитокинів. MAVS активує стимулятор генів інтерферону (STING) і додатково опосередковує активацію TANK-зв'язуючої кінази 1 (TBK1), яка фосфорилує сигнальні фактори IRF-3 та IRF-7 регуляторного фактора інтерферону (IRF). Потім IRF-3 транслокується в ядро та індукує гени інтерферону I типу (IFN). NS3-4A, мітофузин 2 (MFN2) і представник сімейства NLR X1 (NLRX1) інгібують MAVS, запобігаючи утворенню сигнального комплексу MAVS–IKK α . Білок X вірусу гепатиту В (HBV) сприяє поліубіквітиновому кон'югату MAVS. ER—ендоплазматичний ретикулум; MAM — мітохондріально-асоційована мембрана.

Віруси перешкоджають мітохондріальному біогенезу, спричиняючи зміни у мітохондріальній функції з метою сприяння трансляції та збиранню вірусів. Одна з теорій полягає в тому, що взаємодії між вірусом і мітохондріями перешкоджають асоційованим з мітохондріями антивірусним сигнальним механізмам [33,51]. Регуляція мітохондріальної динаміки з метою спричинення фізіологічних збурень у клітинному середовищі через вірусні інфекції робить мітохондріальну динаміку основною мішенню. Вроджені імунні відповіді проти вірусних інфекцій призводять до активації інтерферону I типу (IFN- α/β) та інших прозапальних цитокинів і хемокінів. Специфічні молекули, які беруть участь у мітохондріальному біогенезі – це пероксисомний проліфератор-активованій рецептор- γ коактиватор (PGC)-1 α , головний регулятор мітохондріального біогенезу [92,93]; PTEN-індукована передбачувана кіназа 1 (PINK1) [94], яка активує синтез білка в пошкоджених мітохондріях; і ліганд-активованій фактор транскрипції арил-вуглеводневий рецептор, який функціонує для захисту клітини від окислювального стресу [95]. Безмовний інформаційний регулятор-1 (SIRT1) активує PGC1 α -опосередковану транскрипцію ядерних і мітохондріальних генів, що кодують білки під час проліферації мітохондрій, окисного

фосфорилювання та виробництва енергії [96]. SIRT3, з іншого боку, стимулює білки, важливі для окисного фосфорилювання, циклу трикарбонових кислот і окислення жирних кислот, і опосередковано, PGC-1 α і AMPK. SIRT1 деацетилює гістон і численні негістонові білки під час транскрипції, включаючи PGC-1 α [96]. Віруси розробили окремі стратегії для регулювання сигналізації MAVS шляхом регулювання біогенезу мітохондрій і, таким чином, регулювання ранніх вроджених імунних відповідей.

Розділ 2. Експериментальна частина

Матеріали дослідження

Матеріалом дослідження були перещеплювана культура клітин МА 104 та вірус везикулярного стоматиту (ВВС)

Хід роботи

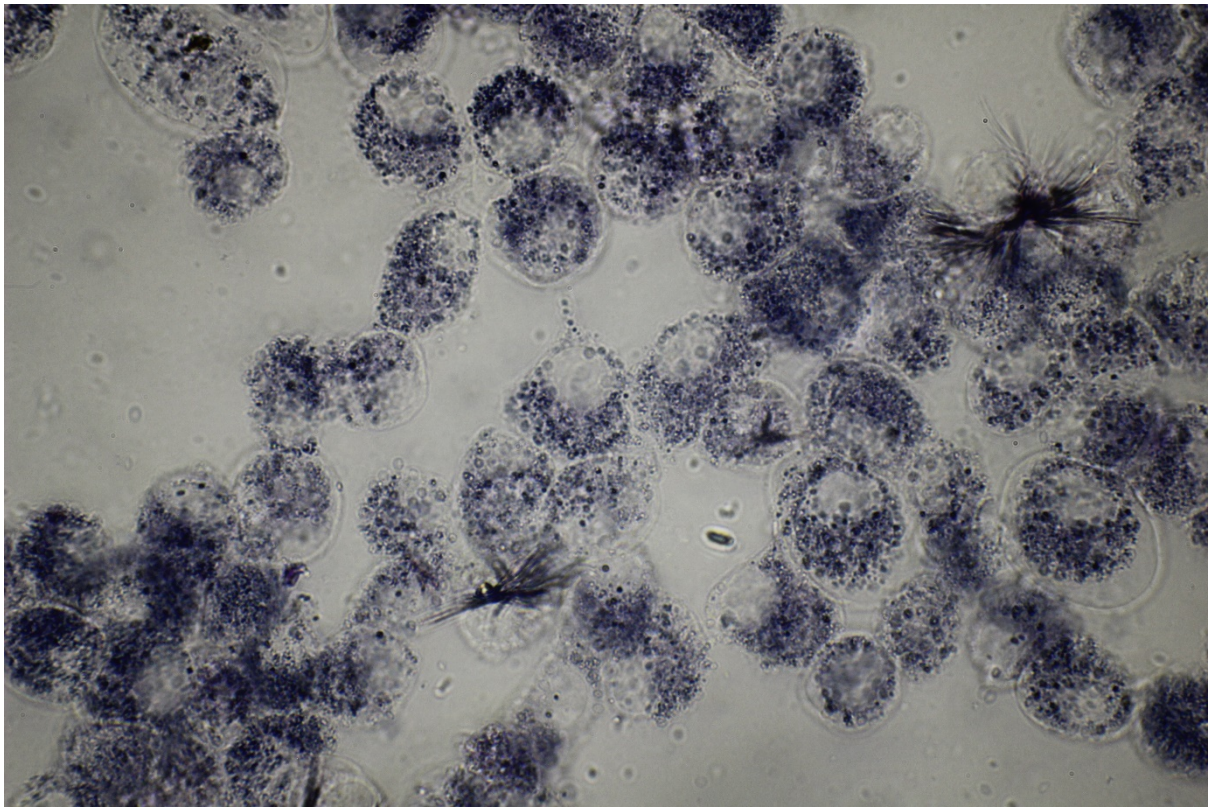
Посів клітин проводили нанесенням у пляшку 12x8 по 100 мл суспензії клітин МА 104 в кожну лунку рівномірно за схемою, як показано у таблиці 1. Таке розміщення зменшує похибку дослідження, оскільки крайні лунки планшету знаходяться в умовах, дещо відмінних від центральних лунок, тому їх результати можуть давати більшу похибку.

24	5,5	4,5	3,5	КК	КК	24	5,5	4,5	3,5
год	год	год	год			год	год	год	год

Таблиця 1.

Схема розміщення досліджуваних груп у планшеті.

Для отримання моношару клітин їх інкубували при температурі 37.4°C у середовищі CO₂ в термостаті 24 години, попередньо прибравши залишковий O₂. Вірус вносили до клітин у кількості 10 ТЦД₅₀ поетапно: за 24 год, 5,5 год, 4,5 год, 3,5 год до постановки МТТ-тесту відповідно по 16 лунок для кожної групи та ставили в термостат з температурою 37.4°C, попередньо видаливши кисень. МТТ додавали по 20 мкл у всі лунки одразу та проводили аналіз отриманих результатів за допомогою оптичного мікроскопу та фотоелектроколориметра LabSystem Multiscan. Обробка зразків одразу після внесення МТТ дозволила отримати результати до руйнування самих клітин та забезпечила достовірність отриманих результатів. Подальшу обробку отриманого масиву значень проведено за допомогою OriginLab Pro та Microsoft Excel.



Φοτο 1.

