

На правах рукописи

Васин Андрей Владимирович

**НОВЫЕ ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ СРЕДСТВ ДИАГНОСТИКИ И
ХИМИОТЕРАПИИ ГРИППА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНОМНЫХ И
ПОСТГЕНОМНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ**

03.01.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Санкт-Петербург – 2018

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт гриппа» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные консультанты: доктор биологических наук, профессор
Пучкова Людмила Валентиновна

доктор биологических наук, профессор,
академик РАН

Киселев Олег Иванович

Официальные оппоненты:

Ершов Феликс Иванович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отдел интерферонов, руководитель

Иванов Андрей Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, кафедра клинической биохимии и лабораторной диагностики, заведующий

Шпаков Александр Олегович, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, лаборатория молекулярной эндокринологии и нейрохимии, заведующий, заместитель директора

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН»

Защита состоится «___» _____ 2018 года в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 001.022.03 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ») (197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12, ФГБНУ «ИЭМ») по адресу 197376, Санкт-Петербург, Каменноостровский пр., д. 73/75.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ») по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12, ФГБНУ «ИЭМ» и на сайте: <http://iemspsb.ru/science/diss/diss001-022-03/>

Автореферат разослан «___» _____ 2018 года

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук

Хныченко Людмила Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Грипп – острая респираторная вирусная инфекция, вызывающая глобальные эпидемии и периодические пандемии. По данным Всемирной организации здравоохранения ежегодно фиксируют до 5 миллионов случаев тяжелого сезонного гриппа. При этом от связанных с гриппом осложнений умирает до 650 000 человек в год (ВНО, 2017). Для вируса гриппа характерна чрезвычайно высокая степень генетической изменчивости, приводящая к быстрому развитию устойчивости к противовирусным препаратам и вакцинам, что определяет актуальность поиска новых подходов к созданию средств профилактики, лечения, а также диагностики гриппа.

Одной из главных тенденций развития вирусологии является применение последних достижений биохимии и клеточной молекулярной биологии для изучения патогенеза инфекции. Установление роли вирусных белков стимулировало разработку препаратов, направленных на подавление их ферментативной активности. Однако используемый при этом вирусцентрический подход оказался малоэффективным, так как не позволяет решить проблему быстрого возникновения устойчивости. Ярким примером такого препарата является ремантадин, к которому была потеряна чувствительность среди большинства циркулирующих в популяции человека штаммов вируса гриппа (Freed&Martin, 2013).

За последнее десятилетие появились новые методы высокопроизводительного мультиплексного анализа, которые позволяют применять новый – системный – подход к изучению и характеристике клеточного ответа на инфекцию для получения максимально полной картины взаимодействий «вирус-хозяин» (Josset *et al.*, 2013). Это новое направление, основанное на применении методов системной биологии и биохимии в области вирусологии, получило название системная вирусология. При этом в качестве биологической системы рассматривают зараженные вирусом клетки, ткани (органы) и целые организмы (Tan *et al.*, 2007). В основе системного анализа лежит возможность измерения изменений всех известных компонентов изучаемой системы на уровне генома, транскриптома, протеома, липидома, метаболома и т.д. Такой хозяин-ориентированный подход выступает в противовес более традиционному подходу, сфокусированному на заранее определенных ограниченных по числу наборам молекул (Katze&Korth, 2007).

Появление системной биологии и системной вирусологии, в частности, стало возможным после завершения проекта по секвенированию генома человека и благодаря появлению высокопроизводительных технологий, таких как метод экспрессионных микрочипов (Kato-Maeda *et al.*, 2001). Внедрение последних в практику послужило лейтмотивом развития системной вирусологии и анализа взаимодействий «вирус-хозяин» в последующие годы (Andeweg *et al.*, 2008; Katze&Korth, 2007; Peng *et al.*, 2009). С помощью экспрессионных микрочипов был подробно изучен клеточный ответ на инфицирование вирусами иммунодефицита человека (Geiss *et al.*, 2000), гриппа

(Geiss *et al.*, 2001; Kash *et al.*, 2004), гепатита С (Geiss *et al.*, 2003), тяжелого острого респираторного синдрома (Baas *et al.*, 2006), иммунодефицита обезьян (Thomas *et al.*, 2006), лихорадки Западного Нила (Fredericksen *et al.*, 2004), простого герпеса 1 типа (Pasięka *et al.*, 2006), Эбола (Kash *et al.*, 2006) и многими другими. Такие исследования позволили выявить ключевые клеточные факторы, задействованные в развитии инфекции, которые можно рассматривать в качестве мишеней при создании новых препаратов для лечения вирусных инфекций. Помимо применения в системной биологии, технология микрочипов может быть использована в диагностике, так как она позволяет в рамках одного эксперимента проводить анализ большого количества диагностических маркеров (Bodrossy & Sessitsch, 2004).

Степень разработанности темы исследования. Системная вирусология значительно расширила понимание ответа организма-хозяина на вызванную вирусом гриппа типа А (ВГА) инфекцию, особенно на клеточном уровне. Пионерские работы, посвященные изучению паттерна ВГА-индуцированной экспрессии на уровне генома, были выполнены в период с 2002 по 2006 годы (Baas *et al.*, 2006; Josset *et al.*, 2013; Kash *et al.*, 2004; Katze & Korth, 2007). С развитием и успешным практическим применением высокопроизводительных технологий стал очевиден их огромный потенциал в создании многомерной (пространственной) модели взаимодействий между ВГА и клеточными факторами. Примечательно, что молекулярные механизмы иммунного ответа на ВГА инфекцию во многом также были изучены и дополнены с применением методов системной вирусологии. Вместе с тем сложная сеть взаимодействий между вирусом и хозяином далеко не исчерпывается иммунным ответом. Много исследований было посвящено вирусному неструктурному белку NS1, выполняющему множество функций, потенциально влияющих на вирулентность ВГА (García-Sastre *et al.*, 1998; Hale *et al.*, 2008). NS1, с одной стороны, является антагонистом системы интерферона (IFN), с другой стороны, отвечает за взаимодействие с несколькими десятками клеточных белков, выполняя роль главного «посредника» между ВГА и инфицируемой клеткой. Именно этот белок был выбран в качестве основного вирусного компонента в работе. В качестве объекта для изучения роли NS1 использовали рекомбинантные ВГА с полноразмерным и частично deletированным геном NS, полученные методом обратной генетики (Egorov *et al.*, 1998a; Kuznetsova *et al.*, 2014; Romanova *et al.*, 2009; Sereinig *et al.*, 2006).

Методы системной вирусологии позволили по-новому подойти к вопросу диагностики и лечения гриппа. Традиционный подход к разработке противовирусных препаратов против гриппа ориентирован на вирусные компоненты. Однако в силу вариабельности вирусного генома, к этим препаратам относительно быстро вырабатывается устойчивость. Появление и развитие высокопроизводительных геномных и постгеномных технологий позволило перейти от вирус-центрического подхода в изучении гриппа к многопараметрическому анализу глобального ответа организма хозяина на вирусную инфекцию, опосредованного сложной сетью взаимодействий

вирусных и клеточных факторов (Bekerman&Einav, 2015). В настоящее время системная вирусология становится платформой для поиска новых мишеней для противовирусной терапии, а также выяснения и/или уточнения механизма действия уже существующих препаратов (Law *et al.*, 2013; Ma-Lauer *et al.*, 2012). Одними из таких препаратов являются 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазины, для которых была показана противовирусная активность, но точный механизм действия оставался неизвестным (Киселев, 2014). Только появление методов системной биологии позволило приблизиться к нахождению клеточных мишеней для этих препаратов.

В работе представлены данные собственных экспериментальных исследований, направленных на поиск новых подходов к диагностике и лечению гриппа с применением геномных и постгеномных методов биохимии, вирусологии и молекулярной биологии. Эти исследования проводились под руководством академика РАН, доктора биологических наук, профессора О.И. Киселева в возглавляемой автором Лаборатории структурной и функциональной протеомики ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, в дальнейшем преобразованной в Отдел молекулярной биологии вирусов. В работе представлены данные исследований, выполненных в период с 2005 по 2017 годы.

Цель исследования. Создание платформы для разработки новых подходов к поиску лекарственных препаратов против гриппа и его диагностики с использованием методов системной вирусологии. В соответствии с целью поставлены следующие задачи:

- 1) Провести анализ эволюционной динамики гена *NS* и белка *NS1* ВГА человека.
- 2) Определить клеточную модель, позволяющую проводить изучение механизмов взаимодействия между ВГА и инфицируемой клеткой и оценить вклад *NS1* в развитие инфекции.
- 3) На основе анализа изменения транскриптома клеток в ответ на ВГА инфекцию определить связанные с *NS1* клеточные гены и/или пути, которые можно рассматривать как потенциальные мишени для противовирусной терапии.
- 4) Оценить противовирусную эффективность подавления экспрессии гена *NS* ВГА с помощью механизма РНК-интерференции.
- 5) Оценить возможность использования синтетических аналогов клеточных *mi*РНК, уровень экспрессии которых снижается при ВГА инфекции, в качестве нового подхода для лечения гриппа.
- 6) Изучить возможность окисления производными 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов цистеин-содержащих пептидов гемагглютинаина ВГА и активных центров протеиндисульфидизомеразы.
- 7) Разработать олигонуклеотидный микрочип для определения и субтипирования ВГА человека и животных.
- 8) Разработать мультиплексный метод определения уровня мРНК цитокинов человека, характеризующих течение гриппозной инфекции.

Научная новизна. Впервые проведен подробный филогенетический анализ и изучена эволюционная динамика гена *NS* ~15000 штаммов ВГА человека и свиней, циркулирующих в соответствующих популяциях с 1918 года по настоящее время. Продемонстрировано, что ген *NS* всех эпидемических вариантов ВГА человека эволюционировал только в процессе генетического дрейфа и ведет свое начало от вируса H1N1_{pdm1918}. Сравнительный анализ структурных и функциональных доменов белка NS1 ВГА человека показал, что они преимущественно оставались консервативными в процессе эволюции. Таким образом, NS1 можно рассматривать как перспективную мишень для терапии гриппа. Впервые показано, что инкапсулированная в гибридные микрокапсулы анти-NS siРНК NS-777 обладает сопоставимой с озельтамивиром противовирусной активностью *in vitro* в отношении ВГА разных подтипов (H1N1, H1N1_{pdm09}, H3N2, H5N2 и H7N9).

Клеточная (эпителиальные клетки A549) модель ВГА инфекции с использованием рекомбинантных вирусов с полноразмерной и частично удаленной открытой рамкой считывания (ОРС) NS1 в гене *NS* (вирусы wtNS1 и ΔNS1, соответственно) была использована для установления связанных с NS1 клеточных факторов – потенциальных мишеней для терапии гриппа. Впервые показано, что NS1 ВГА отвечает за активацию экспрессии некодирующих РНК SNAR: G1, H, F, B2, G2, D и A3, ассоциированных с противовирусным ядерным белком NF90, и генов *HSPA5 (GRP78)*, *HSPA1B*, *HSPA1A*, *DNAJB1* и *BAG3*, участвующих в регуляции HSF1-зависимого ответа на тепловой шок. С использованием клеточной модели ВГА инфекции предложен новый подход к разработке препаратов против гриппа, основанный на применении синтетических компенсаторных аналогов клеточных miРНК, уровень экспрессии которых снижается под действием вирусного заражения. Высокоэффективное (сопоставимое с озельтамивиром) ингибирование репликации ВГА *in vitro* было достигнуто при использовании коктейля синтетических аналогов клеточных miРНК let-7a, miR-16, miR-24 и miR-194.

Впервые показано, что соединения ряда 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов катализируют образование дисульфидных связей в цистеинсодержащих пептидных фрагментах гемагглютинаина (HA) ВГА и активных центрах протеиндисульфидизомеразы (ПДИ). Полученные данные позволяют предположить, что 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазины могут влиять на активность ПДИ посредством окисления SH-групп цистеинов в активном центре фермента. Впервые показано, что натриевая соль 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, тригидрат может обладать умеренной противовирусной активностью в отношении вируса Денге.

Разработан оригинальный олигонуклеотидный диагностический микрочип «IAVchip» для субтипирования ВГА человека и животных. Его отличительной особенностью от аналогов является то, что для получения флуоресцентно меченых кДНК копий геномных сегментов ВГА используется метод одностадийной ОТ-ПЦР с праймерами к консервативным областям всех восьми геномных сегментов ВГА. Такой подход позволил унифицировать процедуру

подготовки пробы для анализа на микрочипе и избавиться от необходимости использования подтип- и/или сегмент-специфических мультиплексных праймеров, что значительно упростило процесс проведения анализа.

Впервые разработан набор мультиплексных ПЦР (мПЦР) в режиме реального времени для определения содержания мРНК цитокинов IL1 β , IL2, IL4, IL6, IL10, IL12 β , IL18, IFN γ и TNF α человека при гриппозной инфекции. Тест-система была успешно апробирована на клеточной культуре и образцах крови пациентов. Установлено, что NS1 ВГА в эпителиальных клетках A549 отвечает за активацию экспрессии мРНК IL4, препятствующего развитию Th1-опосредованного цитотоксического клеточного ответа. У пациентов с лабораторно подтвержденным гриппом в лейкоцитах крови происходит увеличение уровня мРНК IL6, TNF α , IL1 β , IL10 и IL18, при этом значимое повышение мРНК IL10 и TNF α характерно только для пациентов с гриппом, но не с респираторными инфекциями другой этиологии.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты проведенного исследования содержат как новые фундаментальные данные в области биохимии, молекулярной биологии и вирусологии, так и прикладные результаты.

Подробно изучены эволюционная динамика гена NS и распределение ключевых аминокислотных замен в структурных и функциональных сайтах белка NS1 ВГА, циркулирующих в популяции человека с 1918 года по настоящее время. Получены новые данные о механизмах клеточного ответа на ВГА инфекцию. Использованный в работе методологический подход, который заключается в изучении взаимодействий между ВГА и инфицированными клетками с применением высокопроизводительных методов системной вирусологии, представляет собой платформу для поиска новых клеточных мишеней для терапии гриппа. Кроме того, с ее помощью возможно проводить оценку механизмов действия уже известных препаратов. Предложенный подход позволил выявить в клетках A549 NS1-зависимую активацию экспрессии генов, участвующих в регуляции фолдинга и сборки белков, а также клеточные miРНК, которые можно рассматривать в качестве мишеней для противовирусной терапии. Предложенная в работе клеточная модель ВГА инфекции используется в ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России для создания и изучения механизма действия молекул, проявляющих противовирусную активность.

Предложенные в работе подходы по использованию анти-NS siРНК и компенсаторных miРНК будут в дальнейшем использованы при создании противовирусных препаратов, механизм действия которых основан на явлении РНК-интерференции. Для разработанных препаратов в случае их успешных испытаний *in vivo* будут проведены доклинические исследования в сотрудничестве с промышленными партнерами.

Раскрыт один из потенциальных механизмов действия соединений ряда 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов, который заключается в воздействии на цистеин-содержащие пептиды и белки, в частности, на ПДИ человека.

