

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

**Мельнічук Наталія Сергіївна**



УДК 577.113:578.23:578.24

**ВПЛИВ ОЛІГОРИБОНУКЛЕОТИДІВ НА ІНФЕКЦІЙНІСТЬ ВІРУСУ  
ГРИПУ *IN VITRO* ТА ГРИП-ІНДУКОВАНУ ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ  
ВРОДЖЕНОГО ІМУНІТЕТУ *IN VIVO***

03.00.03 – молекулярна біологія

**Автореферат**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

**КИЇВ – 2021**

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі ензимології білкового синтезу Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Науковий керівник: кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник  
**Ткачук Зеновій Юрійович**,  
завідувач наукової групи молекулярної фармакології відділу ензимології білкового синтезу Інституту молекулярної біології та генетики НАН України.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор  
**Колибо Денис Володимирович**,  
Інститут біохімії імені О. В. Палладіна  
НАН України,  
завідувач лабораторією імунобіології;

кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник  
**Завелевич Михайло Петрович**,  
Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького  
НАН України.

Захист дисертації відбудеться «26» січня 2021 року о 10<sup>30</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 в Інституті молекулярної біології та генетики НАН України за адресою: 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150; тел. (044)526-11-69; e-mail: inform@imbg.org.ua.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту молекулярної біології та генетики НАН України за адресою: м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

Автореферат розісланий «24» грудня 2020 року.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради  
к.б.н., с.н.с.

І. В. Крупська

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми дисертації.** За оцінками Всесвітньої організації охорони здоров'я, сезонний вірус грипу А спричиняє до 500 тисяч смертей та великі економічні втрати щороку ([euro.who.int/en/health-topics/communicable](http://euro.who.int/en/health-topics/communicable)). Щорічні тривалентні або чотиривалентні вакцини є найефективнішим способом запобігання зараженню та важких наслідків, які спричинені вірусами грипу ([who.int/influenza/vaccines](http://who.int/influenza/vaccines)). Однак висока мінливість гемаглютиніну (НА) вірусу грипу забезпечує безперервну еволюцію нових штамів та епідемій грипу, що у свою чергу ускладнює підбір відповідної вакцини (Salzberg S., 2008; Davlin S.L., 2016; Houser K. et al., 2015). У зв'язку з резистентністю вірусу грипу до існуючих ліцензійних протигрипозних препаратів та постійною загрозою епідемії чи пандемії вірусу грипу виникла нагальна потреба у пошуку протигрипозного препарату спрямованого проти нових мішеней (Moscona A., 2009; Sheu T.G., 2011; Bright R.A. et al., 2006).

На сьогоднішній день відсутні ліцензійні інгібітори НА, що робить НА новою перспективною мішенню для створення нового протигрипозного препарату. Тому пошук протигрипозного препарату, який буде інгібувати активність НА є актуальним завданням для дослідників (Shen X. et al., 2013).

Основною причиною смерті пацієнтів від грипу є цитокиновий шторм, який призводить до надмірного запалення, набряку, дисфункції та пошкодження тканин легенів і є результатом надмірної вродженої імунної відповіді клітин хазяїна на вірус грипу (Herold S. et al., 2008; Ramos I. et al., 2015). Запуск вродженої імунної відповіді на інфекцію вірусу грипу відбувається шляхом зв'язування нуклеїнової кислоти вірусу з Toll-подібними рецепторами 3, 7, 8, активуючи транскрипційний фактор NF-κB, що у свою чергу викликає індукцію цитокінів та хемокінів. Надпродукція останніх викликає рекрутинг імунних клітин у альвеолярний простір та оксидативно-нітрозативно-опосередковані пошкодження у тканинах легенів (Kawai T. et al., 2011; Alexoroulou L. et al., 2001). Тому використання терапевтичного препарату для ослаблення вродженої імунної відповіді у поєднанні з противірусною дією може зменшити симптоми та пошкодження тканин легенів, які спричинені вірусом грипу (Ramos I. et al., 2015).

Природні препарати олігорибонуклеотидів (ОРН) та їхні комплекси з D-манітолом (ОРН-D-M) на основі сумарної дріжджової РНК мають противірусну дію проти широкого спектру ДНК- та РНК-вірусів (Frolov V.M. et al., 2012; Tkachuk Z. 2011, Dykui V.M. et al., 2011). До того ж ОРН є ефективним протизапальним препаратом, який може застосовуватися як кардіо- та гепатопротектор (Ткачук З.Ю. et al., 2009; Shmarakov I.O. et al., 2015). Доклінічні та клінічні дослідження свідчать про протигрипозну дію ОРН-D-M при грипі (Ткачук З.Ю. et al., 2010, Андрейчин М.А. та ін., 2013). Однак механізм одночасної протизапальної та протигрипозної дії ОРН-D-M залишається досі незрозумілим. Отже, вивчення впливу ОРН на активність НА вірусу грипу та експресію генів вродженого імунітету за умов грипу допоможе

наблизитися до розуміння механізмів протигрипозної та протизапальної дії ОРН, які є засадою для адекватних підходів в лікуванні інфікованих грипом.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертація відповідає основному плану науково-дослідних робіт групи молекулярної фармакології відділу ензимології білкового синтезу Інституту молекулярної біології і генетики НАН України і виконувалась в рамках бюджетних тем № 2.2.4.15 – «Вивчення впливу олігонуклеотидів на сигнальні білки та експресію генів вродженого імунітету» (номер державної реєстрації – 0113U002779, 2014-2018 рр.) та №35/15 – «Комплексоутворення препаратів РНК з низькомолекулярними лігандами та їх лікувальна ефективність» (номер державної реєстрації – 0115U005603, 2015-2019 рр.).