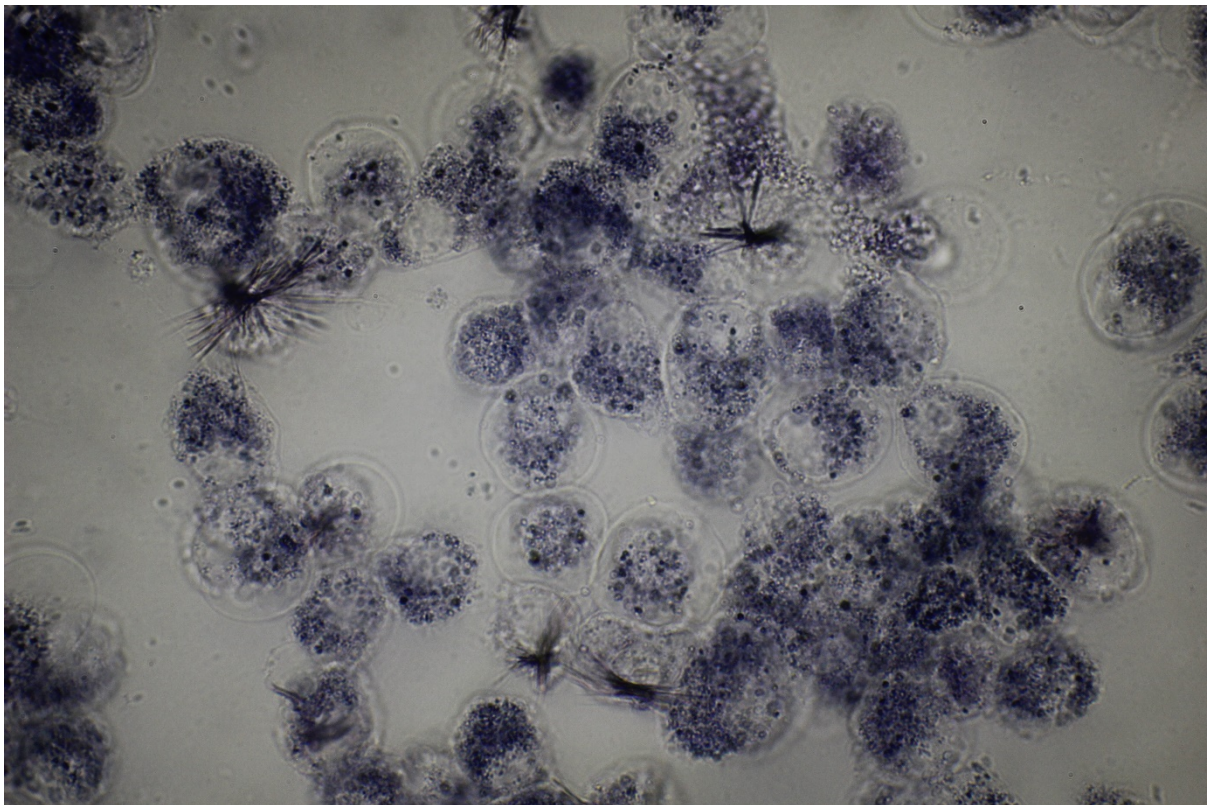


Фото 2.

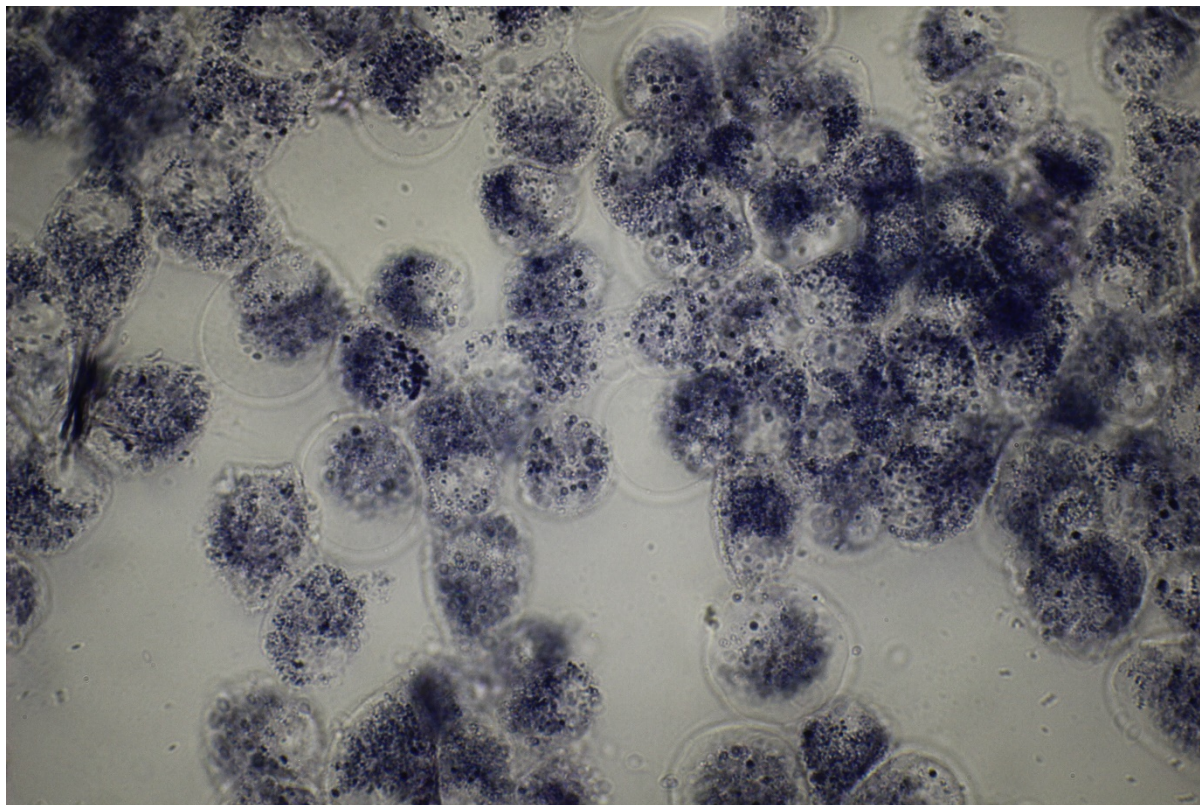


Фото 3.

Фото 1-3. Клітини MA104, інфіковані ВВС за 3,5 год до МТТ-тесту.

Фіолетові гранули у цитоплазмі клітин – скупчення диформагану, на поверхні клітин – кристали диформагану, що утворились в результаті взаємодії МТТ з позаклітинними дегідрогеназами. Клітини стресовані: округлені, з частково відшарованою від поверхні цитоплазмою, спостерігається дрібна вакуолізація.

Опис та обґрунтування використаних методів досліджень

МТТ аналіз

Аналіз МТТ — це колориметричний тест для оцінки метаболічної активності клітин. NAD(P)H-залежні ферменти клітинної оксидоредуктази можуть, за певних умов, відобразити кількість наявних життєздатних клітин. Ці ферменти здатні відновлювати тетразолієвий барвник МТТ, який

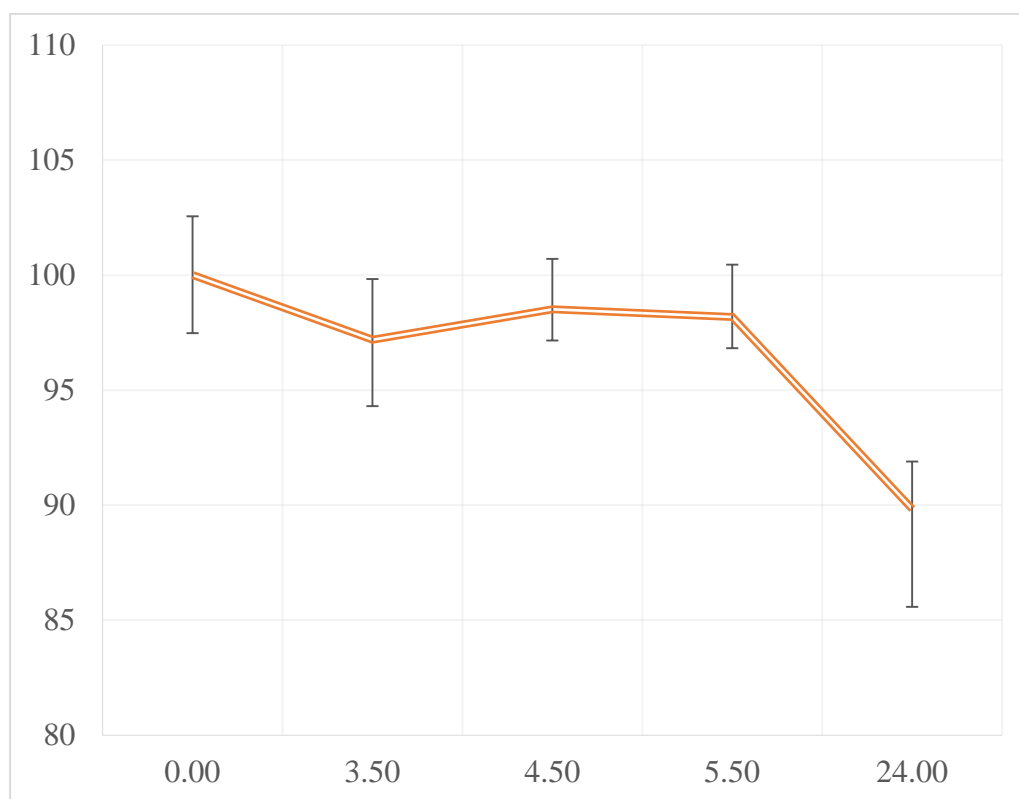
хімічно є 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію бромідом, до його нерозчинного диформаану, який має фіолетовий колір. Таким способом у місцях, забарвлених фіолетовим кольором, можна визначити високу активність оксиредуктаз, котрі в свою чергу наявні в мітохондріях у високих концентраціях. Аналіз оптичної густини лунок у планшеті з моношаром клітин MA 104, в різні часові інтервали інфікованих ВВС, дозволяє визначити динаміку метаболічної активності клітин з моменту початку вірус-клітинної взаємодії, до періоду реплікації вірусу та постреплікаційної фази.