Соединения ряда 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов находятся на различных стадиях доклинических, клинических и пострегистрационных исследований. Полученные в работе данные о потенциальном механизме их действия будут применены для расширения спектра действия этих препаратов на другие инфекции.

Разработанные тест-системы были успешно апробированы на практике. Набор для определения мРНК цитокинов методом мПЦР с детекцией в режиме реального времени прошел клиническую апробацию. Методический задел, полученный при создании диагностических микрочипов, стал основой для проведения разработки новой уникальной тест-системы «ТОРИ-ТЕСТ» для персонифицированной диагностики острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) человека.

Полученные в работе данные используются при преподавании курсов молекулярной вирусологии и молекулярной эволюции в Санкт-Петербургском политехническом университете Петра Великого (СПбПУ) и аспирантуре ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России.

Методология и методы исследования. В работе применены современные методы биохимии, молекулярной биологии и вирусологии. Использован метод биологических микрочипов для анализа экспрессии генов и создания новых методов молекулярной диагностики. Применялись различные методы амплификации нуклеиновых кислот (вирусных РНК, клеточных мРНК и miРНК), методы генной инженерии для создания рекомбинантных вирусов (обратная генетика) и получения рекомбинантных белков. При работе с вирусами *in vitro* использовали методы классической и молекулярной вирусологии, культивирования клеточных культур, конфокальной и электронной микроскопии. При работе с 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинами применяли методы масс-спектрометрии. Использовали компьютерные методы анализа: филогенетический анализ, статистическую обработку данных клеточной экспрессии, полученных методом микрочипов и секвенирования нового поколения (NGS), молекулярный докинг. Все эксперименты выполнены в достаточном количестве повторов, позволяющих адекватно применить статистический анализ.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Методологический подход, состоящий в применении методов системной вирусологии для изучения взаимодействий между ВГА и инфицированными клетками, является платформой для первичного поиска новых клеточных мишеней для терапии гриппа и оценки механизмов действия уже известных препаратов. Данный подход позволил выявить в эпителиальных клетках А549 NS1-зависимую активацию экспрессии генов, участвующих в регуляции фолдинга и сборки вирусных белков, и предложить их в качестве мишеней для противовирусной терапии.

2. Белок NS1 ВГА является одним из наиболее эволюционно консервативных и значимых для адаптации к организму хозяина белков ВГА, выполняя роль ключевого «координатора» в системе комплексных

взаимодействий вирус-хозяин, что делает его перспективной мишенью для нового подхода к терапии гриппа, направленного, в первую очередь, на снижение патогенного воздействия ВГА на организм. С использованием механизма РНК-интерференции показано, что выключение экспрессии гена *NS* ВГА демонстрирует противовирусное действие *in vitro* в отношении ВГА разных подтипов.

3. Клеточные miРНК являются новыми перспективными мишенями для лечения гриппа. Применение коктейля синтетических компенсаторных аналогов клеточных miРНК, уровень экспрессии которых снижается под действием вирусного заражения, вызывает сопоставимое с озельтамивиром ингибирование репликации ВГА *in vitro*.

4. Противовирусная активность соединений ряда 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов обусловлена их способностью катализировать образование дисульфидных связей в цистеин-содержащих фрагментах вирусных и клеточных белков. Одной из потенциальных мишеней для 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов является клеточный фермент – ПДИ, участвующий в фолдинге поверхностных вирусных белков.

5. Мультиплексные методы типирования и субтипирования ВГА и определения клеточных маркеров, характеризующих развитие заболевания, позволяют сформулировать новый персонифицированный подход к диагностике гриппа и других респираторных вирусных инфекций.

Степень достоверности и апробации результатов. Результаты получены с помощью современных методов. Объем выборок и число независимых экспериментов позволили оценить значимость результатов после обработки с помощью адекватных методов статистического анализа. Материалы работы были представлены на следующих мероприятиях: II Международном форуме «Российско-Китайское биомедицинское сотрудничество» в рамках инициативы «Один пояс – один путь» (11–16 ноября 2017 г., Санкт-Петербург, Россия), 42-м Конгрессе FEBS (10–14 сентября 2017 г., Иерусалим, Израиль), Международной конференции «Trends in Influenza Research» (18–20 сентября 2017 г., Санкт-Петербург, Россия), заседании Российского общества биохимиков и молекулярных биологов при РАН (Совет Санкт-Петербургского отделения) (17 мая 2017 г., Санкт-Петербург, Россия), IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика» (18–20 апреля 2017 г., Москва, Россия), 51-й Школе ПИЯФ по физике конденсированного состояния (11–16 марта 2017 г., Санкт-Петербург, Россия), 5-й Конференции ESWI (14–17 сентября 2014 г., Рига, Латвия), European Human Genetics Conference (8–11 июня 2013 г., Париж, Франция), 38-м Конгрессе FEBS (6–11 июля 2013 г., Санкт-Петербург, Россия), Научной конференции «Грипп: вирусология, эпидемиология, профилактика, лечение», посвященной 45-летию НИИ гриппа (24–25 октября 2012 г., Санкт-Петербург, Россия), II Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням (29–31 марта 2010 г., Москва, Россия), Международной конференции «Новое поколение противогриппозных вакцин»

(28–29 октября 2009 г., Санкт-Петербург, Россия), Международной научно-практической конференции «Перспективы сотрудничества государств-членов ШОС в противодействии угрозе инфекционных болезней» (14–15 мая 2009 г., Новосибирск, Россия), Международной научно-практической конференции «Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы инновационного развития» (20–22 мая 2008 г., Алматы, Казахстан), Международной конференции «Preparedness to the Influenza Pandemic – an International Outlook» (15–17 марта 2007 г., Санкт-Петербург, Россия).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 17 статей в рецензируемых журналах, из них 15 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ и индексируемых в библиографических базах данных WoS, Scopus и PubMed; 2 монографии, получено 3 патента РФ.

Личный вклад соискателя. Автор провел анализ литературы по проблеме исследования, разработал концепцию работы, осуществил планирование экспериментов и анализ результатов, которые представил в докладах на конференциях и опубликовал в научных статьях. Соискателем были проведены филогенетический и биоинформационный анализ, выполнены эксперименты по созданию микрочипов и ПЦР тест-систем. При участии сотрудников Отдела молекулярной биологии вирусов ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России выполнены следующие работы: эксперименты по анализу экспрессии генов проведены к.б.н. С.А. Клотченко и к.б.н. М.А. Плотниковой, масс-спектрометрические измерения – д.х.н. О.А. Миргородской, Я.А. Забродской и А.С. Тараскиным, анализ противовирусной активности siРНК проведен А.В. Бродской, микроскопические изображения получены к.б.н. А.Н. Горшковым, молекулярный докинг выполнен к.х.н. В.Б. Цветковым. Опыты по получению рекомбинантных вирусов гриппа выполнены к.б.н. Е.А. Романовской-Романько (Лаборатория векторных вакцин ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России). Упаковка siРНК в микрокапсулы осуществлена А.С. Тиминим (СПбПУ). Статистическая обработка данных экспрессионных микрочипов и NGS проведена А.В. Предеусом (Институт биоинформатики).

Структура диссертации. Диссертация содержит разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений», «Список литературы», включающий 392 источника, из них 8 – отечественных, и «Приложения». Диссертация изложена на 311 страницах. Результаты и обсуждение представлены в 23 таблицах и иллюстрированы 65 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Штаммы ВГА человека и животных получены из коллекций ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России и РГП «НИИ проблем биологической безопасности» КН МОН РК. Клеточные культуры Vero и A549 получены из Европейской Коллекции Клеточных Культур, MDCK – из банка клеточных культур ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России. Гибридные микрокапсулы

синтезированы согласно методике (Timin *et al.*, 2017), siРНК – в «ДНК-Синтез», пептиды – в «НПФ Верта», соединения ряда 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов – в УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина и Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН. Моноклональные антитела (МКА) к белкам NP, NA и NS1 ВГА получены в Отделе биотехнологии ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России.

Филогенетический анализ. Последовательности гена *NS* взяты из базы NCBI Influenza Virus Resource, их множественное выравнивание проведено в программе MAFFT (Kato&Standley, 2013), филогенетический анализ – с использованием алгоритма RAxML.

Клеточная модель ВГА инфекции. Рекомбинантные ВГА получали методом обратной генетики в процессе трансфекции клеток Vero плазмидными ДНК, кодирующими сегменты генома ВГА (Hoffmann&Webster, 2000; Pleschka *et al.*, 1996). Моделирование ВГА инфекции проводили на клетках A549 при множественности заражения (МОИ) 0,001-1 (Петрова-Бродская *и др.*, 2017). Инфекционную активность вирусов определяли методом предельных разведений на клетках MDCK и Vero на среде Alpha MEM с добавлением трипсина и антибиотиков стрептомицина/пенициллина. Расчет 50% тканевой инфекционной дозы (ТИД₅₀) вируса проводили по методу Рида и Менча (Reed&Muench, 1938).

Выделение РНК. Выделение тотальной РНК проводили с использованием реагента TRIzol («Invitrogen», США), концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 («Thermo Fisher», США). мРНК из препаратов тотальной РНК выделяли на oligodT шариках с использованием набора Dynabeads mRNA Purification Kit («Ambion», США).

Детекция вирусной РНК методом ПЦР. ОТ-ПЦР проводили в соответствии с рекомендациями CDC с использованием SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR Kit («Invitrogen», США) и праймеров InfA (CDC, 2008).

Детекция вирусных белков методом ИФА. Сэндвич-ИФА проводили по методике, описанной в (Timin *et al.*, 2017), с использованием МКА к NA и NP.

Анализ с помощью экспрессионных микрочипов и NGS. Для высокопроизводительного анализа дифференциальной экспрессии использовали олигонуклеотидный микрочип SurePrint G3 Human Gene Expression 8×60K v2 и наборы для подготовки библиотек («Agilent», США). Для анализа данных использовали пакеты limma и biomaRt («RStudio», США). Функциональная аннотация генов проведена в программе DAVID. Для анализа паттернов экспрессии miРНК использовали платформу MiSeq («Illumina», США). Все этапы подготовки библиотек miРНК для NGS проводили с использованием набора TruSeq Small RNA Library Prep Kit Set A («Illumina», США). При запуске использовали картридж MiSeq v2 Reagent kit 50 Cycles PE («Illumina», США). Выравнивание прочтений на референсный геном человека версии GRCh38.p3 проводили с использованием программы STAR v.2.5.0.

Изучение противовирусной активности siРНК. Для оценки жизнеспособности клеток применяли микротетразолиевый тест. Для оценки

эффективности проникновения флуоресцентно меченых siРНК в клетки использовали систему формирования изображений Cytell Cell Imaging System («GE Healthcare», США). Противовирусную активность siРНК *in vitro* оценивали методами реакции гемагглютинации (РГА), ОТ-ПЦР и ИФА.

Количественная масс-спектрометрическая оценка окислительной способности 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов. Пептиды в концентрации 0,1 мкМ смешивали с препаратами в концентрации 0,025 мкМ, растворенными в 100 мМ NH_4HCO_3 буфере. Инкубацию проводили при комнатной температуре, реакцию останавливали 2% трифторуксусной кислотой. Анализ проводили на MALDI-TOF/TOF масс-спектрометре UltrafleXtreme («Bruker», Германия). Степень окисления оценивали по соотношению окисленной и восстановленной форм пептидов, долю которых рассчитывали по площади соответствующих им пиков изотопных распределений.

Молекулярный докинг. 3-D модели лигандов и мишени были созданы с помощью молекулярно-графического пакета SYBYL 8.0. Квантово-механические вычисления проводили с помощью пакета Gaussian 9 (Frisch *et al.*, 2009) Для определения наиболее вероятного сайта связывания на поверхностях мишеней и оценки энергии связывания использовали процедуру докинга в программе ICM-Pro 3.8-6a (Abagyan *et al.*, 1994).

Получение рекомбинантного белка ПДИ. Ген *P4NB* клонировали из клеток HEK293 в плазмиду pET22B(+). Из лизата трансфицированных клеток *E. coli* рекомбинантный белок, содержащий прокариотический сигнальный пептид PelB и 6×His, очищали методом металл-хелатной аффинной хроматографии с использованием колонки Protino Ni-NTA Column («Macherey-Nagel», Германия) на хроматографе ÄKTAprime plus («GE Healthcare», США).

Ферментативная активность ПДИ. Оценку ферментативной активности ПДИ проводили с использованием набора PDI Inhibitor Screening Assay Kit («Abcam», США).

Разработка олигонуклеотидных микрочипов. Олигонуклеотидные зонды, иммобилизовали в 3×SSC на альдегидный субстрат Vantage Aldehyde Slides («CEL Associates», США) методом контактной печати на споттере SpotBot®3 («ArrayIt Corporation», США), ковалентную пришивку зондов проводили УФ-облучением в кросслинкере BioLink («Biometra», Германия) при 0,09 Дж/см². Флуоресцентное мечение вирусной РНК проводили как описано в (Vasin *et al.*, 2011). Флуоресцентное мечение мРНК цитокинов проводили методом ОТ-ПЦР как описано в (Плотникова *и др.*, 2011). Гибридизацию флуоресцентно меченых кДНК проводили с использованием рамок FAST® Frame («Whatman», США) в течение 2 часов при 37°C с перемешиванием на термошейкере как описано в (Vasin *et al.*, 2014). Сканирование микрочипов проводили на сканере ScanArray Express («PerkinElmer», США).

Мультиплексная ПЦР для детекции цитокинов. мПЦР с детекцией в режиме реального времени проводили как описано в (Plotnikova *et al.*, 2016).

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили с помощью параметрического теста Стьюдента или непараметрических

критериев Уилкоксона-Манна-Уитни с использованием программного обеспечения MS Office Excel 2010 и Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Белок NS1 – перспективная мишень в системе вирус гриппа типа А/клетка-хозяин для разработки средств терапии гриппа

На первом этапе работы провели анализ эволюционной динамики гена *NS* ВГА человека. Представленная на рисунке 1 топология филогенетического дерева, построенного на основе более 7000 уникальных нуклеотидных последовательностей ОРС NS1 гена *NS* ВГА человека и свиней, согласуется с принятой моделью его эволюции (Taubenberger&Kash, 2010; Xu *et al.*, 2014). Показано, что вызвавший пандемию «Испанского гриппа» вирус H1N1_{pdm1918} является предшественником всех современных ВГА человека и свиней (за исключением вирусов Евразийской линии) (Taubenberger&Kash, 2010). Ген *NS* вируса H1N1_{pdm1918} сохранился в ВГА H1N1 человека и оставался неизменным в процессах реассортации, приведших к образованию ВГА подтипов H2N2 и H3N2. Ген *NS* вирусов H1N1_{pdm2009} эволюционировал в пуле ВГА свиней, при этом он, так же, как и ген *NS* ВГА человека подтипов H1N1, H2N2 и H3N2 происходит от общего предкового гена *NS* вируса H1N1_{pdm1918}. Таким образом, общая схема, иллюстрирующая эволюционную динамику гена *NS* ВГА человека, показывает, что он не подвергался реассортации и оставался неизменным у ВГА всех подтипов, циркулировавших в популяции человека, начиная с 1918 года (рисунок 1). Мутации в гене *NS* накапливались постепенно в процессе генетического дрейфа. Среди всех геномных сегментов помимо *NS* неизменным в процессе эволюции ВГА человека оставался только сегмент NP.