**Мета і завдання дослідження.** Метою дисертаційного дослідження було вивчення впливу ОРН та ОРН-D-M на інфекційність вірусу грипу А (H1N1) *in vitro* та індуковану експресію генів вродженого імунітету у відповідь на інфекцію вірусу грипу *in vivo*.

Відповідно до мети роботи було поставлено наступні завдання:

1. Дослідити можливу пряму інактивуєчу дію ОРН та ОРН-D-M на вірус грипу за зміною його інфекційного титру після взаємодії з екзогенними олігорибонуклеотидами до інфікування клітин MDCK;
2. Вивчити вплив ОРН та ОРН-D-M на утворення НА-гліканової взаємодії, відповідальної за перший етап життєвого циклу вірусу грипу та охарактеризувати взаємодію ОРН та ОРН-D-M з НА;
3. Дослідити експресію цитокінів, хемокінів, інтерферон-стимульованих та прооксидантних генів після 48-годинної вірусної інфекції та введення ОРН та ОРН-D-M за профілактичною та лікувальною схемами *in vivo*;
4. Визначити вплив ОРН та ОРН-D-M на експресію транскрипційного фактора NF-κB на моделі грипозної пневмонії у мишей за профілактичною та лікувальною схемами;
5. Дослідити вплив ОРН та ОРН-D-M на експресію генів Toll-подібних рецепторів, які зв'язуються з нуклеїновою кислотою вірусу грипу, екзогенними олігонуклеотидами та активують вроджену імунну відповідь на вірус грипу у тканинах легенів мишей, які інфіковані вірусом грипу.

**Об'єкт дослідження** - вірус грипу та експресія генів вродженого імунітету у мишей.

**Предмет дослідження** – взаємодія ОРН з вірусом грипу та експресія генів вродженого імунітету у тканинах легенів мишей під час інфекції грипу та дії ОРН.

**Методи дослідження:** культивування клітин лінії MDCK, МТТ-тест оцінки життєздатності клітин, аналіз ТЦД<sub>50</sub>, РГА оцінки утворення НА-гліканової взаємодії, флуоресцентна спектроскопія ОРН-НА взаємодії, виділення тотальної РНК з тканини легенів мишей, електрофорез РНК у мікрочіпі, синтез кДНК, ПЛР-РЧ, електрофорез білків у поліакриламідному гелі, вестерн-блот, оцінка вмісту ПОЛ.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Під час виконання роботи вперше виявлено пряму інактивуючу дію ОРН та ОРН-D-M на вірус грипу. Показано зниження цитопатичної дії вірусу грипу та високу життєздатність клітин після інфікування вірусом грипу з преінкубацією з ОРН та ОРН-D-M. Більше того, показано, що ОРН та ОРН-D-M можуть знижувати інфекційний титр вірусу грипу A/FM/1/47/H1N1. Вивчено, що ОРН та ОРН-D-M мають інгібуючу дію на зв'язування білків НА вірусу грипу до залишків сіалової кислоти гліканів еритроцитів. Проаналізовано, що ОРН та ОРН-D-M знижують активність НА вірусу грипу, що призводить до перешкоджання гемаглютинін-гліканової взаємодії та зниження інфекційності вірусу. Вперше, використовуючи ізольований НА, показано тривалу взаємодію між НА і ОРН, ОРН-D-M з доволі низькою афінністю, що призводить до зниження активності НА. Суттєвіший вплив ОРН-D-M на НА ймовірно забезпечується D-манітолом шляхом стабілізації ОРН. Вперше показано, що комплекси ОРН-D-M знижують інфекційність пандемічного вірусу грипу A/CA/7/09/H1N1 та пташиного вірусу грипу A/MP/10218/84/H5N2 і проаналізовано, що неспецифічна взаємодія досліджуваних ОРН-D-M з НА може забезпечити стійкість олігорибонуклеотидів до розвитку резистентності вірусом грипу. Вперше показано, що вірус грипу штаму A/FM/1/47/H1N1 індукує гіперекспресію мРНК *Xdh*, *Nos2*, *Arg2*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oas3*, *Mx1*, *Eif2ak2*, *Ifnε*, *Ifnk*, *Ifna2*, *Ifnβ1*, *Ifnγ*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Il6*, *Il1β*, *Il12a*, *Tnfa*, *Nfkb1*, *Nfkbia*, *Tlr3*, *Tlr7* та *Tlr8* у тканинах легенів мишей. Вперше визначено підвищену експресію мРНК *Ifnε*, *Ifnk* за умов грипу у тканинах легенів мишей. Виявлено, що введення ОРН та ОРН-D-M мишам за профілактичною та лікувальною схемами знижує рівні мРНК генів *Xdh*, *Nos2*, *Arg2*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oas3*, *Mx1*, *Eif2ak2*, *Ifnε*, *Ifnk*, *Ifna2*, *Ifnβ1*, *Ifnγ*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Il6*, *Il1β*, *Il12a*, *Tnfa*, *Nfkb1*, *Nfkbia*, *Tlr3*, *Tlr7* та *Tlr8*, транскрипція яких була індукованою вірусом грипу. Ослаблення гіперекспресії *Nfkb1*, *Nfkbia*, *Xdh*, *Nos2* терапевтичними олігорибонуклеотидами спостерігалось також на рівні трансляції. Вперше показано, що інгібування індукції рівнів мРНК деяких генів вродженого імунітету у відповідь на вірус грипу суттєвіше за умови профілактичної схеми дії ОРН та ОРН-D-M на вірус грипу. Вперше проаналізовано, що ОРН та ОРН-D-M інгібують гіперекспресію *Tlr3*, *Tlr7*, *Tlr8*, яка індукується вірусом грипу, перешкоджаючи надекспресії NF-κB, цитокінів, хемокінів, прооксидантів та інтерферон-стимульованих генів (ISG) шляхом взаємодії з TLR-3, TLR-7 та TLR-8.