Культура клітин MA 104

MA-104 було виділено в АТСС шляхом клонування популяції чистих клітин африканської зеленої мавпи та було розроблено шляхом початкової культури експлантату та подальшого пасування шляхом ферментативної дисоціації в Microbiological Associates із тканини нирок ембріона мавпи-резус. Нирці потрібна велика кількість мітохондрій для видалення відходів із крові та регулювання балансу рідини та електролітів. Мітохондрії забезпечують енергію для виконання цих важливих функцій і можуть адаптуватися до різних метаболічних умов через низку сигнальних шляхів (наприклад, шляхи механічної мішені рапаміцину (mTOR) і АМР-активованої протеїнкінази (АМРК), які активують транскрипційні коактиватор пероксисоми активований проліфератором рецептор-γ коактиватор 1α (PGC1α), а також шляхом балансування мітохондріальної динаміки та енергетики для підтримки мітохондріального гомеостазу. Тому використання культури MA 104 підходить для даного дослідження, та допомагає показати мітохондріальну динаміку при ураженні вірусом.

Розділ 3. Результати

Дослідження мітохондріальної активності вірус-інфікованих клітин проводили в динаміці, визначаючи її на 3,5 год, 4,5 год, 5,5 год та 24 год після інфікування. Отримані значення метаболічної активності клітин, розрахованої відносно контрольних інтактних, прийнятих за 100% активності, представлено на графіку 1.



Графік 1.

Залежність Ох-Red реакцій в мітохондріях від часу.

Примітки: по осі абсцис – час (год) з моменту внесення суспензії ВВС до клітин МА104, по осі ординат – відсоток метаболічно активних клітин (за результатами МТТ-тесту), розрахованих відносно контрольних інтактних, метаболічна активність мітохондрій яких прийнята за 100%; дані наведено як медіана та 1 і 3 інтерквартильний діапазон.

На основі отриманих результатів можна стверджувати, що вже через 3 год з моменту внесення ВВС спостерігається зниження метаболічної активності мітохондрій інфікованих клітин МА104. Але вказані зміни не є статистично значущими протягом перших 6 год процесу вірус-клітинної взаємодії. Тільки на 24 год з моменту інфікування нами виявлено статистично значуще зниження метаболічної активності мітохондрій. Слід зазначити, що модельна система ВВС-МА104 є високочутливою, а результатом вірус-клітинної взаємодії є повна деструкція моношару клітин. Вказаний процес розвивається досить швидко та за умови множинності інфікування 100 ТЦД₅₀ вже через 24 год у інфікованих лунках спостерігається практично повна деструкція моношару. Саме тому в рамках експериментального дослідження нами була використана на порядок менша множинність інфікування клітин (10 ТЦД₅₀), оскільки його завданням було ще на 24 год спостереження зберегти більшу частину клітин для проведення аналізу їх метаболічної активності. Загалом, слід сказати, що застосування МТТ-аналізу показало зниження метаболічної активності мітохондрій у інфікованих ВВС клітинах МА104, що свідчить про їх реагування на розвиток процесу вірус-клітинної взаємодії.

Отримані результати підтверджені цитологічними спостереженнями, які свідчать про ряд морфологічних змін клітин МА104 після їх інфікування ВВС. Слід зазначити, що – окрім округлення клітин, зміни їх розмірів та розмірів ядра – застосування МТТ-тесту дозволило оцінити зони та інтенсивність накопичення диформагану в клітинах та поза ними (фото ХХ). На фото інтактні контрольні клітини інтенсивно накопичують диформаган у цитоплазмі та реагують на внесення МТТ виділенням позаклітинних дегідрогеназ, що супроводжується утворенням кристалів диформагану на її поверхні (поза клітиною). Запуск вірусного інфекційного процесу викликає гальмування накопичення диформагану в клітинах та пригнічення продукції позаклітинних дегідрогеназ (позаклітинні кристали

диформагану спостерігаються у мінімальній кількості, або взагалі відсутні). На пізніх стадіях, окрім округлення клітин, спостерігається зменшення їх розмірів, відшарування мембрани від цитоплазми.

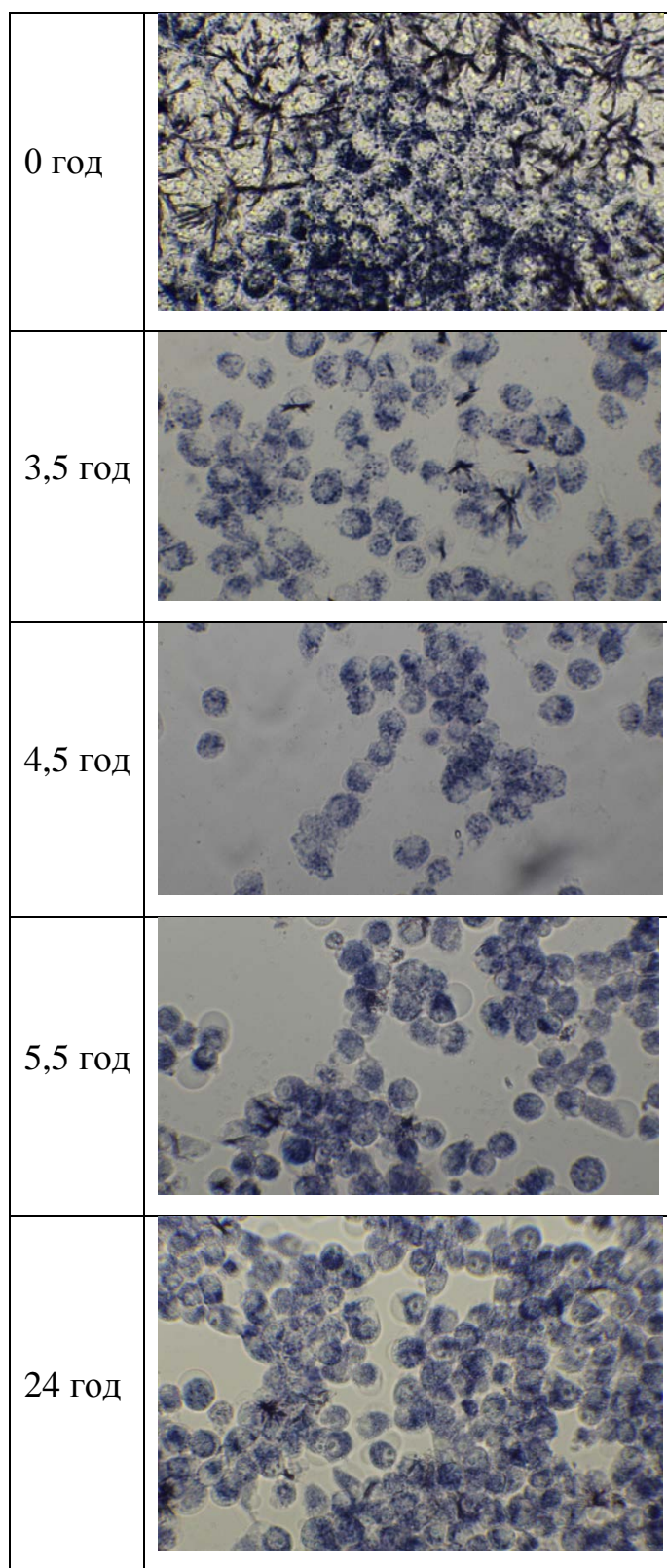
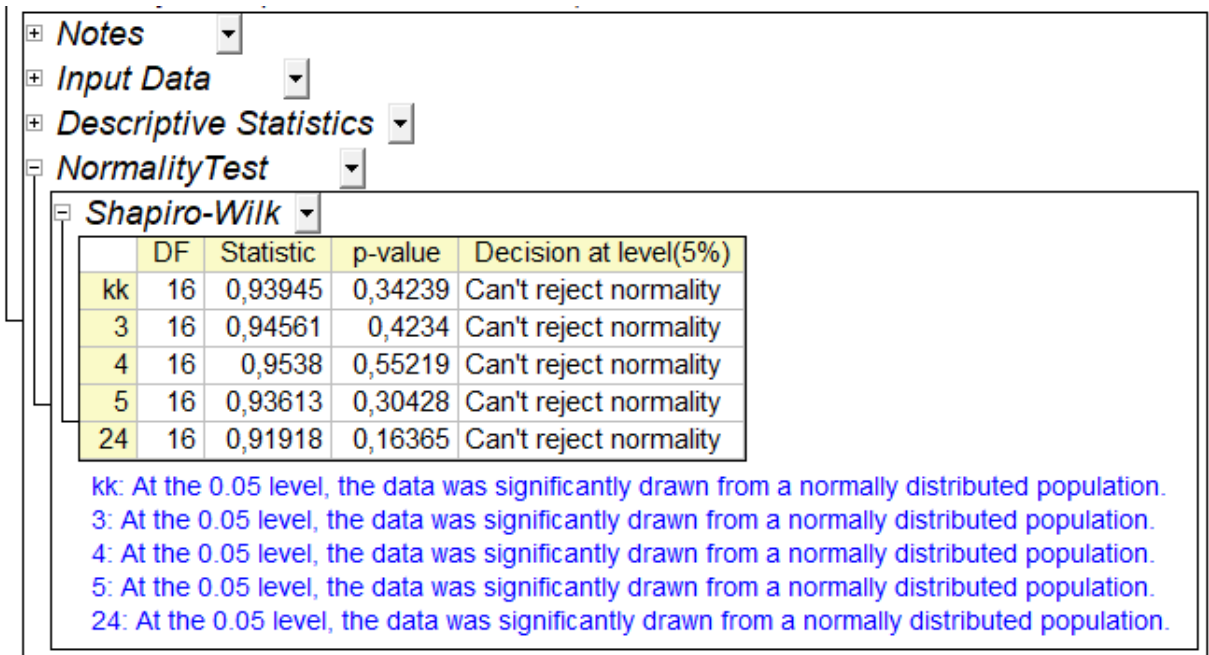