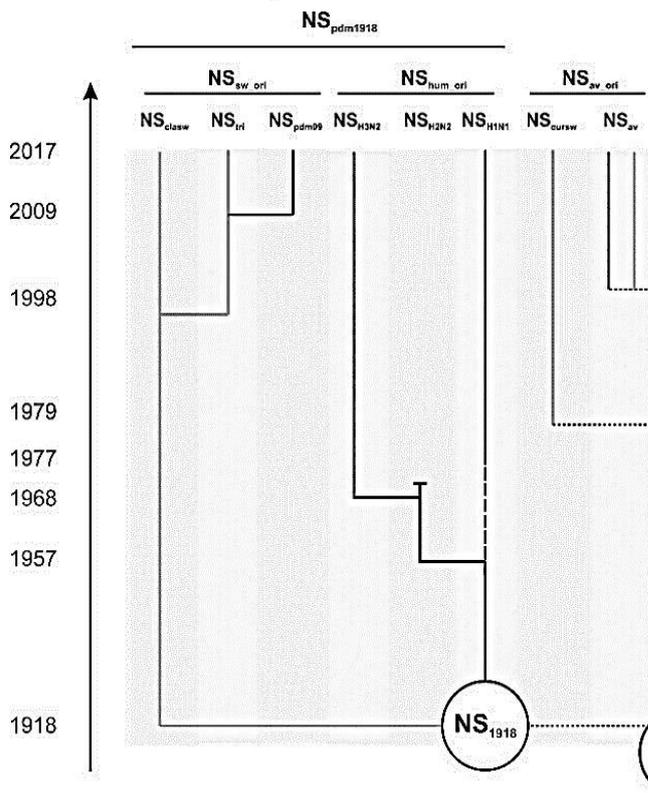


Рисунок 1 – Схема эволюции гена *NS* ВГА человека и свиньи. Среди генов *NS* ВГА выделяют две линии, произошедшие от ВГА птиц (NS_{av_ori}) и H1N1_{pdm1918} ($NS_{pdm1918}$). Ген *NS* вируса H1N1_{pdm1918} происходит из пула генов ВГА птиц (NS_{avian}) и является предшественником гена *NS* всех ВГА человека. Линия $NS_{pdm1918}$ содержит клады NS_{hum_ori} и NS_{sw_ori} , соответствующие сезонным ВГА человека H1N1, H2N2 и H3N2 (линии NS_{H1N1} , NS_{H2N2} и NS_{H3N2}) и ВГА свиней Классической линии, тройным реассортантным ВГА свиньи и пандемическим вирусам H1N1_{pdm2009} человека (линии NS_{clasw} , NS_{tri} и NS_{pdm09}). Внутри линии NS_{av_ori} выделяют гены *NS* ВГА свиней Евразийской линии (NS_{eursw}) и ВГА человека и свиней, происходящих от ВГА птиц H5, H7, H9 (NS_{av})

Оценка количества аминокислотных замен в ключевых структурных и функциональных сайтах белка NS1 разных клейдов ВГА человека показала, что большинство из них оставались консервативными в процессе эволюции (рисунок 2). Наблюдаемая консервативность NS1 наряду с данными о том, что делеция ОРС этого белка и некоторые замены в нем существенно снижают уровень репликации и степень патогенности ВГА, делают NS1 перспективной мишенью для терапии гриппа. Прежде чем приступить к проверке этого предположения, необходимо было детально охарактеризовать клеточную модель ВГА инфекции, которая позволяла бы оценить вклад NS1 в развитие инфекции, осуществить поиск связанных с NS1 клеточных факторов, а также провести скрининг противовирусной активности отобранных соединений *in vitro*.

Штамм	РНК-связывающий домен (RBD) 1-73 нукл																	Линкерный домен 74-87 нукл																
	3	4	6	18	21	22	23	25	26	27	41	44	48	53	55	56	59	60	63	67	70	74	76	77	80	81	82	84	86	87				
A/Brevig_Mission/1/1918 (H1N1)	S	N	V	V	R	F	A	Q	E	L	K	R	S	D	E	T	R	A	Q	R	K	D	A	L	T	I	A	V	A	S				
A/Memphis/10/1983 (H1N1)	P	.	.	.	Q	V	K	.	.	.	C	V	M	A	.	.					
A/Malaysia/11641/1997 (H1N1)	.	H	.	.	Q	V	.	.	D	.	.	K	.	N	.	C	V	F	M	A	.	.						
A/Taiwan/1/64 (H2N2)	Q	V	V	A	V	M	A	.	.						
A/Hong_Kong/1_1/1968 (H3N2)	Q	V	V	N	.	A	V	M	A	.	.							
A/Oregon/02/2016 (H3N2)	.	.	.	I	Q	V	V	.	K	R	.	N	.	K	A	H	V	.	K	M	V	T	.	.						
A/swine/Minnesota/24/1975 (Classical)	.	.	.	I	.	.	.	N	G	.	.	K	.	N	.	L	.	W	.	N	T	S	.						
A/swine/Iowa/8548_1/98 (Triple)	.	.	.	I	.	.	.	N	G	.	.	K	N	.	.	L	V	.	W	.	S	T	T	.						
A/California/14/2009 (H1N1pdm09)	.	.	M	I	.	.	.	N	G	.	.	K	N	.	.	L	V	.	W	.	S	T	T	.						
A/swine/England/195852/1992 (Eurasian)	W	G	.	.	N	E	.	P	.	.	.	E						
A/Vietnam/CL01/2004 (avian)	N	E						

Штамм	Эффекторный домен (ED) 88-203 нукл																													
	91	95	98	103	106	108	111	112	114	117	119	123	125	127	129	135	139	143	145	164	166	171	172	178	179	180	189	196	197	198
A/Brevig_Mission/1/1918 (H1N1)	T	L	M	F	M	K	V	A	S	I	M	I	D	N	I	S	D	T	I	P	L	D	E	V	G	V	D	E	T	L
A/Memphis/10/1983 (H1N1)	.	I	P	V	N	.	I	K	.
A/Malaysia/11641/1997 (H1N1)	.	I	P	V	T	.	N	.	I
A/Taiwan/1/64 (H2N2)	.	I	L	.	.	.	E	P	.	I	.	.	M	I	.	I	K	.	
A/Hong_Kong/1_1/1968 (H3N2)	.	I	L	.	.	.	E	P	.	I	.	.	M	I	.	I	K	.	
A/Oregon/02/2016 (H3N2)	.	T	L	.	.	.	E	P	.	.	.	E	S	M	N	.	.	V	.	F	I	.	I	K	N	
A/swine/Minnesota/24/1975 (Classical)	A	.	.	.	R	.	.	.	V	.	E	L	G	.	N	
A/swine/Iowa/8548_1/98 (Triple)	A	.	.	.	R	I	T	.	V	.	E	.	.	.	N	G	.	N	
A/California/14/2009 (H1N1pdm09)	S	.	.	.	R	I	I	P	V	L	V	E	.	V	.	N	Y	G	.	N	I	
A/swine/England/195852/1992 (Eurasian)	T	I	.	.	K	A	
A/Vietnam/CL01/2004 (avian)	T	G	.	I	I	

Штамм	С-концевой домен 204-237 нукл																
	205	206	207	209	211	212	213	214	215	217	221	224	226	227	228	229	
A/Brevig_Mission/1/1918 (H1N1)	S	S	N	N	R	P	P	L	P	K	K	R	I	K	S	E	
A/Memphis/10/1983 (H1N1)	T	R	.	
A/Malaysia/11641/1997 (H1N1)	.	.	.	G	.	.	F	T	T	.	G	.	R	.	.	.	
A/Taiwan/1/64 (H2N2)	T	R	.	K	.	
A/Hong_Kong/1_1/1968 (H3N2)	T	.	.	.	V	R	.	K	.	
A/Oregon/02/2016 (H3N2)	.	.	.	G	.	.	.	T	.	E	K	A	R	.	.	.	
A/swine/Minnesota/24/1975 (Classical)	.	R	E	
A/swine/Iowa/8548_1/98 (Triple)	N	R	.	D	.	S	.	E	
A/California/14/2009 (H1N1pdm09)	N	C	D	.	.	.	S	.	E	
A/swine/England/195852/1992 (Eurasian)	.	I	.	D	.	.	F	G	P	.	.	.	
A/Vietnam/CL01/2004 (avian)	.	.	D	D	.	L	.	.	.	N	.	.	E	.	.	.	

Рисунок 2 – Аминокислотные замены в белке NS1 штаммов ВГА человека и свиньи разных филогенетических линий (Васин и др., 2017)

С целью изучения роли NS1 методом обратной генетики получили 6:2 реассортантные ВГА, содержащие геномные сегменты PB2, PB1, PA, M, NP и NS вируса A/PR/8/34 (H1N1), и HA и NA вируса A/курица/Курган/5/05 (H5N1). Один из вирусов (wtNS1) содержал полноразмерную ОРС NS1, в другом вирусе (ΔNS1) исходная последовательность гена NS, состоящая из 890 нуклеотидов, была укорочена до 418 нуклеотидов, что, однако, не отражалось на способности данных вирусов образовывать мРНК, кодирующую белок NEP (Egorov *et al.*, 1998). Для моделирования гриппозной инфекции выбрали клеточную линию

карциномы легкого человека A549, так как эти клетки представляют собой пневмоциты II типа и содержат узнаваемые вирусом $\alpha 2,3$ -сиаловые рецепторы (Hidari *et al.*, 2013). Клетки заражали вирусами wtNS1 и Δ NS1 в дозе 1 MOI. Ростовые показатели вирусов на разных клеточных линиях приведены в таблице 1. Вирусную репликацию подтверждали методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени, оценку динамики синтеза NS1 в инфицированных клетках проводили методом иммуноблотинга с использованием МКА 5D2 к рекомбинантному N-концевому фрагменту белка NS1. В случае вируса wtNS1 наблюдали накопление NS1, начиная с 8 часов после заражения.

Одна из основных функций NS1 заключается в противостоянии IFN-опосредованному клеточному противовирусному ответу. Отсутствие экспрессии NS1 приводит к существенной потере вирусом такой способности (Ferko *et al.*, 2004) и, как следствие, повышению уровня экспрессии IFN и других цитокинов, блокирующих репликацию ВГА. С другой стороны, нарушение баланса в цитокиновом ответе может приводить к развитию «цитокинового шторма», вызывающего легочные осложнения (Liu *et al.*, 2016). В связи с этим на следующем этапе работы использовали метод ОТ-ПЦР для характеристики цитокинового профиля мРНК клеток A549, инфицированных вирусами wtNS1 и Δ NS1, через 8 и 24 часа после заражения. Провоспалительный цитокиновый ответ (на уровне транскрипции) клеток A549, зараженных вирусом Δ NS1, был более выраженным в сравнении с клетками, инфицированными вирусом wtNS1 (таблица 2). В случае штамма wtNS1 происходит NS1-опосредованное подавление активации провоспалительного ответа посредством супрессии транскрипции провоспалительных цитокинов TNF α и IL6 и запуск противовоспалительного IL4, препятствующего развитию Th1-опосредованного цитотоксического клеточного ответа.

Таблица 1 – Ростовые показатели рекомбинантных штаммов ВГА wtNS1 и Δ NS1 на культурах клеток

Штамм	Культура клеток	Титр вируса, lgТИД ₅₀ /мл
Δ NS1	Vero	7,72±0,25
	MDCK	4,50±0,17
	A549	2,5±0,25
wtNS1	Vero	7,89±0,19
	MDCK	7,39±0,10
	A549	3,5±0,25

Таблица 2 – Динамика уровня мРНК цитокинов в клетках A549 при инфицировании wtNS1 и Δ NS1 вирусами

	TNF α	IL6	IL4	IL18	IL1 β	IL12 β	IL10	IFN γ
A549	—	+	—	+	+	+	—	—
A549 + wtNS1	+↑	+↑	+	+↓	+↑	+↑	—	—
A549 + Δ NS1	++↑↑	++↑↑	—	+	+↑	+↑	—	—

Для детальной характеристики клеточных процессов, возникающих в клетках A549 при заражении вирусами wtNS1 и Δ NS1, был применен высокопроизводительный метод анализа экспрессии генов с использованием

микрочипов SurePrint G3 Human Gene Expression. В результате статистической обработки полученных данных выбрали гены, экспрессия которых изменилась более чем в 2 раза. Для клеток, зараженных вирусом Δ NS1, в эту категорию попал 321 ген, экспрессия которых возросла по сравнению с контролем, и 17 генов, экспрессия которых уменьшилась. Для вируса wtNS1 эти значения составили 255 и 32 гена, соответственно. При этом среди генов, экспрессия которых увеличилась, 66 относились только к вирусу wtNS1, 129 – к Δ NS1, а 193 увеличивали свою экспрессию в обоих случаях (рисунок 3). Полученные данные впоследствии были подтверждены с использованием метода NGS.

Анализ геной онтологии (GO) мРНК, уровень которых увеличился в ответ на вирусное заражение, проведенный в программе PANTHER Reactome, показал, что большая их часть принадлежала путям, задействованным в активации врожденного противовирусного

ответа. В случае заражения Δ NS1 вирусом активировалась экспрессия 129 генов. Среди них следует отметить гены *IFN β 1* и *IFN α* ; гены *IFN λ 1* (*IL29*), *IFN λ 2* (*IL28A*) и *IFN λ 3* (*IL28B*), играющие ключевую роль в противовирусной защите в эпителиальных тканях; гены *CXCL2*, *CXCL3* и *CXCL5* иммунорегуляторных и воспалительных хемокинов и их рецепторов; ген *MAP3K8* митоген-активируемой киназы, активирующей NF κ B, TNF α , IL2, IL8; ген *NFKB1A* ингибитора NF κ B α ; ген *PPP1R15A* регуляторной субъединицы 15 протеинфосфатазы 1; ген *ZFP3* одноименного фактора, участвующего в противовоспалительном ответе.

В случае wtNS1 вируса обнаружили увеличение уровня 63 мРНК. Согласно данным GO анализа выделяются гены, участвующие в регуляции опосредованного фактором теплового шока 1 (HSF1) ответа на тепловой шок, а именно *HSPA5* (*GRP78*), *HSPA1B* и *HSPA1A*, кодирующие члены 5, 1B и 1A семейства А белков теплового шока HSP70; *DNAJB1*, кодирующий член В1 семейства белков теплового шока HSP40; и *BAG3*, кодирующий ингибитор шапероновой активности HSP70/HSC70. Кроме того, обнаружили увеличение уровня транскриптов некодирующих РНК SNAR: G1, H, F, B2, G2, D и A3.