**Практичне значення одержаних результатів.** Представлені дослідження поглиблюють розуміння механізму дії природних ОРН проти вірусу грипу. Отримані результати модуляції вродженої імунної відповіді терапевтичними олігорибонуклеотидами шляхом впливу на Toll-подібні рецептори розкривають розуміння нормалізації компонентів вродженого імунітету (наприклад цитокіновий профіль) при гострому токсичному ураженні печінки, цукровому діабеті II типу, ВІЛ інфекції, гострому інфаркті міокарда. Крім того, низькоафінна взаємодія ОРН з глікопротеїном вірусу грипу розкриває уявлення

щодо механізму противірусної дії ОРН проти широкого спектру вірусів, що має практичне застосування. Отримані результати щодо змін експресії генів вродженого імунітету за дії грипу та ОРН стали підґрунтям для розробки тест-системи для аналізу експресії генів уродженого імунітету.

**Особистий внесок здобувача.** Всі дослідження виконувались за безпосередньої участі здобувача. Більшість представлених експериментів, а також обробку і аналіз отриманих результатів виконано особисто пошукачем. Дослідження *in vivo*, а саме інфікування тварин вірусом грипу та введення ОРН, ОРН-D-M за профілактичної та лікувальної схем було проведено спільно з д.мед.н., проф. С.Л. Рибалко у лабораторії експериментальної хіміотерапії вірусних інфекцій ДУ Інституту епідеміології та інфекційних захворювань ім. Л.В. Громашевського НАМН України. Дослідження змін експресії генів вродженого імунітету виконували у співробітництві з д.б.н., проф. В.І. Кашубою. Оцінку НА-гліканової взаємодії за допомогою РГА проводили спільно з пров. інж. Л.І. Семерниковою, а флуоресцентну спектроскопію – з м.н.с. М. М. Вівчарик. Дослідження противірусної дії ОРН-D-M проти вірусів грипу A/CA/7/09/H1N1 та A/MP/10218/84/H5N2 було проведено у співробітництві з к.б.н., с.н.с. В.В. Зарубаєвим на базі лабораторії експериментальної вірусології, Санкт-Петербурзького Інституту епідеміології та мікробіології імені Пастера. Автор висловлює подяку науковому керівнику к.б.н., с.н.с. З.Ю. Ткачуку за розробку стратегій досліджень, допомогу в плануванні експериментів та обговорення отриманих результатів. Автор щиро вдячний співробітникам групи молекулярної фармакології відділу ензимології білкового синтезу Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за корисні поради під час планування досліджень та обговорення результатів. Отримані результати обговорено та опубліковано в спільних публікаціях.

**Апробація результатів дисертації.** Результати досліджень було представлено на наукових семінарах відділу ензимології білкового синтезу та на таких наукових конференціях: CYS Conference for young scientists (Київ, 2015); The 8th International conference bioresources and viruses (Київ, 2016); The 2nd International Electronic Conference on Medicinal Chemistry» (Online, 2016); X Parnas Conference Young Scientist Forum „Molecules in the Living Cell and Innovative Medicine” (Вроцлав, Польща, 2016); V Науково-практична конференція школи молодих науковців ПАТ «Фармак» (Київ, 2017); The 7th International Weigl Conference (Львів, 2017); The 3rd International Electronic Conference on Medicinal Chemistry (Online, 2017); Міжнародна конференція молодих вчених «XI Parnas Conference» (Київ, 2018); VI науково-практична конференції школи молодих науковців ПАТ «Фармак» (Київ, 2018); XII український біохімічний конгрес (Тернопіль, 2019).

**Публікації.** За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 17 наукових праць, з них 4 статті у виданнях, що входять до наукометричних баз SCOPUS, 1 стаття у фаховому журналі та 12 тез доповідей у збірках матеріалів вітчизняних та міжнародних наукових конференцій.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел із 229 найменувань. Дисертацію викладено на 145 сторінках стандартного машинопису, вона містить 30 рисунків, 4 таблиці та 2 додатки.

## **ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

### **Огляд літератури**

У розділі представлено сучасні уявлення про вірус грипу та особливості патогенезу грипозної інфекції. Описано систему вродженого імунітету як неспецифічний захист проти вірусу грипу. Особливу увагу приділено характеристиці та властивостям терапевтичних ОРН. Значну увагу зосереджено на протівірусній дії ОРН та ОРН-D-M.

### **Матеріали та методи досліджень**

У роботі було використано лінію клітин MDCK, миші лінії BALB/c, ізолюваний НА (Ваксигрип/VAXIGRIP» (Sanofi Pasteur, Франція)), еритроцити людини 0 (I), вірус грипу A/Fort Monmouth/1/1947-адаптований до мишей (H1N1) (A/FM/1/47/H1N1). ОРН та ОРН-D-M отримані з Дочірнього підприємства «Biosell».