Фото ХХХ. Клітини МА104 на різних стадіях інфікування ВВС (МТТ-тест).

Аналіз можливих похибок

Для всіх дослідних груп було проведено дисперсійний аналіз. Тест Шапіро-Вілکا на нормальність показав нормальний розподіл величин у всіх експериментальних групах ($p > 0,05$).



Notes

Input Data

Descriptive Statistics

NormalityTest

Shapiro-Wilk

	DF	Statistic	p-value	Decision at level(5%)
kk	16	0,93945	0,34239	Can't reject normality
3	16	0,94561	0,4234	Can't reject normality
4	16	0,9538	0,55219	Can't reject normality
5	16	0,93613	0,30428	Can't reject normality
24	16	0,91918	0,16365	Can't reject normality

kk: At the 0.05 level, the data was significantly drawn from a normally distributed population.
3: At the 0.05 level, the data was significantly drawn from a normally distributed population.
4: At the 0.05 level, the data was significantly drawn from a normally distributed population.
5: At the 0.05 level, the data was significantly drawn from a normally distributed population.
24: At the 0.05 level, the data was significantly drawn from a normally distributed population.

Малюнок 2.

Тест Шапіро-Вілکا на нормальність.

Дослідження рівності розбіжності між групами за допомогою тесту на однорідність (тест Левена) проведено із застосуванням однофакторного дисперсійного аналізу, який показав рівну розбіжність між групами ($p > 0,05$). Результати наведено на мал.3.

Notes

Input Data

Descriptive Statistics

	N Analysis	N Missing	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
kk	16	0	0,60519	0,01885	0,00471
3	16	0	0,58688	0,02685	0,00671
4	16	0	0,59956	0,01822	0,00456
5	16	0	0,59294	0,01851	0,00463
24	16	0	0,53363	0,03311	0,00828

One Way ANOVA

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	4	0,05306	0,01326	23,29532	1,53511E-12
Error	75	0,04271	5,69424E-4		
Total	79	0,09577			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal.
 Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different.
 At the 0.05 level, the population means are significantly different.

Fit Statistics

	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
	0,55405	0,04089	0,02386	0,58364

Means Comparisons

Homogeneity of Variance Test

Levene's Test(Absolute Deviations)

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	4	0,00139	3,46796E-4	1,87023	0,12448
Error	75	0,01391	1,8543E-4		

At the 0.05 level, the population variances are not significantly different.

Малюнок 3.

Тест на однорідність (Тест Левена)

Параметричний дисперсійний аналіз повторних вимірювань показав виражену дію фактору наявності вірусу та статистично значущу різницю в результатах досліджуваних груп ($p < 0,05$). Результати наведено на мал. 4.

Notes							
Input Data							
Multivariate Tests							
		Value	F	Num df	DF	Prob>F	
Factor	Pillai's Trace	0,8225	13,90183	4	12	1,85587E-4	
	Wilks' Lambda	0,1775	13,90183	4	12	1,85587E-4	
	Hotelling's Trace	4,63394	13,90183	4	12	1,85587E-4	
	Roy's Largest Root	4,63394	13,90183	4	12	1,85587E-4	
Mauchly's Test of Sphericity							
	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	DF	Prob>ChiSq	Greenhouse-Geisser Epsilon	Huynh-Feldt Epsilon	Lower-bound Epsilon
Factor	0,12105	28,32962	9	8,40087E-4	0,59197	0,71022	0,25
Tests of Within-Subjects Effects							
		Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Prob>F	
Factor	Sphericity Assumed	0,05306	4	0,01326	25,97847	1,6125E-12	
	Greenhouse-Geisser	0,05306	2,3679	0,02241	25,97847	3,03505E-8	
	Huynh-Feldt	0,05306	2,84088	0,01868	25,97847	1,73297E-9	
	Lower-bound	0,05306	1	0,05306	25,97847	1,31332E-4	
Error(Factor)	Sphericity Assumed	0,03064	60	5,10612E-4			
	Greenhouse-Geisser	0,03064	35,51844	8,62558E-4			
	Huynh-Feldt	0,03064	42,61325	7,18948E-4			
	Lower-bound	0,03064	15	0,00204			
Tests of Between-Subjects Effects							
		Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Prob>F	
Intercept	27,25062	1	27,25062	33865,47759	1,4217E-26		
Error	0,01207	15	8,04673E-4				
Descriptive Statistics							
	Mean	Std. Error	95.00% LCL	95.00% UCL			
kk	0,60519	0,00471	0,59514	0,61523			
3	0,58688	0,00671	0,57257	0,60118			
4	0,59956	0,00456	0,58985	0,60927			
5	0,59294	0,00463	0,58307	0,6028			
24	0,53363	0,00828	0,51598	0,55127			
Pairwise Comparison							
Bonferroni Test							
Sig equals 1 indicates that the difference of the means is significant at the 0,05 level. Sig equals 0 indicates that the difference of the means is not significant at the 0,05 level. Sig equals -1 indicates that the difference of the means is not tested.							

Малюнок 4.

Параметричний дисперсійний аналіз повторних вимірювань

Квантілі результатів кожної з досліджених груп показали, що відхилення складає в середньому ~2,5%, а відхилення кожної групи окремо не перевищує ~4,3% (Табл.2).

Таблиця 2.

Квантілі досліджуваних груп у відсотках

Середня похибка	0.00	3.50	4.50	5.50	24.00
Середнє зн. у%	100	97.19	98.51	98.18	89.83
2.48	2.52	2.89	1.36	1.36	4.26
2.35	2.56	2.64	2.19	2.27	2.07

Висновок

Незважаючи на сучасні досягнення в дослідженні метаболічних шляхів, впливаючи на які можна посилити імунну відповідь, все ще залишається багато цікавих питань. Різноманітні аспекти мітохондріальної динаміки, такі як мітофагія та мітохондріальна дисфункція, за останніми даними допомагають вірусу ефективно обходити імунну відповідь клітини-господаря. Подальші дослідження в цьому напрямку дозволять виявити різноманітні механізми, за якими віруси викликають метаболічне перепрограмування, що призводить до дискретних біоенергетичних фенотипів, стратегічно використовуючи їх для поширення та реплікації вірусу.

Наше дослідження доводить важливість мітохондрій у розвитку вірус-клітинної взаємодії. Вже через 3,5 год з моменту інфікування клітин МА104 10 ТЦД₅₀ вірусу везикулярного стоматиту спостерігається зниження їх метаболічної активності, яке знаходиться на такому рівні до 6 год з моменту інфікування. Через 24 години після інфікування зниження загальної мітохондріальної активності клітин було статистично значущим. Зниження, у порівнянні з контрольною групою, становило 10%.

Кінцева мета – виявлення механізмів, які можуть відрізнятися для окремих вірусів, може надати важливу інформацію для цілеспрямованих терапевтичних втручань, щоб перенаправити імунну відповідь у бік менш патогенної відповіді.