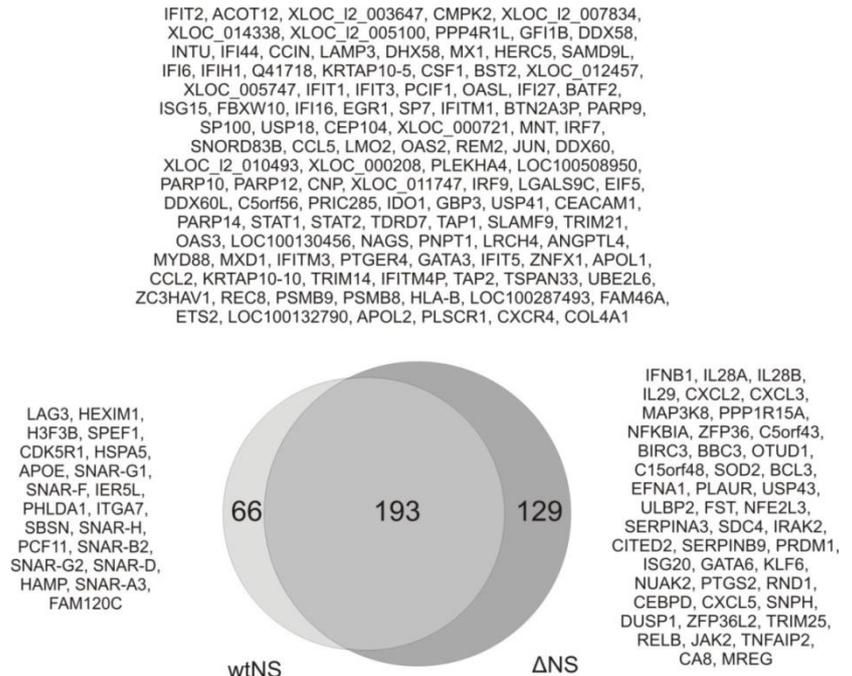


Рисунок 3 – Дифференциальная экспрессия генов клеток A549, инфицированных wtNS1 и Δ NS1 вирусами

уровень NP в клетках методом ИФА, во внеклеточной среде вирусные титры определяли реакцией гемагглютинации.

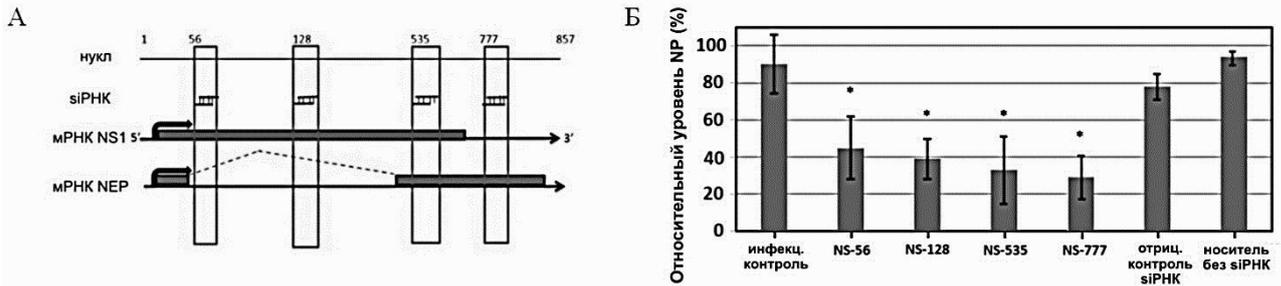


Рисунок 5 – Противовирусная активность анти-NS siРНК. А – схема расположения мишеней для siРНК в гене NS и мРНК NS1 и NP ВГА. Б – относительные уровни белка NP, определенные методом ИФА, в лизате инфицированных в дозе 0.01 MOI вирусом A/PR/8/34 (H1N1) клеток A549, обработанных анти-NS siРНК за 4 часа до заражения.

На диаграмме приведены стандартные отклонения для $n = 8$ (* $p < 0.01$)

Показали, что все исследуемые анти-NS siРНК обладают противовирусной активностью. По данным ИФА наибольшей эффективностью обладали NS-535 и NS-777, снижение уровня NP для них составило 38% и 32%, соответственно (рисунок 5). Препарат доставки и неспецифическая siРНК (отрицательный контроль siРНК) не влияли на уровень репликации ВГА. Согласно данным, полученным реакцией гемагглютинации, наибольшей ингибирующей активностью в отношении ВГА обладала siРНК NS-777. Именно ее и выбрали для дальнейших экспериментов.

Выбор носителя для доставки siРНК в клетки является ключевым в вопросе изучения их активности и дальнейшей перспективы практического применения. По результатам ранее проведенных сравнительных исследований эффективности доставки siРНК в клетки с использованием различных носителей (липофектамин, хитозан, полиэтиленимин) для упаковки siРНК выбрали гибридные микрокапсулы (SiO_2 -MC) (Петрова-Бродская и др., 2017). Было показано, что упакованные в SiO_2 -MC siРНК устойчивы к обработке РНКазами и эффективно доставляются в цитоплазму клеток. При этом, SiO_2 -MC не приводили к ультраструктурным повреждениям клеток, что свидетельствует об их низкой цитотоксичности.

Далее в клетках A549 тестировали противовирусную активность инкапсулированной siРНК NS-777. Клетки обрабатывали препаратом NS-777 и через 24 часа инфицировали вирусом A/PR/8/34 (H1N1) в дозе 0.05 MOI. Здесь и далее дозы заражения были выбраны так, чтобы вирус реплицировался в клетках и не вызывал значительного цитопатического действия, и было возможно наблюдать вирус-ингибирующее действие ингибитора NA озельтамивира, выбранного в качестве препарата сравнения. Через 72 часа после инфицирования в клетках определяли относительное содержание белка NP методом ИФА. Пустые и содержащие неспецифическую siРНК SiO_2 -MC использовали как отрицательный контроль. Озельтамивир в конечной концентрации 150 мкг/мл использовали как положительный контроль

противовирусной активности. Кроме того, в качестве положительного контроля использовали анти-РА siРНК, для которой ранее показали противовирусную активность в отношении ВГА (Timin *et al.*, 2017). Присутствие siРНК в клетках после трансфекции подтвердили методом ПЦР с помощью miRNA RT-qPCR Detection Kit. Методом ИФА было показано снижение на 80% относительного уровня NP в вирусном потомстве, что было сопоставимо с действием озельтамивира и анти-РА siРНК (рисунок 6). Снижение уровня NP наблюдали и с использованием метода вестерн-блотинга, полученные данные коррелировали с результатами ОТ-ПЦР анализа уровня экспрессии мРНК M1 (рисунок 6).

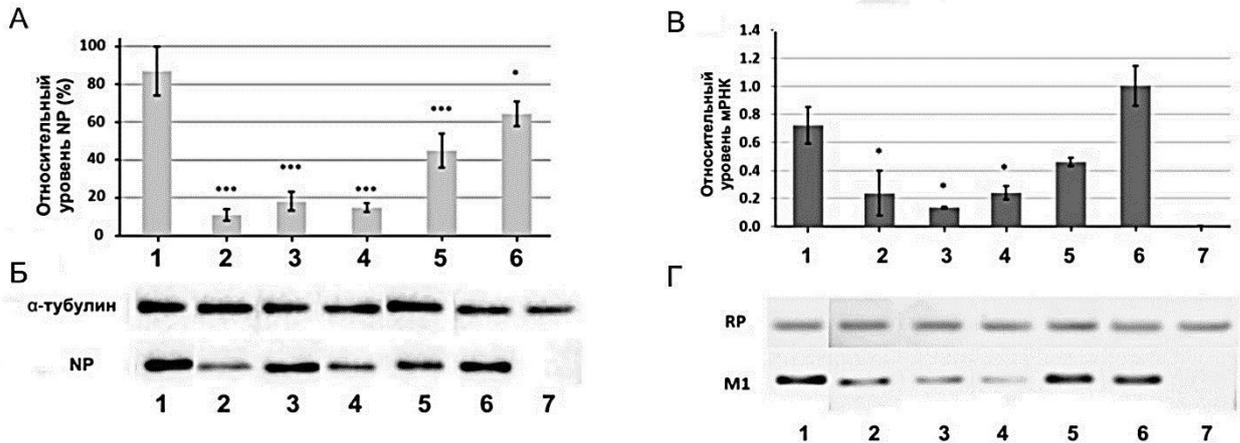


Рисунок 6 – Противовирусная активность препарата инкапсулированной NS-777 в инфицированных вирусом A/PR/8/34 (H1N1) клетках A549. А – относительный уровень NP, измеренный методом ИФА. Б – относительный уровень NP (нормализованный по уровню α -тубулина), определенный методом вестерн-блотинга. В – относительная экспрессия мРНК M1, определенная методом количественной ОТ-ПЦР.

Г – электрофоретическое разделение продуктов амплификации мРНК M1, нормализованных по гену РНКазы Р (*RP*). 1 – зараженные клетки, 2 – NS-777, 3 – анти-РА siРНК, 4 – озельтамивир, 5 – неспецифическая siРНК, 6 – SiO₂-MC, 7 – контрольные клетки. Измерения проводились в 8 повторах, * $p \leq 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$, вероятности рассчитаны с использованием непарного t-критерия Стьюдента

Исучаемые siРНК подбирали так, чтобы они были направлены на наиболее консервативные участки гена *NS* ВГА разных подтипов широкого круга хозяев. С целью изучения спектра субтиповой специфичности siРНК на клетках MDCK с использованием метода титрования вирусного потомства провели оценку эффективности NS-777 для штаммов ВГА подтипов H1N1, H1N1_{pdm09}, H7N9, H3N2 и H5N2. Показали, что инкапсулированная NS-777 обладает сильным и специфическим противовирусным эффектом в отношении всех изученных подтипов ВГА.

Таким образом, было показано, что инкапсулированная в SiO₂-MC siРНК NS-777 обладает сопоставимой с озельтамивиром противовирусной активностью *in vitro* в отношении ВГА разных подтипов. Использование siРНК для выключения экспрессии гена *NS* является перспективным подходом к разработке новых лекарственных средств для лечения ВГА инфекции.

Помимо вирусных генов мишенями для siРНК могут выступать клеточные белок- и РНК-кодирующие гены. Важную роль в сложной пространственной и временной регуляции активности генов играют miРНК, определяющие, в частности, качественный и количественный состав транскриптов и, соответственно, белков, необходимых для развития эффективного иммунного ответа на инфекционное воздействие. В связи с этим miРНК также могут рассматриваться как перспективные клеточные мишени для создания нового поколения противовирусных препаратов. Методом NGS на платформе MiSeq («Illumina», США) провели оценку изменений профиля экспрессии miРНК в клетках A549 в ответ на заражение рекомбинантными вирусами wtNS1 и ΔNS1. По результатам анализа выбрали 12 miРНК (let-7a, miR-210, miR-503, miR-1260b, miR-615, miR-940, miR-29c, miR-194, miR-24, miR-125b, miR-16, miR-6797) в качестве потенциальных мишеней для терапии ВГА инфекции. Далее методом ИФА провели скрининг противовирусной активности siРНК, являющихся компенсаторными по отношению к выбранным miРНК. siРНК доставляли в клетки с помощью липофектамина в количестве 0,1 фмоль на клетку. По результатам скрининга выбрали let-7a, miR-16, miR-24 и miR-194. miR-24 участвует в регуляции протеолитического расщепления НА ВГА H5N1, необходимого для образования инфекционно активного вириона (Loveday *et al.*, 2015). let-7a является участником сложных каскадных процессов регуляции клеточного цикла и апоптоза, что может быть так или иначе ассоциировано с развитием вирусной инфекции (Steinbacher&Landry, 2014). Интерес представляет miR-16, для которой были продемонстрированы снижение при заражении ВГА H1N1 и H7N7 и вовлеченность в клеточные пути сигналинга врожденного иммунитета (Loveday *et al.*, 2015). miR-194, уровень которой снижается при заражении пандемическими ВГА, имеет валидированную мишень – ген *KPNA1*, кодирующий субъединицу импортина α , отвечающего за транспорт в ядро вирусных белков PB1 и NP (Loveday *et al.*, 2015).

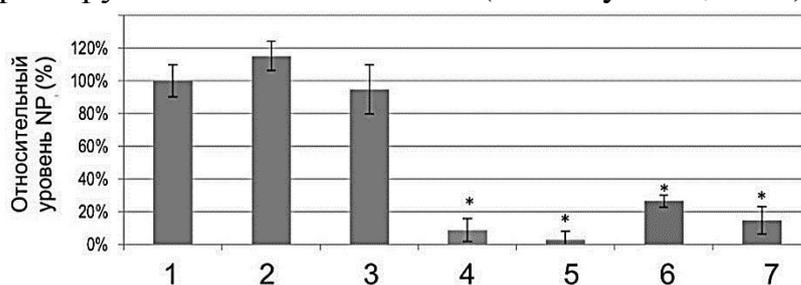


Рисунок 7 – Противовирусное действие коктейля синтетических siРНК, компенсирующих действие клеточных miРНК let-7a, miR-16, miR-24 и miR-194, доставляемых в клетку гибридными микрокапсулами. Препарат введен в клетки A549 за 24 часа до заражения вирусом A/PR/8/34 (H1N1) в дозе 0.01 MOI. 1 – зараженные клетки, 2 – SiO₂-МС, 3 – бессмысловая siРНК, 4 – коктейль компенсаторных miРНК, 5 – коктейль анти-РА, анти-NP и анти-NS siРНК, 6 – озельтамивир, 7 – контрольные клетки.

Измерения проводились в 8 повторях, * $p < 0.005$, вероятности рассчитаны с использованием непарного t-критерия Стьюдента

Как и в случае анти-NS siРНК для доставки компенсаторных siРНК далее использовали SiO₂-МС. Противовирусную активность оценивали на клетках А549, инфицированных вирусом А/PR/8/34 (H1N1). Использовали комбинацию из четырех инкапсулированных siРНК, компенсирующих действие let-7a, miR-16, miR-24 и miR-194, которую доставляли в клетки за 24 часа до заражения. Было продемонстрировано статистически значимое снижение уровня NP на 90% в инфицированных клетках через 72 часа после заражения по сравнению с инфекционным контролем и действием неспецифической siРНК (рисунок 7). Противовирусный эффект компенсаторных siРНК был сопоставим с эффектом комбинации противовирусных siРНК, направленных на ингибирование генов PA, NP и NS ВГА, и в среднем превышал противовирусное действие озельтамивира.

Таким образом, в результате выполнения данной части работы для эффективного подавления репродукции ВГА *in vitro* мы успешно использовали инкапсулированные синтетические siРНК, компенсирующие действие клеточных miРНК.

3. ПДИ – клеточная мишень для противовирусной терапии. 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазины – ингибиторы ПДИ?

Методом анализа экспрессии генов показали, что ОРС NS1 гена NS ВГА отвечает за увеличение числа мРНК, кодирующих белки теплового шока, регулирующие корректный фолдинг вирусных и клеточных белков. К этой группе белков также относится ПДИ – оксидоредуктаза надсемейства тиоредоксинов, проявляющая в люмене эндоплазматического ретикулума активность оксидазы для формирования дисульфидных связей в насцентных секретиреуемых белках (рисунок 8). По данным литературы ингибирование ферментативной активности ПДИ приводит к противовирусному эффекту в отношении ряда вирусов (Diwaker *et al.*, 2013, 2015).