Пряму інактивууючу дію ОРН та ОРН-D-M на вірус грипу вивчали на клітинах лінії MDCK, які інфікували вірусом грипу A/FM/1/47/H1N1 (4,0 Іg ТЦД<sub>50</sub>) з попередньо інкубацією з ОРН та ОРН-D-M протягом 30 хв. Після 48-год інфікування клітин MDCK, інгібування вірусної цитопатичної дії (ЦПД) ОРН та ОРН-D-M аналізували за допомогою інвертованого мікроскопа, а життєздатність клітин оцінювали за допомогою МТТ-тесту.

Інфекційність вірусу грипу A/FM/1/47/H1N1 за дії ОРН та ОРН-D-M вивчали за допомогою визначення інфекційного титру вірусу, який попередньо інкубували з препаратами, використовуючи аналіз тканинної цитопатогенної дії (ТЦД<sub>50</sub>) за описаним методом Reed L.J., Muench H., 1938.

Активність НА вірусу грипу A/FM/1/47/H1N1 та ізолюваного НА оцінювали опосередковано, визначаючи НА титр вірусу A/FM/1/47/H1N1 та ізолюваного НА, яких попередньо інкубували з ОРН та ОРН-D-M за допомогою реакції гемаглютинації (РГА) та з використанням 1 % еритроцитів людини 0 (I). Титр НА визначали як число крайнього розведення з позитивним результатом.

Гасіння флуоресценції НА за дії ОРН та ОРН-D-M вимірювали за допомогою спектрофлуориметра FP-8200 (Jasco, Японія). Емісійні сигнали записували у вигляді спектрів та 3D-спектрів (тотальна флуоресценція зразка). Розрахунок констант дисоціації проводили у програмі Origin 8.1 за формулою біомолекулярної взаємодії описаною Favicchio R. et al., 2009.

Вплив ОРН та ОРН-D-M на гіперекспресію генів вродженого імунітету, спричинену вірусом грипу A/FM/1/47/H1N1 *in vivo*, вивчали на моделі грипозної пневмонії у мишей за профілактичною та лікувальною схемами (Стефанов О.В. та ін., 2001). Дане дослідження було проведено у лабораторії

експериментальної хіміотерапії вірусних інфекцій ДУ Інституту епідеміології та інфекційних захворювань ім. Л.В. Громашевського НАМН України. Мишей лінії BALB/c інфікували інтраназально вірусом грипу A/FM/1/47/H1N1, 4,0 lg LD<sub>50</sub>. Кожній миші у групі для профілактики, лікування та контролю препаратів ОРН та ОРН-D-M, одноразово внутрішньочеревно вводили ОРН (15 мг/кг) та ОРН-D-M (21 мг/кг). Концентрації даних препаратів підібрані як мінімально активна концентрація діючої речовини проти вірусу грипу A/FM/1/47/H1N1 *in vivo* (Ткачук З.Ю. та ін., 2010). Після 48-годинної інфекції вірусу грипу (пік реплікації вірусу) здійснювали забір легень тварин.

Відносний рівень мРНК генів *Xdh*, *Nos2*, *Arg2*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oas3*, *Mx1*, *Rnasel*, *Eif2ak2*, *Ifnε*, *Ifnk*, *Ifna2*, *Ifnβ1*, *Ifnγ*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Il6*, *Il1β*, *Il12α*, *Tnfa*, *Nfkb1*, *Nfkbia*, *Tlr3*, *Tlr7* та *Tlr8* визначали кількісно ПЛР у режимі реального часу (ПЛР-РЧ). Реакцію проводили з використанням кДНК, яку синтезували з виділеної тотальної РНК з тканини легенів мишей. В якості внутрішнього стандарту використовували *Gapdh*. Дизайн праймерів для ПЛР-РЧ виконували в базі даних GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) за допомогою програми BLAST. Синтез підібраних нами праймерів здійснювався компанією Invitrogen, Фінляндія. Розрахунок результатів ПЛР-РЧ проводили використовуючи формулу 2<sup>-ΔCt</sup>.

Відносний рівень білків NF-κB1 та IκBα визначали із застосуванням Вестерн-блот та денситометричного аналізів. Тотальний білок виділяли з тканини легенів мишей, розділяли в 10 % поліакриламідному гелі та переносили на нітроцелюлозну мембрану. Після чого інкубували із відповідними первинними (NF-κB1 (Rabbit monoclonal; cat. no. 13586; Cell Signaling Technology, Нідерланди), IκBα (mouse monoclonal; cat. no. sc-1643; Santa Cruz Biotechnology, США, β-actin) та вторинними антитілами (anti-mouse - cat. no. 7076; Cell Signaling Technology, Нідерланди та anti-rabbit - cat. no. 7074; Cell Signaling Technology, Нідерланди). Для нормалізації використовували β-actin (rabbit polyclonal cat. no. A2103; Sigma Aldrich, США).

Вміст ендогенних продуктів перекисного окислення ліпідів, які реагують на 2-тіобарбітурову кислоту (ТБК-активні продукти), вимірювали за описаною методикою Asakawa T, Matsushita S., 1980.