Список використаних джерел

1. Eisner V., Picard M., Hajnóczky G. Mitochondrial dynamics in adaptive and maladaptive cellular stress responses. *Nat. Cell Biol.* 2018.
2. Ernster L., Schatz G. Mitochondria: A historical review. *J. Cell Biol.* 1981.
3. Xia M., Zhang Y., Jin K., Lu Z., Zeng Z., Xiong W. Communication between mitochondria and other organelles: A brand-new perspective on mitochondria in cancer. *Cell Biosci.* 2019.
4. Tschopp J. Mitochondria: Sovereign of inflammation? *Eur. J. Immunol.* 2011.
5. Osellame L.D., Blacker T.S., Duchon M.R. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012.
6. Murphy M.P., Hartley R.C. Mitochondria as a therapeutic target for common pathologies. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2018.
7. Weissig V. Drug Development for the Therapy of Mitochondrial Diseases. *Trends Mol. Med.* 2020.
8. Kauppila T.E.S., Kauppila J.H.K., Larsson N.G. Mammalian Mitochondria and Aging: An Update. *Cell Metab.* 2017.
9. Vernochet C., Kahn C.R. Mitochondria, obesity and aging. *Aging.* 2012.
10. Pan S., Conaway S., Jr., Deshpande D.A. Mitochondrial regulation of airway smooth muscle functions in health and pulmonary diseases. *Arch. Biochem. Biophys.* 2019.
11. Thaker S.K., Ch'ng J., Christofk H.R. Viral hijacking of cellular metabolism. *BMC Biol.* 2019.

12. Asha K., Sharma-Walia N. Virus and tumor microenvironment induced ER stress and unfolded protein response: From complexity to therapeutics. *Oncotarget*. 2018.
13. Ackermann W.W., Johnson R.B. Some energy relations in a host-virus system. *J. Exp. Med.* 1953.
14. Ackermann W.W., Klernschmidt E. Concerning the relation of the Krebs cycle to virus propagation. *J. Biol. Chem.* 1951.
15. Kim S.J., Khan M., Quan J., Till A., Subramani S., Siddiqui A. Hepatitis B virus disrupts mitochondrial dynamics: Induces fission and mitophagy to attenuate apoptosis. *PLoS Pathog.* 2013.
16. Hossain M.G., Akter S., Ohsaki E., Ueda K. Impact of the Interaction of Hepatitis B Virus with Mitochondria and Associated Proteins. *Viruses*. 2020.
17. Kim S.J., Syed G.H., Khan M., Chiu W.W., Sohail M.A., Gish R.G., Siddiqui A. Hepatitis C virus triggers mitochondrial fission and attenuates apoptosis to promote viral persistence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014.
18. Javed F., Manzoor S. HCV non-structural NS4A protein of genotype 3a induces mitochondria mediated death by activating Bax and the caspase cascade. *Microb. Pathog.* 2018.
19. Owczarczyk A.B., Schaller M.A., Reed M., Rasky A.J., Lombard D.B., Lukacs N.W. Sirtuin 1 Regulates Dendritic Cell Activation and Autophagy during Respiratory Syncytial Virus-Induced Immune Responses. *J. Immunol.* 2015.
20. Elesela S., Morris S.B., Narayanan S., Kumar S., Lombard D.B., Lukacs N.W. Sirtuin 1 regulates mitochondrial function and immune homeostasis in respiratory syncytial virus infected dendritic cells. *PLoS Pathog.* 2020.

21. Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., de Bruijn M.H., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981.
22. Kolesnikov A.A. The Mitochondrial Genome. The Nucleoid. *Biochemistry*. 2016.
23. Saneto R.P. Genetics of Mitochondrial Disease. *Adv. Genet.* 2017.
24. Cheong A., Archambault D., Degani R., Iverson E., Tremblay K.D., Mager J. Nuclear-encoded mitochondrial ribosomal proteins are required to initiate gastrulation. *Development*. 2020.
25. Yoo S.M., Jung Y.K. A Molecular Approach to Mitophagy and Mitochondrial Dynamics. *Mol. Cells*. 2018.
26. Meyer J.N., Leuthner T.C., Luz A.L. Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity. *Toxicology*. 2017.
27. Feng S.T., Wang Z.Z., Yuan Y.H., Wang X.L., Sun H.M., Chen N.H., Zhang Y. Dynamin-related protein 1: A protein critical for mitochondrial fission, mitophagy, and neuronal death in Parkinson's disease. *Pharmacol. Res.* 2020.
28. Dombi E., Mortiboys H., Poulton J. Modulating Mitophagy in Mitochondrial Disease. *Curr. Med. Chem.* 2018.
29. Otten A.B.C., Sallevelt S., Carling P.J., Dreesen J., Drüsedau M., Spierts S., Paulussen A.D.C., de Die-Smulders C.E.M., Herbert M., Chinnery P.F., et al. Mutation-specific effects in germline transmission of pathogenic mtDNA variants. *Hum. Reprod.* 2018.
30. Mattenberger Y., James D.I., Martinou J.C. Fusion of mitochondria in mammalian cells is dependent on the mitochondrial inner membrane potential and independent of microtubules or actin. *FEBS Lett.* 2003.

31. Zorova L.D., Popkov V.A., Plotnikov E.Y., Silachev D.N., Pevzner I.B., Jankauskas S.S., Babenko V.A., Zorov S.D., Balakireva A.V., Juhaszova M., et al. Mitochondrial membrane potential. *Anal. Biochem.* 2018.
32. Lee H., Yoon Y. Mitochondrial fission and fusion. *Biochem. Soc. Trans.* 2016.
33. Refolo G., Vescovo T., Piacentini M., Fimia G.M., Ciccocanti F. Mitochondrial Interactome: A Focus on Antiviral Signaling Pathways. *Front. Cell Dev. Biol.* 2020.
34. Koshiha T., Yasukawa K., Yanagi Y., Kawabata S. Mitochondrial membrane potential is required for MAVS-mediated antiviral signaling. *Sci. Signal.* 2011.
35. Anand S.K., Tikoo S.K. Viruses as modulators of mitochondrial functions. *Adv. Virol.* 2013.
36. Combs J.A., Norton E.B., Saifudeen Z.R., Bentrup K.H.Z., Katakam P.V., Morris C.A., Myers L., Kaur A., Sullivan D.E., Zvezdaryk K.J. Human Cytomegalovirus Alters Host Cell Mitochondrial Function during Acute Infection. *J. Virol.* 2020.
37. Yu Y., Clippinger A.J., Alwine J.C. Viral effects on metabolism: Changes in glucose and glutamine utilization during human cytomegalovirus infection. *Trends Microbiol.* 2011.
38. Xi Y., Harwood S., Wise L.M., Purdy J.G. Human Cytomegalovirus pUL37x1 Is Important for Remodeling of Host Lipid Metabolism. *J. Virol.* 2019.
39. Yogev O., Lagos D., Enver T., Boshoff C. Kaposi's sarcoma herpesvirus microRNAs induce metabolic transformation of infected cells. *PLoS Pathog.* 2014.
40. Alves V.S., Leite-Aguiar R., Silva J.P.D., Coutinho-Silva R., Savio L.E.B. Purinergic signaling in infectious diseases of the central nervous system. *Brain. Behav. Immun.* 2020.