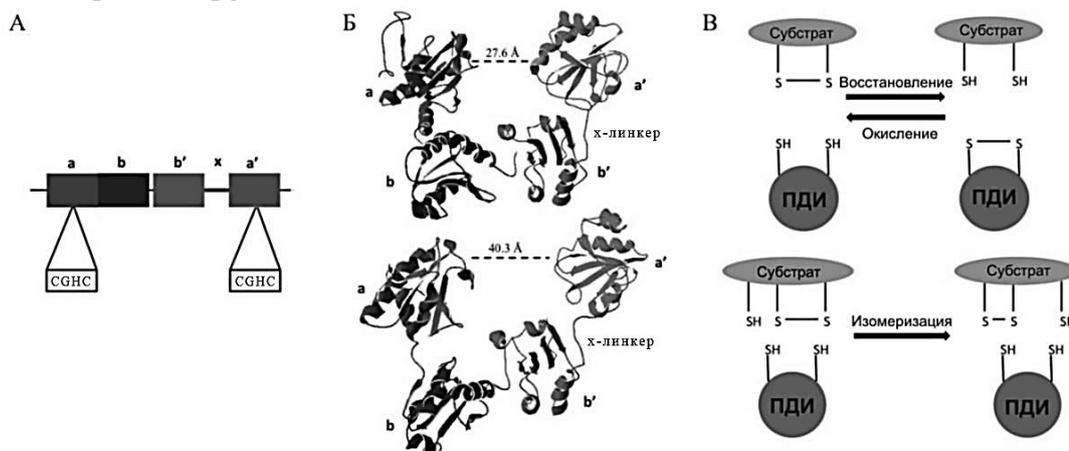
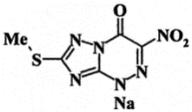
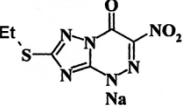
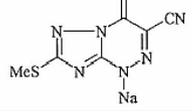


Рисунок 8 – Структура ПДИ, кодируемой геном *P4HB* человека (Ali Khan&Mutus, 2014). А – линейная карта ПДИ. Белок состоит из 4 доменов (a, a', b, b'), домены b' и a' соединены x-линкером, домены a и a' содержат в активном центре мотив CGHC. Б – пространственная модель ПДИ. Показаны окисленная (верх) и восстановленная (низ) формы белка. В – схема ферментативной активности ПДИ

В процессе поиска потенциальных ингибиторов ПДИ обратили внимание на соединения ряда 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов, для которых была показана противовирусная активность в отношении ВГА и некоторых других вирусов, но механизм действия оставался неизвестным (Karpenko *et al.*, 2010). Ранее в силу структуры этих соединений было высказано предположение, что они могут обладать окислительной способностью в отношении цистеинов в белках, в частности, поверхностном НА ВГА (Артемьев *и др.*, 2016). Для оценки окислительной способности 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов использовали их производные, отличающиеся составом боковых групп (таблица 3).

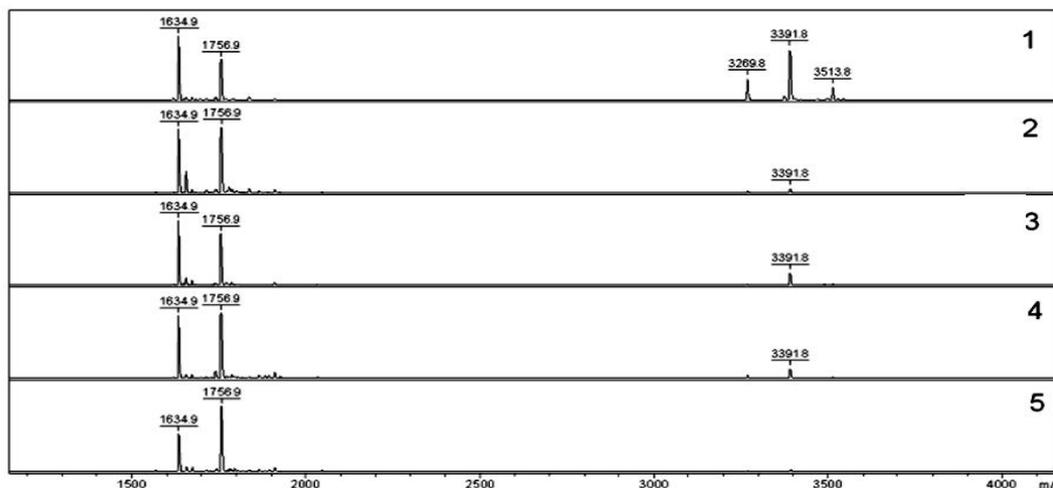
Таблица 3 – Обозначения, структура и характеристики соединений ряда 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов

Наименование соединения	Структура	m/z	Относительная скорость окисления	
			PI	PII
натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрат		227.00	10	10
натриевая соль 2-этилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрат		241.01	4	3
натриевая соль 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, тригидрат		284	1	1

Для изучения взаимодействия 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов с белками в качестве возможных мишеней использовали цистеин-содержащие пептиды LCKLGGIAPLHLGKCN-amid (PI) и LCDLNGVKPLILRDCS-amid (PII), являющиеся фрагментами НА двух штаммов ВГА подтипов H1N1 и H5N1. Методом масс-спектрометрии показали, что под действием нитро- и циано-групп, присутствующих в 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов, в этих пептидах происходит образование внутримолекулярных и межмолекулярных дисульфидных связей. Наибольшей окислительной способностью обладает натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата, а наименьшей – натриевая соль 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, тригидрата (рисунок 9). Отметим, что этот порядок сохраняется для обоих пептидов, однако окисленной (дисульфидной) формы пептида PI образуется примерно в 2 раза больше, чем пептида PII. Эту особенность можно объяснить тем, что образование дисульфидных связей зависит от микроокружения вблизи цистеинов. При наличии высокой гомологии в последовательностях скорость окисления выше именно в том случае, когда вблизи обоих цистеинов присутствуют остатки основных

аминокислот, как в пептиде РІ. Соответственно этому, обратный эффект имеет место при наличии вблизи цистеина остатков отрицательно заряженных аминокислот, как в пептиде РІІ.

А



Б

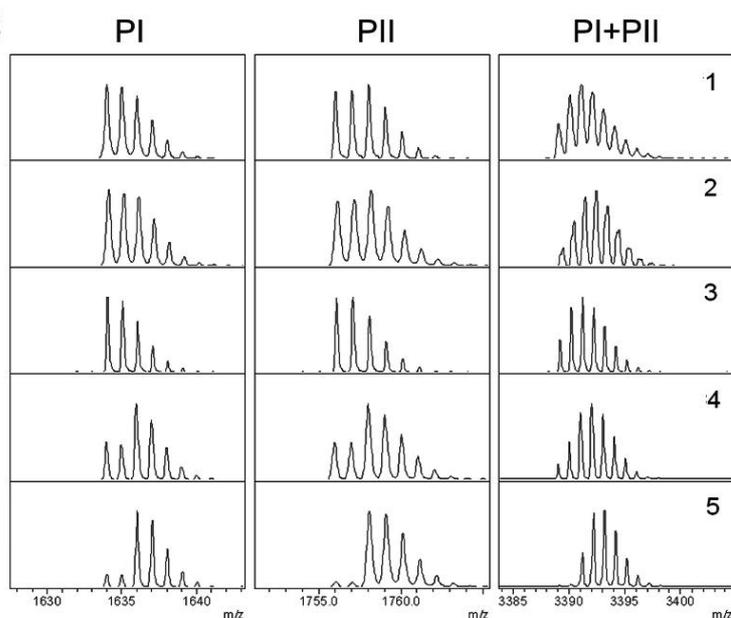


Рисунок 9 – Окисление смеси цистеин-содержащих пептидов РІ и РІІ. Представлены MALDI-MS спектры реакционных масс, полученных при взаимодействии пептидов РІ и РІІ с окислителями через 70 мин инкубации при 37°C (А), и фрагменты спектров, характеризующие образование дисульфидных связей (Б). В каждой реакционной смеси для контроля окисления присутствовало по 0,12 мМ пептидов РІ и РІІ, к которым добавляли 2 мМ SeO₂ (1), 9 мМ натриевой соли 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата (2), 0,6 мМ H₂O₂ (3). В качестве контроля использована смесь пептидов без добавления окислителей в буфере (4) и в растворе с 2% ТФУ (5) для предотвращения процессов окисления

Далее изучили окислительную способность 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов в отношении цистеин-содержащих пептидов APWCGHCKA и APWCGHCKQ из активных центров ПДИ, содержащих мотивы C₅₃GHC₅₆ и

$C_{397}GHC_{400}$, соответственно. Полученные данные свидетельствуют о том, что натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата ускоряет окисление цистеинов пептида APWCGHCKA в 2 раза и пептида APWCGHCKQ в 5 раз. Характерное время окисления цистеинов пептида APWCGHCKA под действием натриевой соли 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, тригидрата было примерно в два раза больше, чем в случае натриевой соли 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата. При этом на окисление цистеинов пептида APWCGHCKQ натриевая соль 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, тригидрата влияния не оказала.

Таким образом, продемонстрировали, что 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазины способны стимулировать окисление цистеинов в пептидной модели ферментативных центров ПДИ. Их окислительная способность отличается в зависимости от структуры самих соединений. Такая активность 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов может влиять на активность ПДИ, которая обеспечивает стабильную пространственную конформацию белков, в том числе вирусных, активно экспрессирующихся в инфицированных клетках.

Для выяснения потенциального механизма влияния 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов на ферментативную активность ПДИ была использована процедура докинга с применением программы ICM-Pro. Докирование проводилось на поверхность ПДИ в области двух активных центров. По результатам докинга отобрали комплексы с наилучшей энергией связывания для последующего анализа геометрии расположения лигандов на поверхности мишени и оценки величины отдельных вкладов в энергию связывания. Наибольшее сродство к мишени в области активного центра $C_{53}GHC_{56}$ проявляют нитропроизводные триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов. В случае нитрогруппы выше вклад водородных связей в энергию связывания и кулоновский вклад в разы превышает ван-дер-ваальсовы взаимодействия. Это можно объяснить геометрией расположения лигандов на поверхности мишени, а также характером распределений гидрофобного и электростатического потенциала на ней (рисунок 10). Полученные результаты указывают на то, что кулоновское взаимодействие при формировании комплекса в районе активного центра $C_{53}GHC_{56}$ формируется в основном за счет взаимодействия с положительно заряженными боковой группой H_{55} , водородами полярных аминогрупп остова из H_{55} , C_{53} и G_{54} , и тиоловой группой C_{53} . Амино- и тиоловая группы выступают как доноры водородной связи.

Как и при взаимодействии с активным центром $C_{53}GHC_{56}$ в области второго активного центра $C_{397}GHC_{400}$ для нитропроизводных 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов характерна значительная энергия связывания. При этом натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата сильнее взаимодействует с активным центром $C_{397}GHC_{400}$, чем натриевая соль 2-этилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата.

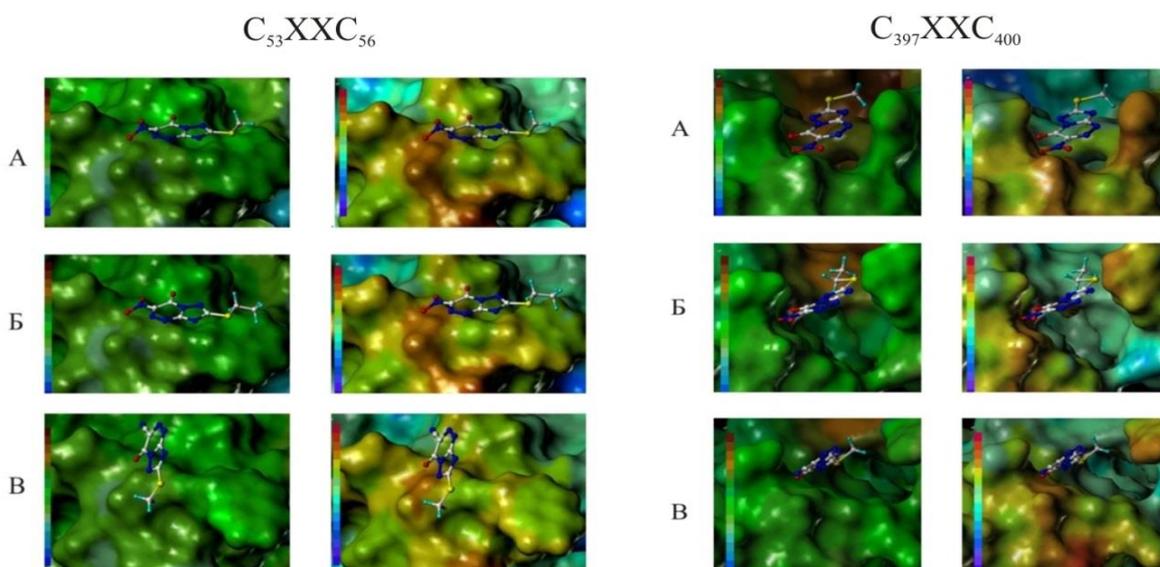


Рисунок 10 – Распределение гидрофобного (слева) и электростатического (справа) потенциала в районе локализации лучшей по энергии конформации на поверхности ПДИ в области активных центров $C_{53}GHC_{56}$ и $C_{397}GHC_{400}$.

А – натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрат, Б – натриевая соль 2-этилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрат, В – натриевая соль 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, тригидрат. Частичные заряды на атомах посчитаны с помощью метода Гайстагера-Хюккеля. Слева на каждом рисунке дана шкала: у гидрофобного потенциала цвет меняется от минимального значения (синего) до максимального (темно-коричневого), у электростатического – от отрицательного заряда (синего) к положительному (красному)

В отличие от активного центра $C_{53}GHC_{56}$ при связывании с активным центром $C_{397}GHC_{400}$ для анализируемых лигандов ван-дер-ваальсов вклад в энергию связывания превышает кулоновский. Это объясняется тем, что площадь соприкосновения с поверхностью мишени увеличилась по сравнению с ранее рассмотренным случаем (рисунок 10). Вклад водородных связей в энергию связывания, как и в случае взаимодействия с активным центром $C_{53}GHC_{56}$, у нитропроизводных 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов значительно выше по причинам, описанным ранее. Анализ полученной в результате докинга геометрии локализации лигандов показывает, что основной вклад во взаимодействие активного центра $C_{397}GHC_{400}$ с лигандами вносят аминокислотные остатки R_{300} , F_{304} , C_{397} , G_{398} и H_{399} . Донорами водородных связей выступают полярные группы R_{300} , C_{397} , G_{398} и H_{399} .

Тот факт, что нитропроизводные 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов, взаимодействуя с ПДИ в области активных центров, оказываются в непосредственной близости от цистеинов, позволяет предположить их участие в окислении последних с образованием дисульфидной связи.