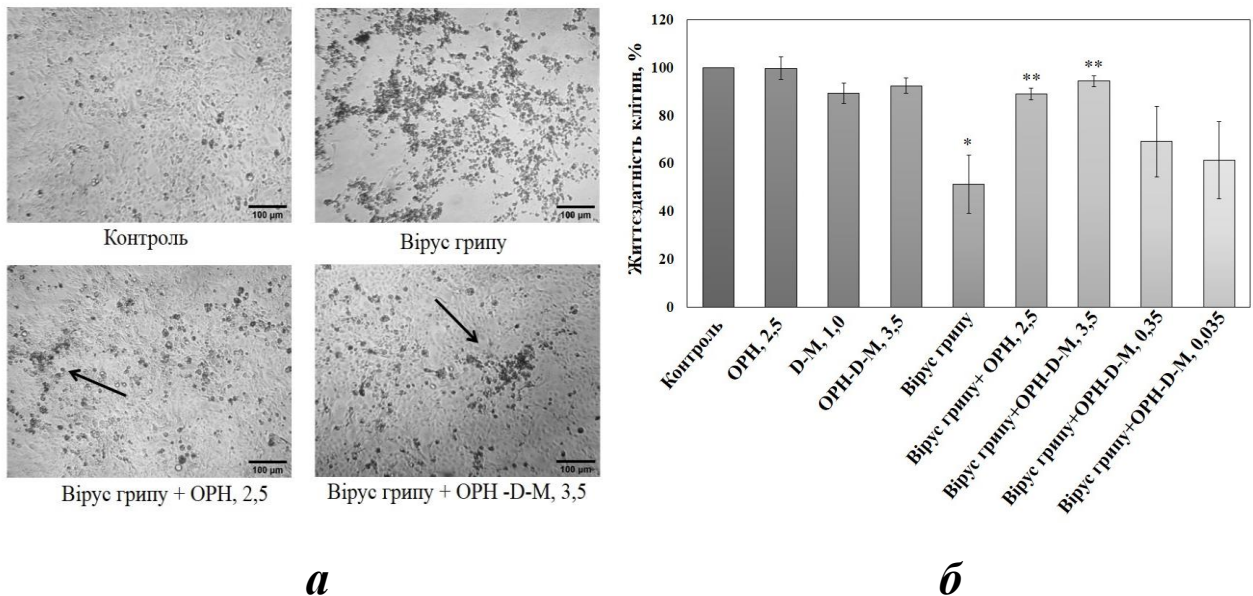
Інфекційний титр вірусу грипу у тканинах легенів мишей визначали шляхом інфікування клітин MDCK та використання аналізу ТЦД<sub>50</sub> за методом Reed L.J., Muench H., 1938.

Статистична обробка результатів для МТТ-тесту, аналізів ТЦД<sub>50</sub> та РГА була здійснена з використанням t-критерію Стьюдента. Для аналізу статистичної достовірності даних ПЛР-РЧ дослідження використовували однофакторний дисперсійний аналіз (one-way ANOVA) у програмі GraphPad Prism 8 для незалежних вибірок даних, які відповідали нормальному розподілу. Перевірку нормальності розподілу проводили за допомогою тесту Шапіро-Вілка. Дані представлені у вигляді середнього арифметичного значення із зображенням стандартного відхилення (±SD). Кожен експеримент повторювали не менш, ніж 3 рази.



## Результати досліджень та їх обговорення

**Пряма інактивуєча дія препаратів ОРН та ОРН-D-M на вірус грипу A/FM/1/47/H1N1.** Вірус грипу інфікує та пошкоджує переважно епітеліальні клітини дихальних шляхів *in vivo* (Sweet C. et. al. 1980). Однак вірус грипу також може викликати загибель клітин *in vitro*. Пошкодження клітин перещеплюваних ліній (MDCK, HeLa) після інфікування вірусом грипу відбувається шляхом індукування апоптозу при неповній реплікації вірусу та масового відбруньковування вірусних частинок з мембрани інфікованих клітин при повній реплікації вірусу грипу (Takizawa T., et al. 1993; Tran A.T., et al. 2013). На першому етапі ми провели оцінку вірус-індукованої ЦПД та визначення життєздатності клітин через 48 год після інфікування клітин MDCK вірусом грипу, який попередньо був інкубований з ОРН та їхніми комплексами ОРН-D-M. Як показано на рис.1,*а*, чітка та помітна ЦПД спостерігалася на клітинах, які інфікували вірусом грипу, у той час як незначна ЦПД спостерігалася на клітинах, які були інфіковані вірусом грипу з попередньою інкубацією з ОРН та ОРН-D-M.

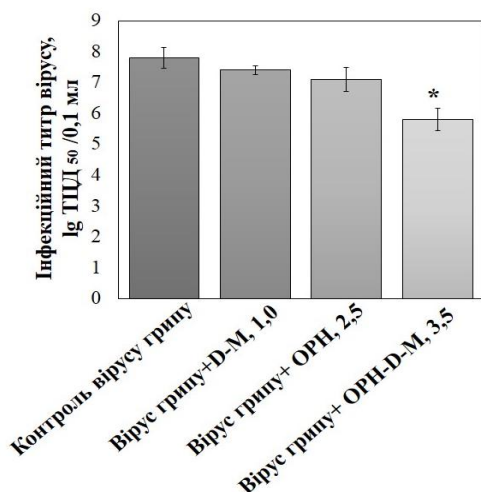


**Рис. 1. Вірус-індукована ЦПД (а) та життєздатність клітин (б) через 48 год після інфікування клітин MDCK вірусом грипу A/FM/1/47/H1N1, який попередньо був інкубований з ОРН та ОРН-D-M, мг/мл: стрілками відмічено незначні ЦПД;\* – різниця порівняно з контролем ( $p < 0,05$ ); \*\* – різниця порівняно з вірусом грипу ( $p < 0,05$ )**

Окрім того нами показано, що життєздатність інфікованих клітин достовірно знижується порівняно з контрольними клітинами. Проте, життєздатність грип-інфікованих клітин, які попередньо інкубувалися з 2,5 мг/мл ОРН та 3,5 мг/мл ОРН-D-M, залишалася високою ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контролем інфікованих клітин. Не було виявлено зниження життєздатності клітин під впливом ОРН та ОРН-D-M (рис. 1, б), що свідчило про не токсичність цих препаратів у застосованих концентраціях. Крім того,

підвищення життєздатності інфікованих клітин спостерігалось у залежності від концентрації ОРН-D-M, якою інкубували вірус грипу перед зараженням клітин.