Додатки

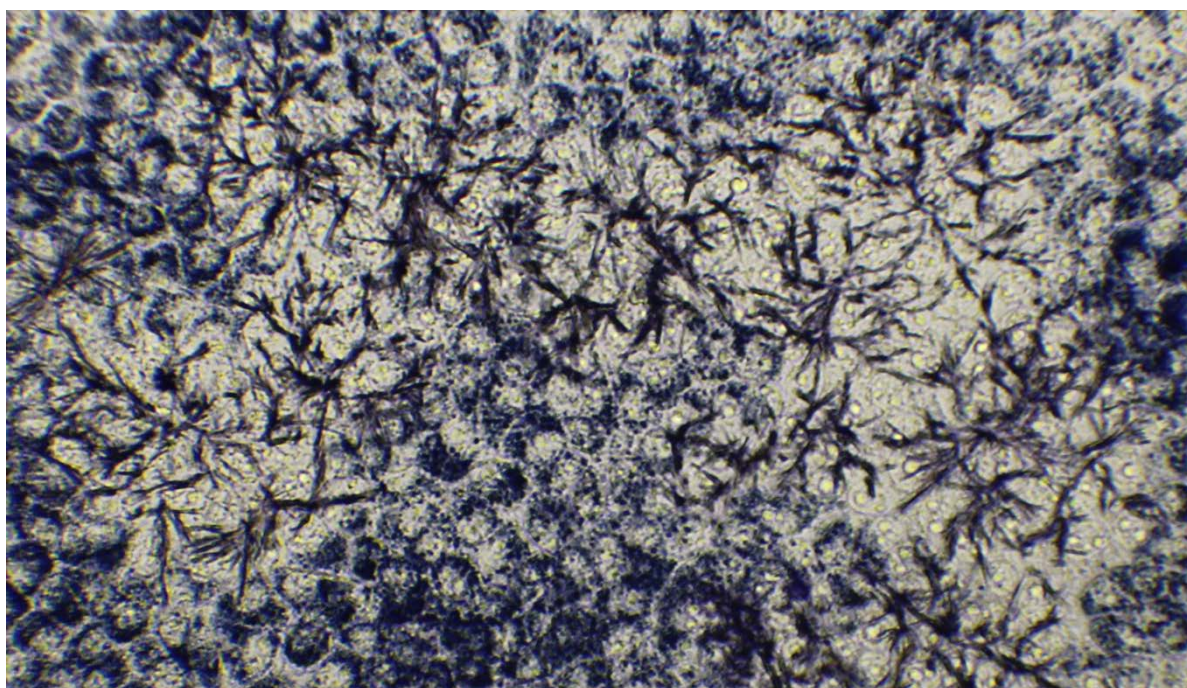
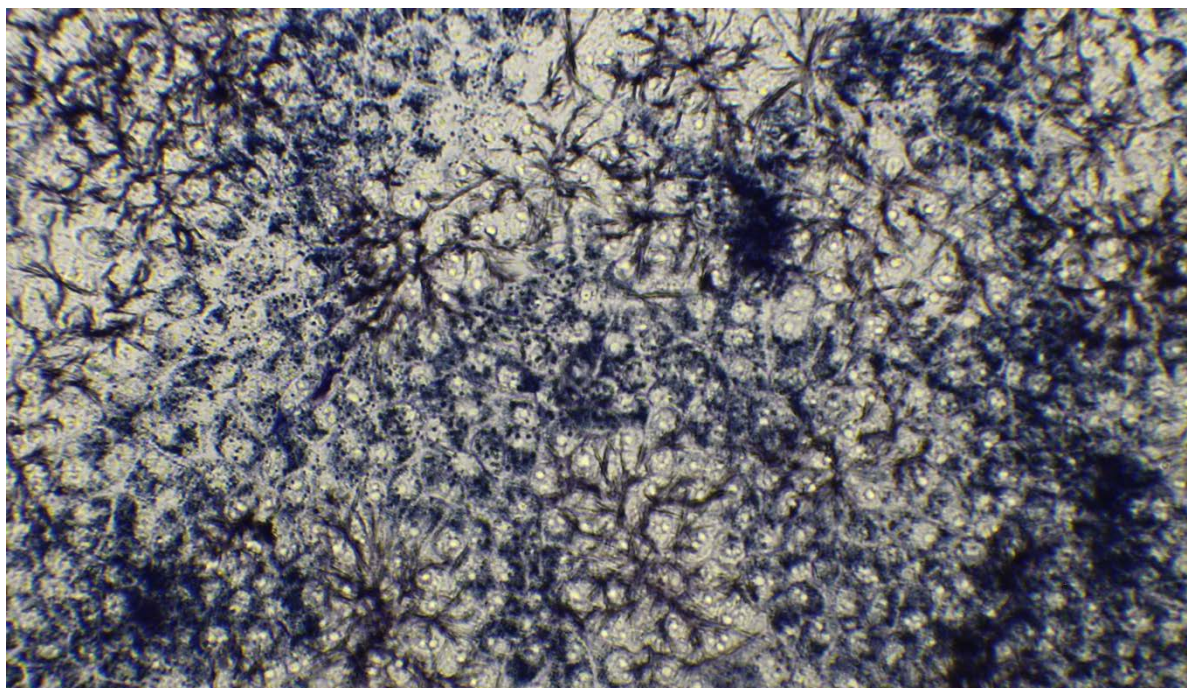


Фото 5. Контрольні інтактні клітини (МТТ-тест).

Фіолетові гранули у цитоплазмі клітин – скупчення диформазану, на поверхні клітин – кристали диформазану, що утворились в результаті взаємодії з позаклітинними дегідрогеназами.

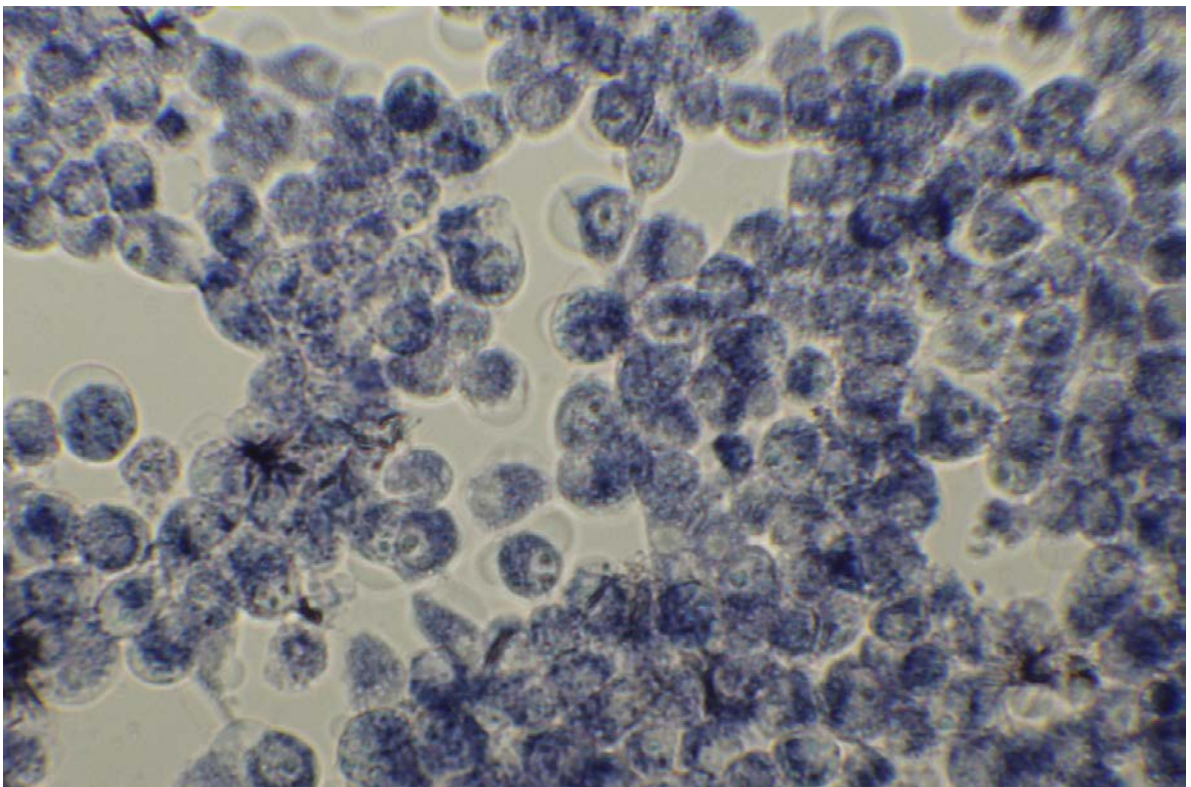
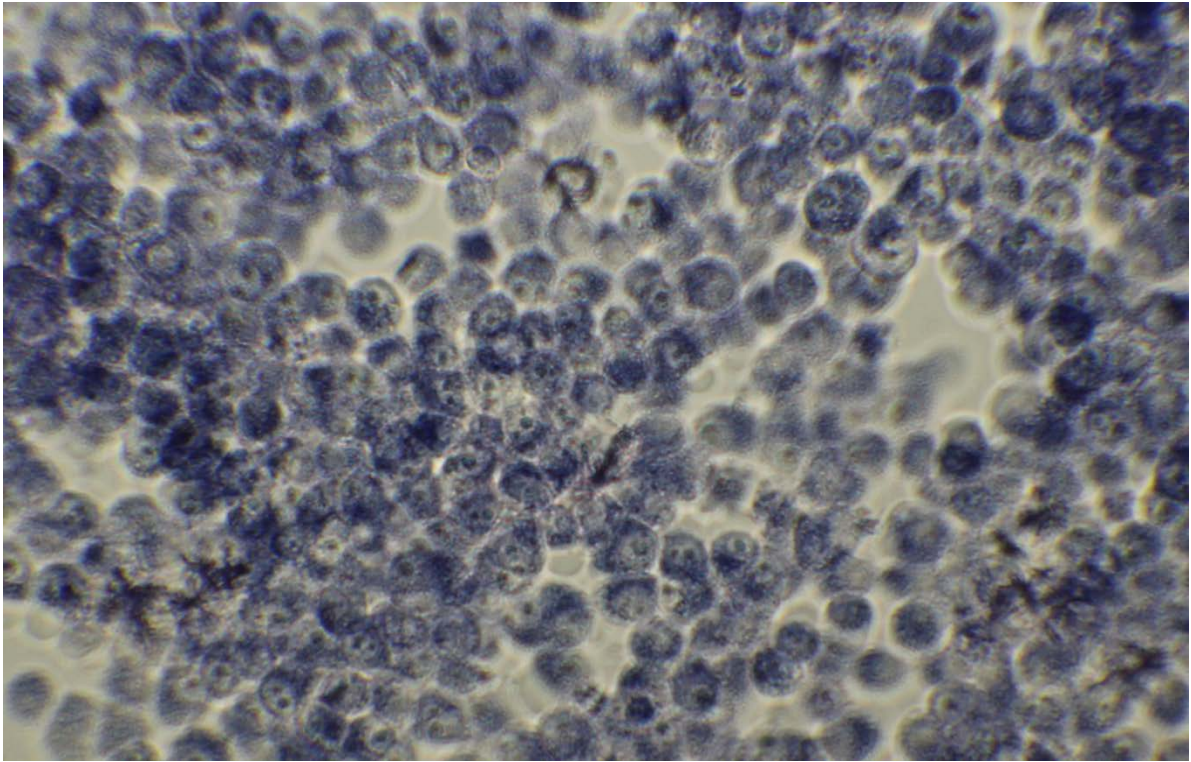