Далее провели экспериментальную оценку способности 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов ингибировать ферментативную активность

ПДИ. В работе помимо исследуемых соединений 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов использовали содержащий замкнутые дисульфидные связи циклический пептид CYIQNC, для которого известна способность ингибировать ПДИ. Оценку влияния соединений на ферментативную активность ПДИ проводили *in vitro* с использованием набора PDI Inhibitor Screening Assay Kit. В эксперименте использовали препараты в диапазоне концентраций 0-100 мМ. При этом, если ингибирование происходит, то достоверно оно выявляется в молярной концентрации от нескольких мМ ингибирующего вещества и выше. Результаты анализа ингибирующей активности соединений представлены на рисунке 11.

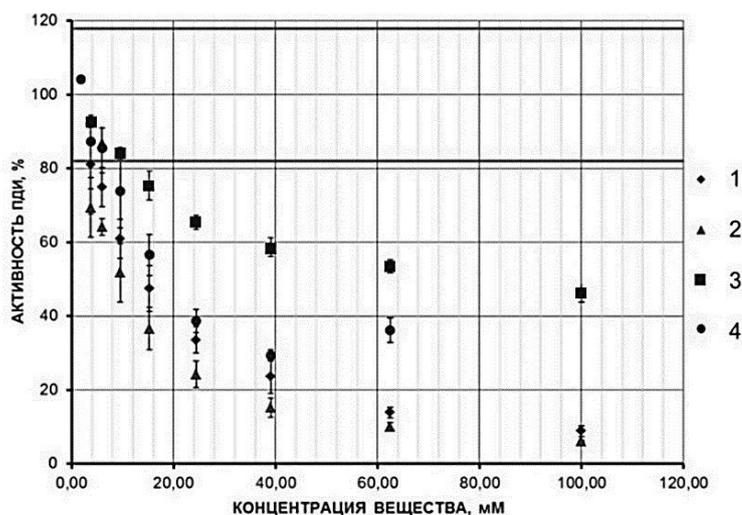


Рисунок 11 – Оценка влияния триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов на ферментативную активность ПДИ. По оси абсцисс – концентрации исследуемых веществ, по оси ординат – ферментативная активность ПДИ, определяемая по флуоресценции детектирующего реагента. Темными горизонтальными линиями ограничен диапазон колебаний величины флуоресценции, соответствующей активности ПДИ в отсутствие ингибитора.

1 – натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата; 2 – натриевая соль 2-этилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата; 3 – натриевая соль 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, тригидрат; 4 – циклический пептид CYIQNC

Все исследуемые производные триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов обладают способностью ингибировать ферментативную активность ПДИ *in vitro*. Наибольшей активностью обладают нитропроизводные 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов, которые в минимальной концентрации 3,7 мМ ингибируют активность ПДИ на 20-30%. При 100 мМ концентрации этих соединений ферментативная активность ПДИ практически отсутствует и составляет менее 10% от исходной. Натриевая соль 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, тригидрат обладает наименьшей ингибирующей активностью. При 100 мМ концентрации это соединение ингибирует около 50% от изначальной активности ПДИ. Пептид CYIQNC при концентрациях до

40 нМ ингибировал активность ПДИ на уровне, сопоставимом с нитропроизводными 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов, однако при больших концентрациях его ингибирующая активность снижалась. Таким образом, показали, что исследуемые триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазины способны ингибировать ферментативную активность ПДИ в используемом тесте *in vitro*. Наибольшей ингибирующей активностью обладают нитропроизводные триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов в концентрациях 3-100 мМ.

По причине отсутствия возможности оценить ферментативную активность ПДИ на клеточной культуре и/или *in vivo* далее провели оценку изменения экспрессии ПДИ в клетках А549 методом ПЦР под действием 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов. Показали, что уровень мРНК ПДИ остается неизменным под воздействием 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов как в контрольных, так и инфицированных ВГА клетках, независимо от целостности ОРС NS1. Полученные данные позволяют предположить, что 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазины проявляют свое действие на уровне ферментативной активности ПДИ, но при этом не вызывают изменения экспрессии гена на уровне мРНК ПДИ.

Ранее было показано, что 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазины обладают противовирусной активностью в отношении ВГА *in vivo*, при этом они проявляют чрезвычайно слабую противовирусную активность *in vitro* (Артемов *и др.*, 2016). По этой причине было решено апробировать 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазины на противовирусную активность в отношении вирусов, в жизненном цикле которых ПДИ играет более важную роль, чем в случае ВГА. Известно, что ПДИ задействована в жизненном цикле вируса Денге, будучи локализованной на поверхности клеток-мишеней и взаимодействуя с вирусным белком NS1 (Diwaker *et al.*, 2015). В связи с этим оценили противовирусную активность натриевой соли 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, тригидрата в отношении вируса Денге. Работа была выполнена в ФГБУ «ГНИИИ ВМ» Минобороны России. Многократное пероральное введение препарата экспериментальным животным через 4, 24 и 48 часов после заражения способствовало существенному повышению устойчивости экспериментальных животных к вирусу Денге. При инфицировании животных вирусом в дозе 5 ЛД₅₀ уровень защиты в зависимости от схемы введения препарата составил 70-90%. С увеличением заражающей дозы возбудителя до 50 ЛД₅₀ эффективность препарата падала. Таким образом, на примере вируса Денге продемонстрировали, что применение 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов может оказывать противовирусное действие *in vivo*. Можно предположить наличие связи между окислительной способностью 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов в отношении ПДИ, ролью ПДИ в жизненном цикле вируса и наблюдаемой противовирусной активностью. Вместе с тем, оценка противовирусной активности 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов в отношении разных групп вирусов требует дальнейшего подробного изучения.

4. Применение технологии олигонуклеотидных микрочипов для диагностики гриппа

Тест-система «IAVchip» представляет собой биочип, на котором иммобилизованы олигонуклеотидные зонды, позволяющие определять все известные подтипы ВГА человека и животных (рисунок 12). При подборе зондов для типирования ВГА в качестве мишеней использовали гены *M* и *NP*, для субтипирования – *HA* и *NA*. В отличие от большинства ранее предложенных подходов для субтипирования ВГА с помощью биологических микрочипов, в которых применялись специфические для каждого гена пары праймеров, мы использовали флуоресцентное мечение вирусных РНК в процессе амплификации геномных сегментов РНК с помощью универсальных для всех подтипов ВГА праймеров методом одностадийной ОТ-ПЦР.

Известно, что 3'- и 5'-концевые последовательности всех восьми сегментов геномной РНК ВГА образуют гомологичные неидеальные инвертированные повторы (Gulyaev *et al.*, 2010). Использование универсальных MBTuni праймеров, комплементарных этим участкам, обеспечивает полноразмерную амплификацию всех геномных сегментов ВГА в одной реакции (рисунок 13). Условия проведения одностадийной мультисегментной ОТ-ПЦР с универсальными MBTuni праймерами, описанными в работе (Zhou *et al.*, 2009), экспериментально адаптировали для использования флуоресцентно меченых дезоксирибонуклеозидтрифосфатов Cy5-dСТР.

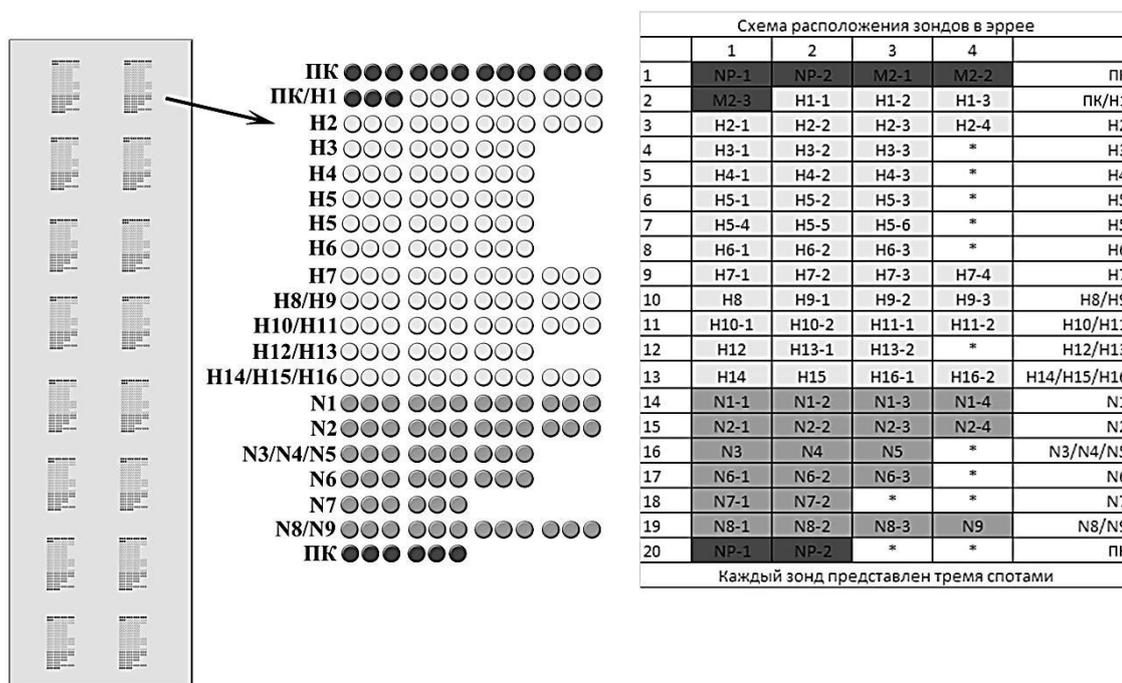


Рисунок 12 – Схема биочипа «IAVchip» для субтипирования ВГА. Зонды нанесены на альдегидный субстрат методом контактной печати. Н – гемагглютинин, N – нейраминидаза, ПК – положительный контроль. Диаметр спота – 200 мкм

Проверку реакции амплификации проводили с использованием штаммов ВГА wtNS1 (см. п. 1), А/Moscow/10/99 (H3N2) и А/New Caledonia/10/99 (H1N1). Эффективность встраивания Су5-dСТР в процессе амплификации проверяли методом электрофоретического разделения в 1% агарозном геле с последующей детекцией Су5-меченых продуктов при помощи KODAK Image station 2000R. Флуоресцентное мечение коротких геномных сегментов ВГА проходило более эффективно, чем длинных, однако неравномерность амплификации не оказала значимого влияния на процесс гибридизации флуоресцентно меченых кДНК с микрочипом.

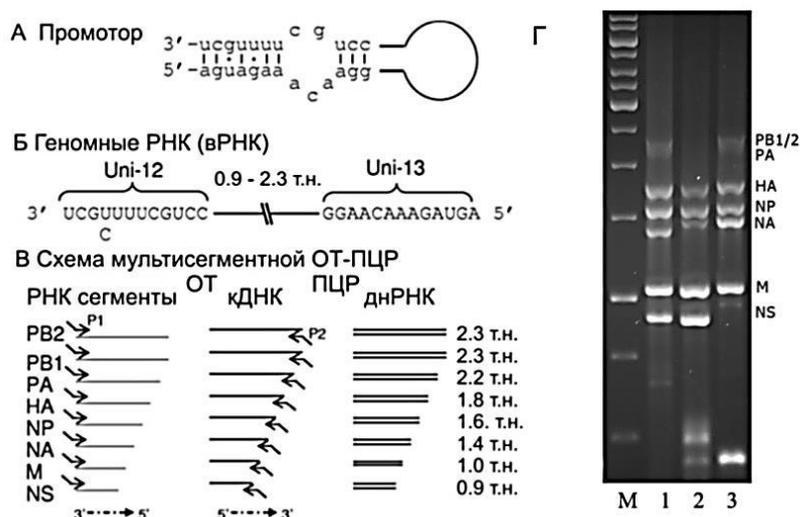


Рисунок 13 – Флуоресцентное мечение кДНК ВГА в процессе одностадийной полноразмерной амплификации геномных сегментов ВГА с использованием универсальных праймеров (МВТuni), комплементарных концевым участкам геномных сегментов (Uni-12 и Uni-13). А – структура консервативных участков Uni-12 и Uni-13, образующих промотор. Б – нуклеотидные последовательности участков Uni-12 и Uni-13. В – схема комплементарного спаривания прямого и обратного МВТuni праймеров с геномными сегментами ВГА; указаны длины получаемых ампликонов. Г – электрофоретическое разделение ОТ-ПЦР продуктов, полученных с помощью МВТuni праймеров на матрицах тотальной РНК, выделенной из штаммов wtNS1 (1), А/Moscow/10/99 (H3N2) (2) и А/New Caledonia/10/99 (H1N1) (3). М – маркер

На следующем этапе проверили специфичность тест-системы «IAVchip» с ВГА-содержащими пробами, охарактеризованными на наличие вируса методами ОТ-ПЦР и ИФА. Всего отобрали 50 штаммов ВГА человека и животных, принадлежащих к 14 разным подтипам. Для большинства образцов достоверно значимый уровень флуоресценции после проведения гибридизационного анализа с флуоресцентно мечеными пробами ВГА наблюдали только для точек, относящихся к соответствующим подтипам ВГА, тогда как величины интенсивности флуоресценции для всех остальных точек находились на значительно меньшем уровне или были сопоставимы с погрешностью. На рисунке 14 представлены результаты анализа для выборки из 12 штаммов разных подтипов ВГА.