На наступному етапі роботи ми дослідили вплив ОРН та ОРН-D-M на інфекційність вірусу грипу. Встановлено достовірне зниження інфекційного титру вірусу грипу у  $2 \lg$  ТЦД<sub>50</sub>, який попередньо інкубувався з ОРН-D-M, порівняно з контролем вірусу грипу (рис. 2). Не було встановлено статистично значущого зниження інфекційного титру вірусу грипу, який попередньо інкубували з ОРН та D-M порівняно з контролем вірусу.

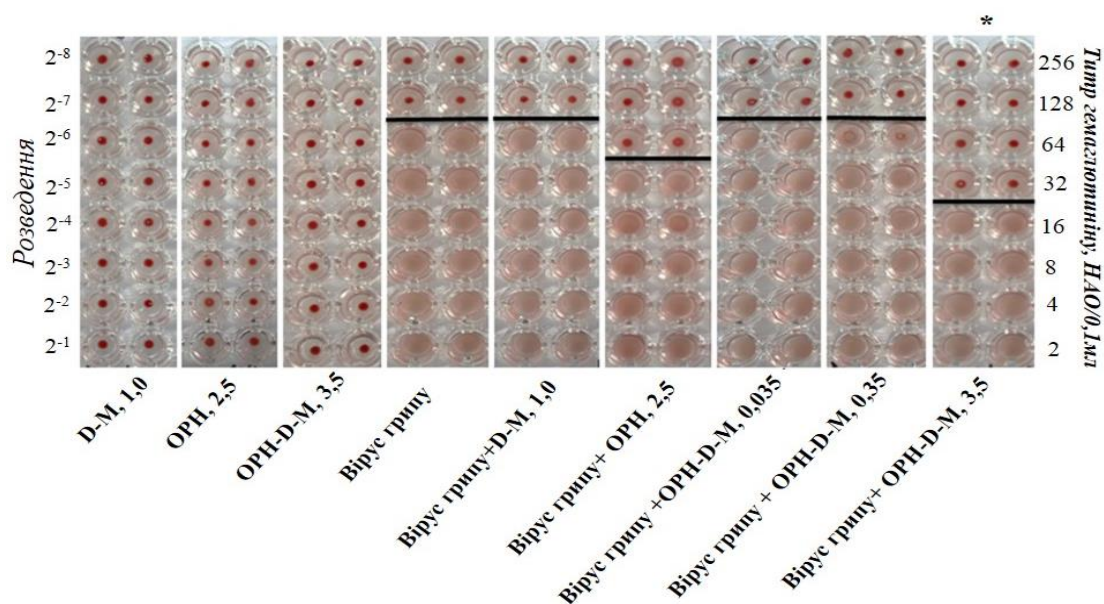


**Рис. 2. Інфекційний титр вірусу грипу А/ФМ/1/47 Н1N1 під дією ОРН та ОРН-D-M, мг/мл: \* – різниця порівняно з контролем вірусу грипу ( $p < 0,05$ )**

Наведені результати досліджень вказують на пряму інактивуючу дію ОРН та ОРН-D-M по відношенню до вірусу грипу шляхом інгібування його інфекційності.

Процес інфікування клітини вірусом грипу спочатку потребує зв'язування поверхневого білка НА вірусу грипу до глікану (залишок сілової кислоти Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal linked ( $\alpha$ 2-3) або Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal linked ( $\alpha$ 2-6)) поверхневого рецептора клітини з наступним злиттям з мембраною (Killian M.L., 2008). РГА показала (рис. 3), що аглютинація еритроцитів не спостерігалась у випадку контролів препаратів. Зокрема, неаглютиновані еритроцити осідали на дно лунки у вигляді червоної крапки, що вказувало на відсутність впливу ОРН, ОРН-D-M, D-M на еритроцити людини. У той же час аглютиновані вірусом грипу еритроцити залишалися у вигляді суспензії та виглядали як дифузний червоний розчин. У подальшому проаналізовано та розраховано титр НА вірусу грипу як величину зворотну мінімальному розведенню, при якому залишається дифузна червона суспензія, яка вказує на одну НА одиницю (НАО). Аглютинація еритроцитів вірусом грипу, попередньо проінкубованим з ОРН та ОРН-D-M протягом 30 хв при 20 °С, була зниженою у 2 та 4 рази відповідно порівняно з контролем вірусу грипу. В той час як аглютинація еритроцитів вірусом грипу, який попередньо інкубували з D-M, та нижчими концентраціями ОРН-D-M залишилася незмінною. Результати РГА свідчать про інгібування препаратами ОРН та ОРН-D-M зв'язування протеїнів НА вірусу грипу до сілових кислот рецепторів еритроцитів, що виражається у достовірному

знижені титру НА вірусу грипу ( $p < 0.05$ ) (рис. 3). Результати дослідження вказують, що ОРН можуть взаємодіяти з НА вірусу грипу, призводячи до інгібування НА-гліканової взаємодії під час інфікування клітин хазяїна.