Фото 7. Клітини, інфіковані ВВС за 24 год до МТТ-тесту.

Фіолетові гранули у цитоплазмі клітин – скупчення диформагану, на поверхні клітин – кристали диформагану, що утворились в результаті взаємодії з позаклітинними дегідрогеназами.

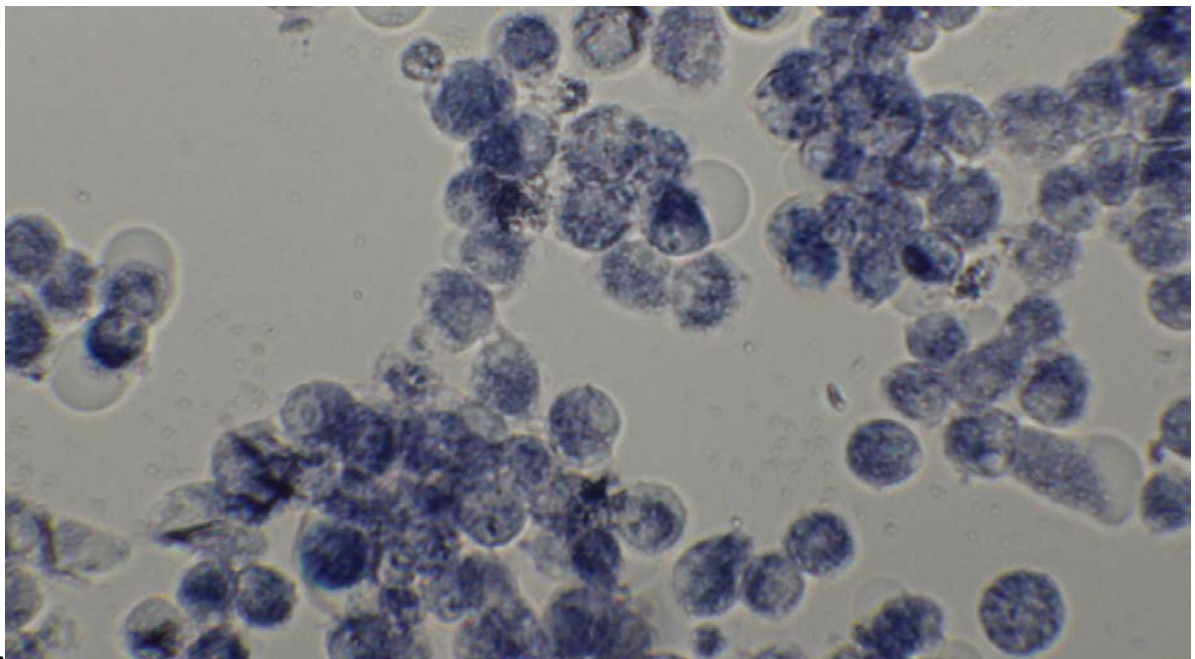
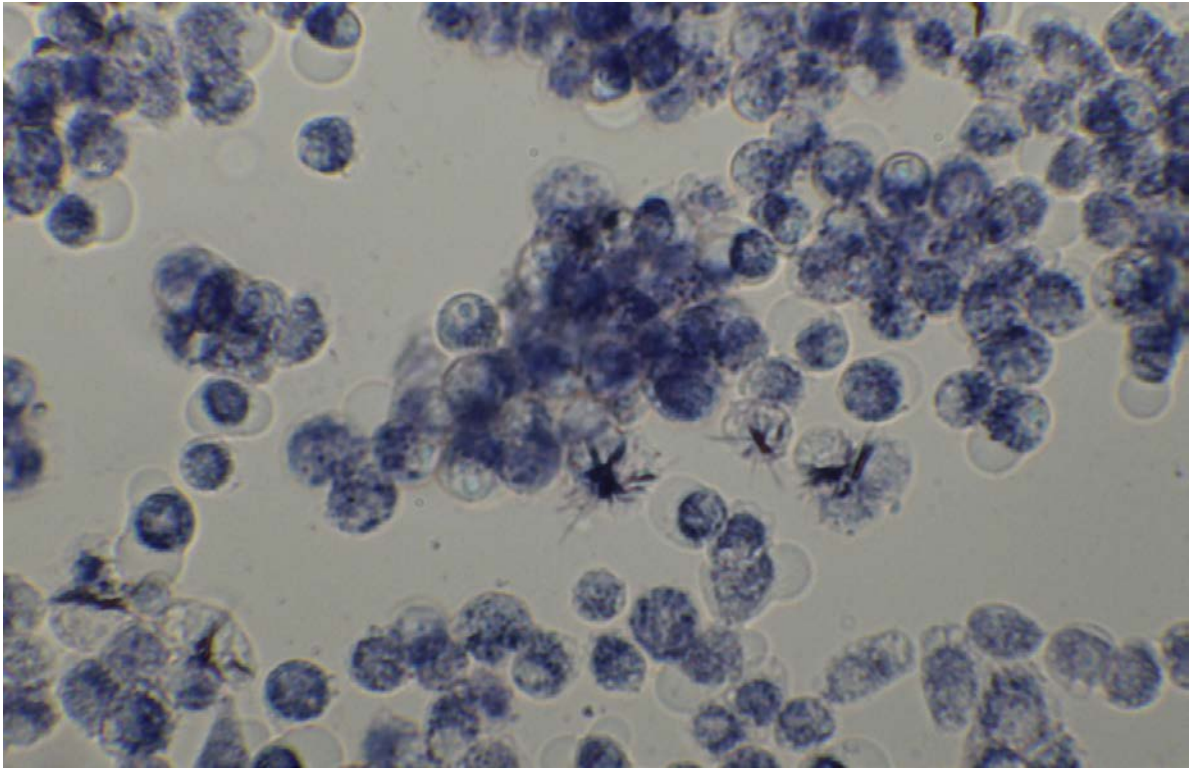


Фото 9. Клітини, інфіковані ВВС за 5 год до МТТ-тесту.

Фіолетові гранули у цитоплазмі клітин – скупчення диформазау, на поверхні клітин – кристали диформазау, що утворились в результаті взаємодії з позаклітинними дегідрогеназами.