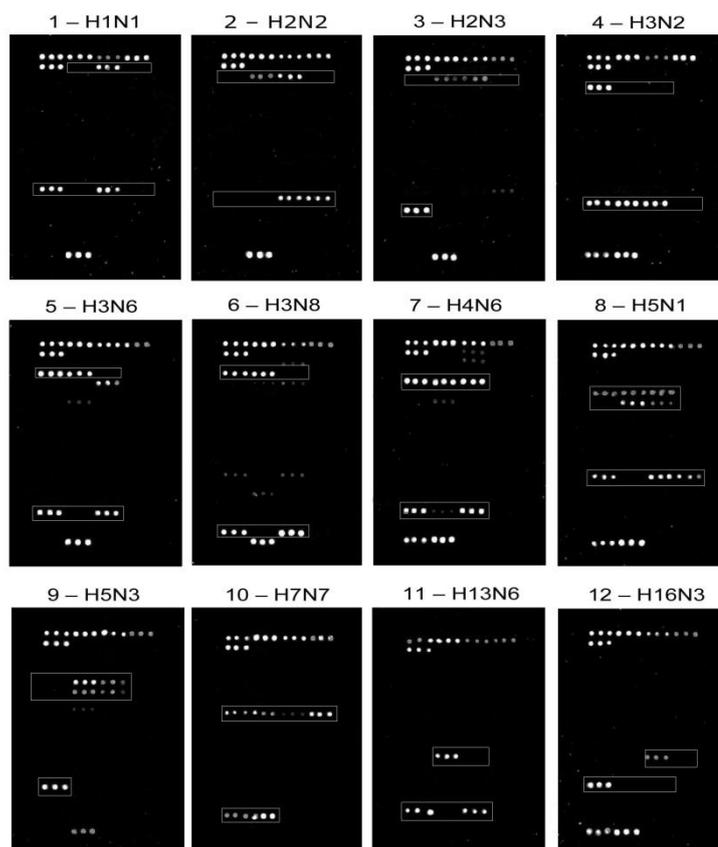


Рисунок 14 – Результаты сканирования микрочипов «IAVchip» после проведения гибридационного анализа флуоресцентно меченых проб, полученных из штаммов различных подтипов ВГА. (1) А/утка/Альберта/35/76 (H1N1), (2) А/серебристая чайка/Атырау/2186/07 (H2N2), (3) А/утка/Германия/215/73 (H2N3), (4) А/Самара/68/08 (H3N2), (5) А/чирок-трескунок/Коргалжын/865/04 (H3N6), (6) А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8), (7) А/утка/Чехословакия/56 (H4N6), (8) А/домашний гусь/Павлодар/1/05 (H5N1), (9) А/крачка/ЮА/59 (H5N3), (10) А/Алматы/331/06 (H7N7), (11) А/черноголовый хохотун/Атырау/284/02 (H13N6), (12) А/серебристая чайка/Атырау/2216/07 (H16N3)

Разработанная тест-система позволила однозначно субтипировать 59 из 64 исследованных образцов ВГА, принадлежащих 14 подтипам. Проведенная в РГП «НИИ проблем биологической безопасности» КН МОН РК апробация микрочипа «IAVchip» на 185 вирус-содержащих образцах человека, животных и птиц показала его более высокую диагностическую эффективность и чувствительность (99.45% и 100%) в ранней идентификации ВГА в сравнении с ПЦР в режиме реального времени (98.38% и 97.96%) и ОТ-ПЦР (96.22% и 95.95%) в пределах оцененных доверительных интервалов (Sultankulova *et al.*, 2014). Таким образом, тест-система «IAVchip» сопоставима с методами ПЦР по чувствительности и эффективности и позволяет проводить одновременную детекцию и субтипирование ВГА в десятках образцов в одном эксперименте в течение 8–10 часов.

Примененные при разработке тест-системы «IAVchip» методические подходы (Klotchenko *et al.*, 2012; Sultankulova *et al.*, 2014; Vasin *et al.*, 2014), были использованы при создании микрочипа для анализа экспрессии мРНК

цитокинов (рисунок 15). Все стадии разработки подробно представлены в работе (Плотникова, 2014). В отличие от тест-системы «IAVchip» в биочипе для анализа экспрессии цитокинов флуоресцентно меченую кДНК для гибридизации получали методом ОТ-ПЦР со специфическими для мРНК каждого цитокина праймерами. Метод апробировали для анализа экспрессии цитокинов в клетках A549, инфицированных вирусом A/California/07/09 (H1N1_{pdm09}) в дозе 1 MOI (Плотникова *и др.*, 2013). Заражение клеток A549 вирусом приводило к активации транскрипции генов *IL4*, *IL10* и *TNFA* (рисунок 15). Интересно, что, несмотря на обнаружение в клетках мРНК этих цитокинов на всех сроках после заражения, во внеклеточной среде методом ИФА обнаружили только секретируемый TNF α . Возможно, это связано с тем, что происходит блокирование трансляции и/или секреции IL4 и IL10.

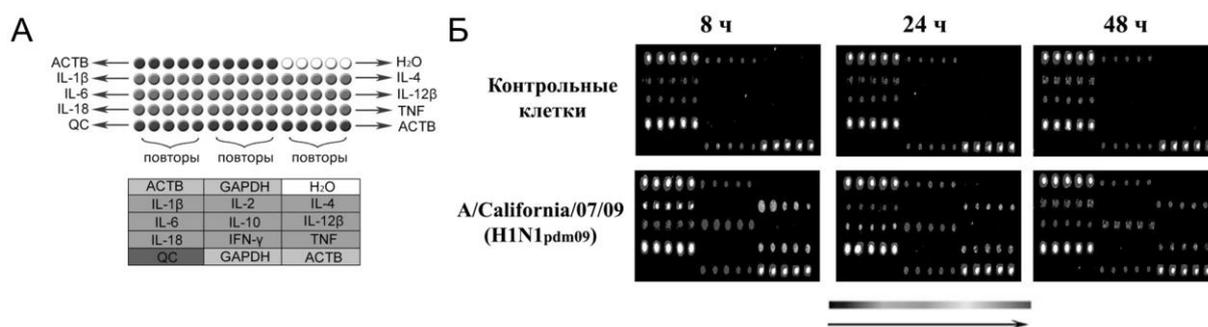


Рисунок 15 – Олигонуклеотидный микрочип для анализа уровня мРНК цитокинов IL1 β , IL2, IL4, IL6, IL10, IL12 β , IL18, IFN γ и TNF α человека (Плотникова *et al.*, 2011).

А – схема лабораторного образца биочипа. ACTB и GAPDH – гены «домашнего хозяйства». Б – продукция мРНК цитокинов в контрольных и инфицированных вирусом A/California/07/09 (H1N1_{pdm09}) клетках A549 через 8, 24 и 48 часов после заражения

Недостатком примененного способа получения флуоресцентно меченой пробы является необходимость проведения индивидуальной ПЦР для каждого цитокина и невозможность проведения количественного анализа. Первую проблему можно решить, используя мПЦР. В связи с этим для анализируемых цитокинов было решено разработать количественную мПЦР в режиме реального времени.

мПЦР тест-система состоит из трех наборов реакций, каждый из которых позволяет количественно выявлять три мРНК цитокинов-мишеней и одну мРНК эндогенного контроля (Plotnikova *et al.*, 2016). Для нормализации уровней экспрессии мРНК цитокинов в качестве эндогенного контроля использовали ген *GAPDH*. Разработанная мПЦР тест-система позволила получать стабильные воспроизводимые результаты по количественной оценке мРНК цитокинов и удовлетворяла всем необходимым требованиям для проведения анализа уровней экспрессии с использованием $\Delta\Delta C_t$ метода (Plotnikova *et al.*, 2016). Тест-систему апробировали на клетках A549, инфицированных вирусом A/California/07/09 (H1N1_{pdm09}), а также вирусами wtNS1 и Δ NS1 (см. п. 1).

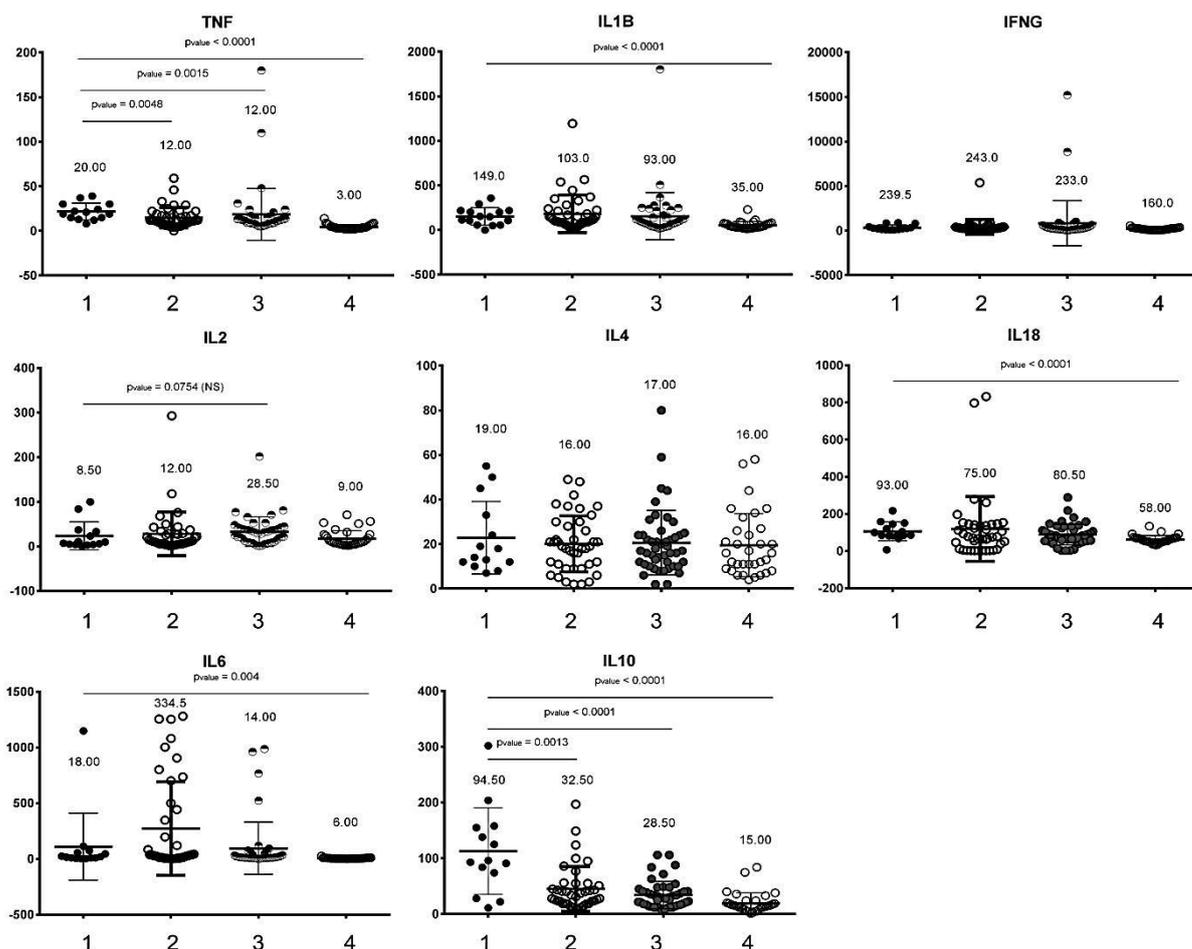


Рисунок 16 – Уровень мРНК цитокинов TNF α , IL1 β , IFN γ , IL2, IL4, IL18, IL6 и IL10 у пациентов с лабораторно подтвержденным гриппом А (1); с лабораторно подтвержденной ОРВИ (кроме гриппа А) (2); с ОРЗ, у которых вирус не выявлен (3); и здоровых доноров (4). При сравнении использовали U-критерий Манна – Уитни, различия считали статистически значимыми при величине $p < 0.05$

Далее в рамках утвержденного Минздравом России Протокола «Клиническая апробация диагностической тест-системы для оценки потенциала патогенности вирусов гриппа и ОРВИ по цитокиновому профилю, прогноза развития тяжелых и осложненных форм инфекции» провели клиническую апробацию мПЦР тест-системы. Исследование проводилось в период эпидемического подъема заболеваемости ОРВИ в 2016-2017 гг. на биологических образцах, полученных от 136 доноров, 103 из которых были пациентами с клиническими проявлениями ОРВИ. Идентификацию возбудителя проводили методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени с использованием наборов на ОРВИ/грипп производства «Амплисенс». Забор крови проводили на 3–4 и 7–8 дни от начала заболевания. Пациентов распределили по 4 группам: с лабораторно подтвержденным гриппом А, с лабораторно подтвержденной ОРВИ (кроме гриппа А), с острым респираторным заболеванием (ОРЗ), вирусная этиология которой не была подтверждена, и здоровых доноров. Показали, что на 3–4 день после начала болезни у ВГА-инфицированных пациентов экспрессия мРНК цитокинов TNF α , IL1 β , IL18, IL6 и IL10 в лейкоцитах была повышена по сравнению с

группой здоровых добровольцев (рисунок 16). В случае IL2, IL4 и IFN γ изменения уровней мРНК у пациентов были статистически незначимыми и мало отличались от значений, измеренных в группе здоровых добровольцев.

Кроме того, попарное сравнение показало, что уровни мРНК IL10 и TNF α у ВГА-инфицированных пациентов были значимо выше, чем в группах пациентов с ОРВИ негриппозной этиологии и ОРЗ. Также с использованием критерия Вилкоксона было проведено сравнение уровней экспрессии мРНК цитокинов в парных точках, взятых от ВГА-инфицированных пациентов на 3–4 и 7–8 дни после начала болезни. Наблюдали значимое снижение уровней мРНК IL1 β , IL10 и TNF α к 7–8 дню болезни.

В заключение стоит отметить, что цитокиновый баланс при любом инфекционном процессе имеет ключевое значение, предопределяющее течение и исход заболевания. Детальное исследование взаимосвязи потенциала патогенности возбудителей ОРВИ и их способности стимулировать экспрессию цитокинов на уровне белка и мРНК является перспективным направлением для поиска воспалительных маркеров, позволяющих прогнозировать исход заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современный подход к разработке противовирусных лекарственных средств заключается в поиске новых соединений широкого спектра действия и соединений, направленных на нарушение интерфейса вирус/клетка-хозяин. С этой точки зрения для ВГА одной из наиболее перспективных мишеней является многофункциональный неструктурный белок NS1 (Васин *и др.*, 2017). Для дизайна лекарственных препаратов, направленных на NS1, в работе использовали два подхода. В первом случае блокировали экспрессию гена NS с помощью siРНК, инкапсулированных в гибридные микрокапсулы, которые обеспечивают их целостность и эффективную внутриклеточную доставку (Timin *et al.*, 2017; Бродская *и др.*, 2017). Во втором случае в качестве мишени рассматривали не сам белок NS1, а связанные с его функционированием клеточные факторы, необходимые для вирусной репликации. При таком подходе мишенями для siРНК могут быть клеточные мРНК, а также некодирующие miРНК и lncРНК (Горшков *и др.*, 2017). Определили, что при ВГА инфекции снижается уровень miРНК let-7a, miR-16, miR-24 и miR-194, и синтезировали для них компенсаторные синтетические siРНК. Показали, что инкапсулированные анти-NS siРНК и siРНК, компенсирующие снижение уровня клеточных miРНК, обладают эффективным противовирусным действием в отношении ВГА разных подтипов *in vitro*.

Еще одной перспективной клеточной мишенью для противовирусных лекарственных препаратов является ПДИ. Показали, что 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазины обладают способностью взаимодействовать с цистеинами в СГНС активных центрах ПДИ и способны вызывать их окисление, приводящее к образованию дисульфидных связей. При этом окислительная

способность производных 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов отличается в зависимости от состава боковых групп. Результаты молекулярного докинга 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов с активными центрами ПДИ и экспериментов по оценке их влияния на ферментативную активность ПДИ *in vitro* показали, что они согласуются с данными по окислительной способности. Способность 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов оказывать влияние на функционирование активных центров ПДИ позволяет предположить наличие у этих соединений широкого спектра противовирусной активности, который будет зависеть от роли ПДИ в жизненном цикле того или иного вируса. Полученные *in vivo* данные в отношении вируса Денге согласуются с этим предположением.