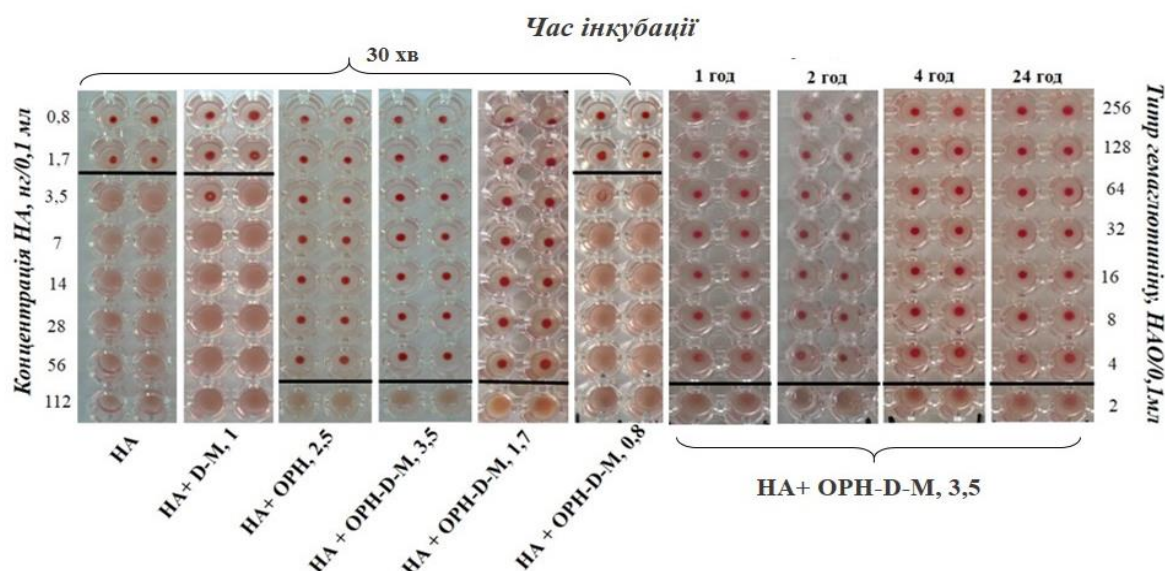


**Рис. 3.** Аглотинація еритроцитів, яка обумовлена НА вірусу грипу A/FM/1/47/H1N1. Вигляд реакційних сумішей РГА у круглодонному мікролунковому планшеті після додавання ОРН, D-M, ОРН-D-M, мг/мл, вірусу грипу та вірусу грипу, який попередньо інкубували з ОРН, D-M, ОРН-D-M, мг/мл: \* – різниця порівняно з контролем вірусу грипу

**Аналіз взаємодії ОРН та ОРН-D-M з НА.** Для вивчення характеру взаємодії ОРН з НА вірусу грипу було використано ізолюваний НА вірусу грипу отриманий у вигляді вакцини «Ваксигрип». Показано, що гемаглютинуючий титр ізолюваного НА у концентрації 225 нг/мл становить 65 НАО/0,1 мл (рис. 4). Після інкубації НА з ОРН (2,5 мг/мл) та ОРН-D-M (3,5 мг/мл) протягом 30 хв при кімнатній температурі гемаглютинуючий титр НА знизився до 2 НАО/0,1 мл, а саме у 32 рази. Дослідження впливу ОРН-D-M на активність НА у серії концентрацій показало, що комплекси ОРН-D-M у концентрації 1,7 мг/мл знижували активність НА у 32 рази, у той час як аглютинація еритроцитів НА, який попередньо інкубували з ОРН-D-M у концентрації 0,8 мг/мл, не змінювалася у порівнянні з контролем. Досліджено тривале пригнічення активності НА за дії ОРН-D-M методом РГА. Інгібування активності НА у 32 рази після інкубування від 30 хв до 24 год з комплексами ОРН-D-M дозволяє припустити здатність ОРН-D-M змінювати конформацію НА.

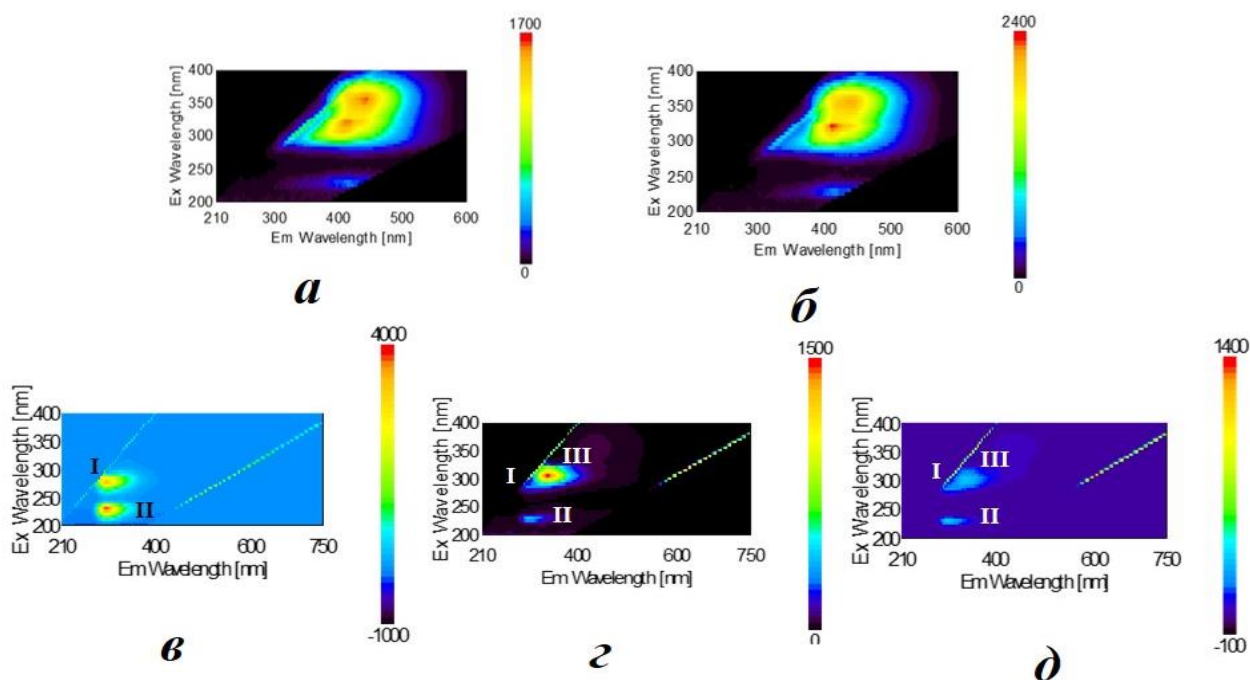
Аналіз результатів флуоресцентної спектроскопії показав гасіння інтенсивності флуоресценції НА після титрування з ОРН та ОРН-D-M, що свідчить про взаємодію між НА і ОРН, ОРН-D-M. 3D-спектри флуоресценції НА-ОРН та НА-ОРН-D-M показали гасіння інтенсивності флуоресценції двох