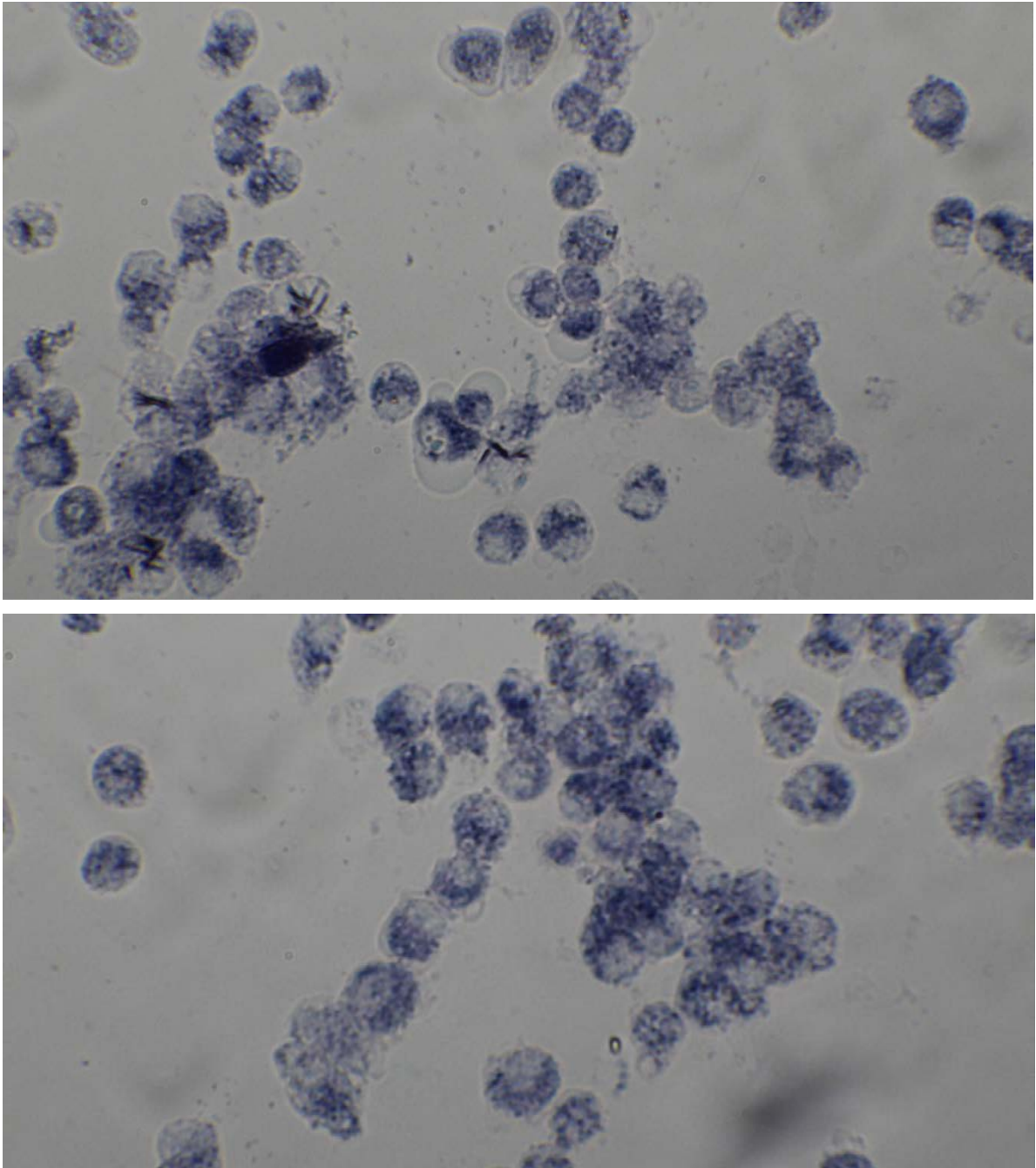


Фото 11. Клітини, інфіковані ВВС за 4 год до МТТ-тесту.

Фіолетові гранули у цитоплазмі клітин – скупчення диформазау, на поверхні клітин – кристали диформазау, що утворились в результаті взаємодії з позаклітинними дегідрогеназами.

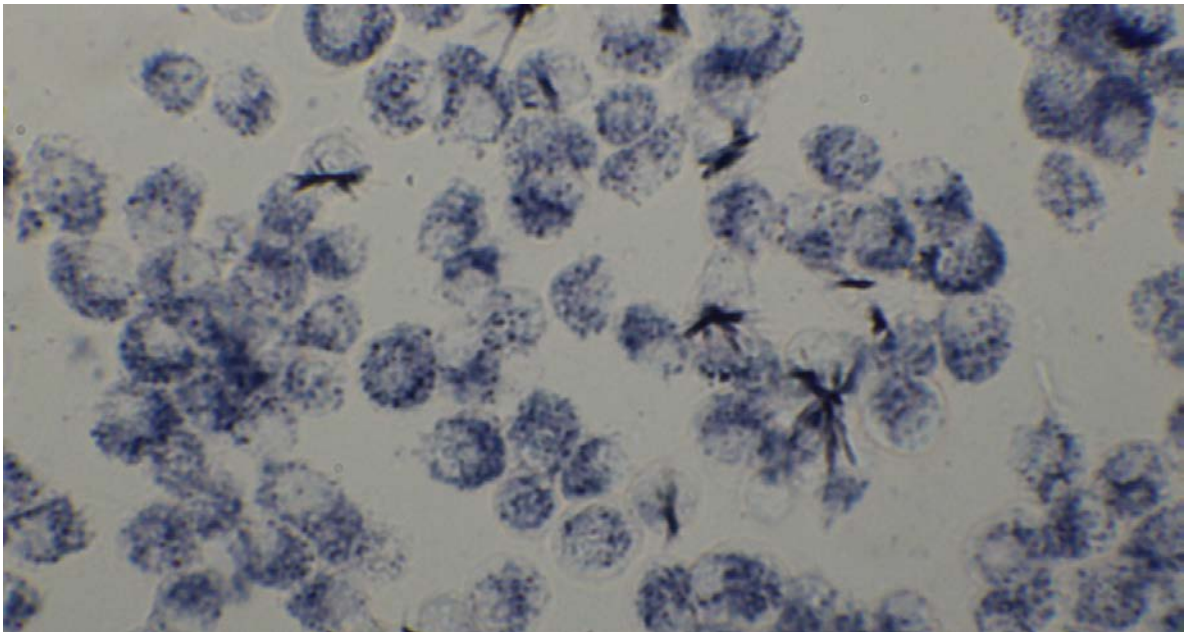
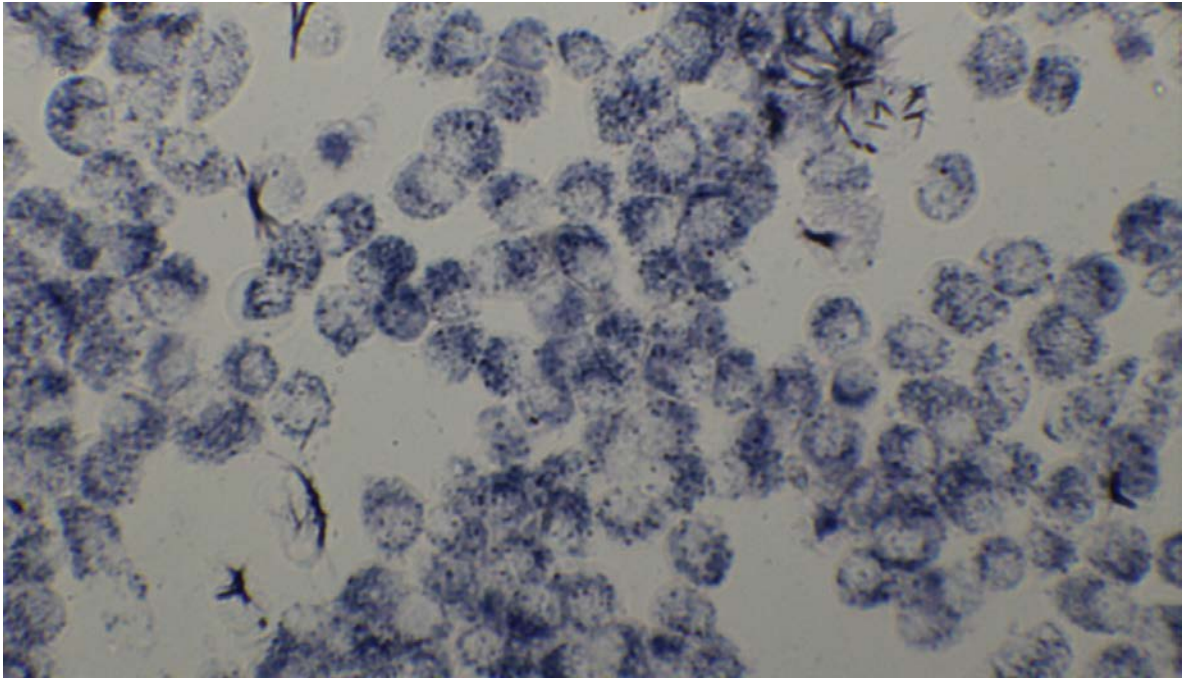


Фото 13. Клітини, інфіковані ВВС за 3 год до МТТ-тесту.

Фіолетові гранули у цитоплазмі клітин – скупчення диформазау, на поверхні клітин – кристали диформазау, що утворились в результаті взаємодії з позаклітинними дегідрогеназами.