Проведение мероприятий комплексного надзора за гриппом помимо эффективных способов лечения и профилактики требует создания чувствительных, надежных, высокопроизводительных и быстрых методов определения и субтипирования ВГА, а также оценки и прогнозирования тяжести заболевания. Одним из методов, позволяющих удовлетворить выдвигаемым требованиям, является технология биологических микрочипов, которая в начале 2000-х годов рассматривалась как наиболее перспективный подход к высокопроизводительной мультиплексной диагностике (Wang *et al.*, 2003). Помимо возможности выявления и субтипирования ВГА, микрочип в рамках одного анализа позволяет проводить оценку уровней экспрессии мРНК клеточных белков, в частности, цитокинов, баланс которых является одним из важнейших факторов, определяющих протекание вирусной инфекции (Short *et al.*, 2014; Szretter *et al.*, 2007). Анализ экспрессии цитокинов абсолютно необходим для понимания механизмов иммунного ответа при гриппе (в том числе, штамм-специфического). Мы разработали и апробировали в лабораторных условиях тест-систему «IAVchip» на основе олигонуклеотидного микрочипа, позволяющую детектировать и проводить субтипирование ВГА человека и животных (Klotchenko *et al.*, 2012; Sultankulova *et al.*, 2014; Vasin *et al.*, 2014, 2011). Для оценки присутствия мРНК цитокинов в клетках также разработали олигонуклеотидный микрочип (Плотникова *и др.*, 2011) и метод количественной мПЦР в режиме реального времени (Плотникова *и др.*, 2013; Plotnikova *et al.*, 2016). Для последнего была проведена одобренная Минздравом России клиническая апробация.

ВЫВОДЫ

1) Ген *NS* всех циркулирующих в настоящее время штаммов ВГА человека происходит от общего предка – гена *NS* пандемического ВГА 1918 года, при этом большинство структурных и функциональных доменов кодируемого этим геном белка *NS1* оставались консервативными в процессе эволюции ВГА человека. Наблюдаемая консервативность *NS1* и данные о том, что делеция открытой рамки считывания *NS1* в гене *NS* существенно снижает

уровень репликации и степень патогенности ВГА, делают этот белок перспективной мишенью для терапии гриппа.

2) Модель ВГА инфекции, в которой используются клеточная линия карциномы легкого человека A549 и два рекомбинантных ВГА, содержащих полноразмерную и укороченную открытую рамку считывания NS1 в гене NS, позволяет проводить анализ механизмов взаимодействия между ВГА и инфицируемой клеткой, и определять клеточные факторы, за активацию которых отвечает открытая рамка считывания NS1.

3) ВГА вызывает в эпителиальных клетках A549 NS1-зависимую активацию экспрессии генов *HSPA5*, *HSPA1B*, *HSPA1A*, *DNAJB1* и *BAG3*, задействованных в HSF1-зависимом ответе на тепловой шок. Белки, участвующие в регуляции фолдинга и сборки вирусных белков, могут быть мишенями для противовирусной терапии.

4) Синтетические siРНК, направленные на выключение экспрессии гена NS ВГА, обладают сопоставимой с озельтамивиром противовирусной активностью *in vitro* в отношении ВГА разных подтипов (H1N1, H1N1_{pdm09}, H3N2, H5N2 и H7N9).

5) Применение коктейля синтетических компенсаторных аналогов клеточных miРНК let-7a, miR-16, miR-24 и miR-194, уровень экспрессии которых снижается под действием вирусного заражения, вызывает эффективное (сопоставимое с озельтамивиром) ингибирование репликации ВГА *in vitro*.

6) Соединения ряда 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов катализируют образование дисульфидных связей в цистеин-содержащих пептидных фрагментах активных центров ПДИ человека. Окислительная способность 1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов в отношении цистеинов зависит от строения заместителей и может объяснять их противовирусную активность.

7) Тест-система «IAVchip» позволяет проводить диагностику ВГА человека и животных по 16 подтипам гемагглютинина и 9 подтипам нейраминидазы. Используемый в тест-системе метод одностадийной мультисегментной ОТ-ПЦР с единственной парой универсальных праймеров позволяет получать флуоресцентно меченые кДНК копии восьми геномным сегментов всех возможных подтипов ВГА человека и животных.

8) Тест-система на основе мультиплексной ПЦР в режиме реального времени позволяет количественно выявлять мРНК IL1 β , IL2, IL4, IL6, IL10, IL12 β , IL18, IFN γ и TN- α в клетках крови пациентов с диагнозом ОРЗ.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования:

1. **Васин, А.В.**, Петрова-Бродская, А.В., Плотникова, М.А., Цветков, В.Б. и Клотченко, С.А. Эволюционная динамика структурных и функциональных

- доменов белка NS1 вирусов гриппа А человека // Вопр. вирусол. – 2017. – Т. 62. – № 6. – С. 246–258.
2. Петрова-Бродская, А.В., Бондаренко, А.Б., Тимин, А.С., Плотникова, М.А., Афанасьев, М.В., Семенова, А.А., Лебедев, К.И., Горшков, А.Н., Горшкова, М.Ю., Егоров, В.В., Клотченко, С.А. и **Васин, А.В.** Сравнение эффективностей ингибирования вируса гриппа А *in vitro* комплексами малых интерферирующих РНК с производными хитозана, полиэтиленимином и гибридными микрокапсулами на основе полиаргинина с неорганическими компонентами // Вопр. вирусол. – 2017. – Т. 62. – № 6. – С. 259–265.
 3. Muslimov, A., Timin, A.S., Petrova, A., Epifanovskaya, O., Shakirova, A., Lepik, K., Gorshkov, A., Il'inskaja, E., **Vasin, A.**, Afanasyev, B., Fehse, B. and Sukhorukov, G. Mesenchymal stem cells engineering: microcapsules assisted gene transfection and magnetic cell separation // ACS Biomater. Sci. Eng. – 2017. – acsbiomaterials.7b00482.
 4. Горшков, А.Н., Петрова, А.В. и **Васин, А.В.** РНК-интерференция и патогенез вируса гриппа А // Цитология. – 2017. – Т. 59. – № 8. – С. 515–533.
 5. Timin, A.S., Muslimov, A.R., Petrova, A.V., Lepik, K.V., Okilova, M.V., **Vasin, A.V.**, Afanasyev, B.V. and Sukhorukov, G.B. Hybrid inorganic-organic capsules for efficient intracellular delivery of novel siRNAs against influenza A (H1N1) virus infection // Sci. Rep. – 2017. – V. 7. – № 1. – P. 102.
 6. Plotnikova, M.A., Klotchenko, S.A. and **Vasin, A.V.** Development of a multiplex quantitative PCR assay for the analysis of human cytokine gene expression in influenza A virus-infected cells // J. Immunol. Methods. – 2016. – V. 430 – P. 51–55.
 7. **Vasin, A.V.**, Petrova, A.V., Egorov, V.V., Plotnikova, M.A., Klotchenko, S.A., Karpenko, M.N. and Kiselev, O.I. The influenza A virus NS genome segment displays lineage-specific patterns in predicted RNA secondary structure // BMC Res. Notes. – 2016. – V. 9. – 279.
 8. Heydarov, R.N., Fesenko, E.E., Shaskolskiy, B.L., Klotchenko, S.A., **Vasin, A.V.**, Titov, S.V., Dementieva, E.I., Zasedatelev, A.S., Mikhailovich, V.M. and Kiselev, O.I. Identification of genetic determinants of influenza A virus resistance to adamantanes and neuraminidase inhibitors using biological microarray // Dokl. Biochem. Biophys. – 2015. – V. 460. – P. 4–8.
 9. Rusinov, V.L., Sapozhnikova, I.M., Ulomskii, E.N., Medvedeva, N.R., Egorov, V. V., Kiselev, O.I., Deeva, E.G., **Vasin, A.V.** and Chupakhin, O.N. Nucleophilic substitution of nitro group in nitrotriazolotriazines as a model of potential interaction with cysteine-containing proteins // Chem. Heterocycl. Compd. – 2015. – V. 51. – № 3. – P. 275–280.
 10. **Vasin, A.V.**, Temkina, O.A., Egorov, V.V., Klotchenko, S.A., Plotnikova, M.A. and Kiselev, O.I. Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: an overview of recently discovered proteins // Virus Res. – 2014. – V. 185. – P. 53–63.
 11. Ksenofontova, O.I., **Vasin, A.V.**, Egorov, V.V., Bobyl', A.V., Soldatenkov, F.Y., Terukov, E.I., Ulin, V.P., Ulin, N.V. and Kiselev, O.I. Porous silicon and its

- applications in biology and medicine // *Tech. Phys.* – 2014. – V. 59. – № 1. – P. 66–77.
12. Sultankulova, K.T., Chervyakova, O.V., Kozhabergenov, N.S., Shorayeva, K.A., Stochkov, V.M., Orynbayev, M.B., Sandybayev, N.T., Sansyzbay, A.R. and **Vasin, A.V.** Comparative evaluation of effectiveness of IAVchip DNA microarray in influenza A diagnosis // *Sci. World J.* – 2014. – V. 2014. – 620580.
 13. **Vasin, A.V.**, Sandybaev, N.T., Plotnikova, M.A., Klotchenko, S.A., Cherviakova, O.V., Stochkov, V.M., Taylakova, E.T., Temkina, O.A., Brodskaia, A.V., Zabrodskaiia, I.A., Nikulenkov, K.P., Egorov, V.V., Koshemetov, Z.K., Sancyzбай, A.R. and Kiselev, O.I. Universal diagnostic oligonucleotide microarray for subtyping of human and animal influenza A viruses // *Vopr. Virusol.* – 2014. – V.58. – № 5 – P. 32–37.
 14. Klotchenko, S.A., **Vasin, A.V.**, Sandybaev, N.T., Plotnikova, M.A., Chervyakova, O.V., Smirnova, E.A., Kushnareva, E.V., Stochkov, V.M., Taylakova, E.T., Egorov, V.V., Koshemetov, J.K., Kiselev, O.I. and Sansyzbay, A.R. Oligonucleotide microarray for subtyping of influenza A viruses // *J. Phys.* – 2012. Conf. Ser. 345. – 012041.
 15. **Vasin, A.V.**, Sandybaev, N.T., Plotnikova, M.A., Klotchenko, S.A., Chervyakova, O.V., Stochkov, V.M., Taylakova, E.T., Elpaeva, E.A., Komissarov, A.B., Egorov, V.V., Koshemetov, J.K., Kiselev, O.I. and Mamadaliev, S.M. Multisegment one-step RT-PCR fluorescent labeling of influenza A virus genome for use in diagnostic microarray applications // *J. Phys.* – 2011. – Conf. Ser. 291. – 012006.

Патенты Российской Федерации на изобретения:

1. Способ флуоресцентного мечения кДНК вируса гриппа типа А: пат. 2480525 Рос. Федерация: МПК С12N 15/10 С12N 15/44 С12Q 1/68 / **А.В. Васин**, В.В. Егоров, М.А. Плотникова, С.А. Клотченко, Е.А. Смирнова, О.И. Киселев; заявитель и патентообладатель ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России. – № 2011129731/10; заявл. 18.07.2011; опубл. 27.04.2013, Бюл. № 12.
2. Натриевая соль 2-метилтио-6-циано-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7(4Н)-она, тригидрат : пат. 2607628 Рос. Федерация: МПК С07D 487/04 А61К 31/53 / В.Л. Русинов, О.Н. Чупахин, В.Н. Чарушин, И.М. Сапожникова, Н.Р. Медведева, Е.Н. Уломский, О.И. Киселев, Э.Г. Деева, Н.И. Коновалова, **А.В. Васин**; заявитель и патентообладатель ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России. – № 2015140852; заявл. 25.09.2015; опубл. 10.01.2017, Бюл. № 1.
3. 2-фурил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин-7-он: пат. 2620594 Рос. Федерация: МПК С07D 487/04 А61К 31/519 / В.Л. Русинов, К.В. Саватеев, Е.Н. Уломский, В.В. Федотов, К.В. Сивак, **А.В. Васин**, Э.Г. Деева, Т.Н. Саватеева-Любимова; заявитель и патентообладатель ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России

Б.Н. Ельцина», ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России. – № 2016116416; заявл. 26.04.2016; опубл. 29.05.2017, Бюл. № 16.

Работы, опубликованные в других изданиях:

1. Petrova, A., Bondarenko, A., Timin, A., Afanasev, M., Sukhorukov, G. and **Vasin, A.** Comparison of different strategies for siRNA delivery against influenza A virus // *The FEBS Journal*. – 2017. – V. 284 (Suppl. 1). – P. 170.
2. Bondarenko, A., Petrova-Brodskaya, A., Timin, A., Muslimov, A., Semenova, A., Afanasiev, M., Gorshkov, A. and **Vasin, A.** Antiviral activity of small interfering RNAs // *Abstract book of International conference «Trends in Influenza Research»*. – Saint-Petersburg, 2017. – P. 123–124.
3. Плотникова, М.А., **Васин, А.В.**, Клотченко, С.А., Смирнова, Т.Д., Даниленко, Д.М., Егоров, В.В., Шурыгина, А.-П.С. и Киселев, О.И. Сравнение паттерна экспрессии мРНК цитокинов в эпителиальных клетках А-549, инфицированных вирусами гриппа А/Н1N1_{pdm09}, А/Н3N2 и А/Н5N1 // *Цитокины и Воспаление*. – 2013. – Т. 12. – № 1–2. – С. 57–65.
4. Plotnikova, M., Klotchenko, S., Shurygina, A. and **Vasin, A.** Cytokines gene expression in human lung epithelial A549 cells induced by non-structural NS1 protein of influenza A viruses // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2013. – V. 21 (Suppl. 2). – P. 523-524.
5. Plotnikova, M. and **Vasin, A.** Development of multiplex real-time PCR for quantification of cytokines mRNA expression in influenza virus infected human cells // *FEBS Journal*. – 2013. – Vol. 280 (Suppl. 1). – P. 282.
6. Плотникова, М.А., **Васин, А.В.**, Марочкина, Е.Ю., Клотченко, С.А., Романовская-Романько, Е.А., Шурыгина, А.-П.С., Егоров, В.В. и Киселев, О.И. Олигонуклеотидный биочип для определения профиля экспрессии генов цитокинов человека // *Цитокины и Воспаление*. – 2011. – Т. 10. – № 2. – С. 5–9.
7. **Vasin, A.V.**, Egorov, V.V., Plotnikova, M.A., Khazan, A.A. and Kiselev, O.I. Oligonucleotide microarray-based detection of influenza viruses // *Abstract book of Joint International Conference «Preparedness to the Influenza Pandemic – an International Outlook»*. – Saint-Petersburg, 2007 – P. 102–103.

Монографии:

1. Триазавирин - противовирусный препарат нового поколения / Артемьев Г.А., Бондарев В.П., Борисевич С.В., **Васин А.В.** [и др.]; под ред. академика РАН О.Н. Чупахина, академика РАН О.И. Киселева. – Екатеринбург, 2016. – 254 с.
2. Исследование, технология и использование нанопористых носителей лекарств в медицине / Шевченко В.Я., Киселев О.И., Соколов В.Н., Агафонов А.В., Алешина Н.А., Антропова Т.В., Анциферова Ю.С., Баранчиков А.Е., Бурылев В.В., **Васин А.В.** [и др.]; под ред. акад. РАН В.Я. Шевченко, акад. РАН О.И. Киселева, проф. В.Н. Соколова. – СПб.: Химиздат, 2015. – 368 с., ил.