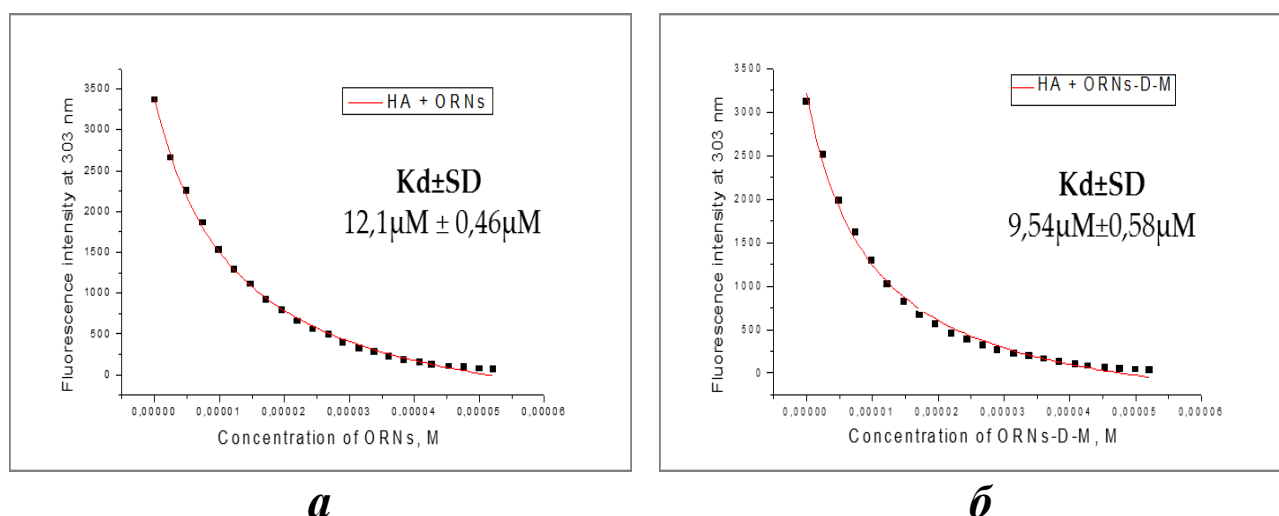
**Рис. 4.** Аглоутинація еритроцитів, яка обумовлена протеїном НА (Ваксигрип). Вигляд реакційних сумішей РГА у круглодонному мікролункковому планшеті після додавання НА, який попередньо інкубували з ОРН та ОРН-D-M, мг/мл при різній тривалості досліду в годинах

півків НА (I пік – білкової основи та II пік – ароматичних залишків, які досягли вище збуджених електронних станів), які, при цьому, не змінюють свого положення у тривимірній системі координат, та утворення нового флуоресцентного компонента (пік III) (рис. 6), що дозволяє припустити про зміни у конформації НА після взаємодії з препаратами ОРН та ОРН-D-M.



**Рис. 6.** Повні спектри флуоресценції ОРН (а), ОРН-D-M (б), НА (в), НА-ОРН (з) та НА-ОРН-D-M (д) у тривимірній (3D) системі координат

Результати проведених нами експериментів також вказують на те, що взаємодія НА з ОРН та ОРН-D-M відбувається з доволі низькою афінністю у зв'язку з відносно низькими константами дисоціації НА-ОРН та НА-ОРН-D-M – 12,1 та 9,5  $\mu\text{M}$  відповідно (рис. 7).



**Рис. 7. Криві залежності інтенсивності флуоресценції НА від концентрації ОРН (а) та ОРН-D-M (б)**

Отже, ОРН та їхні комплекси з D-манітолом потенційно можуть неспецифічно зв'язуватися до амінокислот на або біля глікан-зв'язуючого регіону, змінюючи конформацію білка, що призводить до запобігання НА-гліканової взаємодії та пригнічення інфекційності вірусу грипу.

### **Модуляція грип-індукованої гіперекспресії генів вродженого імунітету препаратами ОРН та ОРН-D-M *in vivo***

Активация вродженої імунної відповіді на вірус грипу супроводжується цитокіновим штормом, який призводить до запалення та окислативно-нітрозативно-опосередкованих пошкоджень у тканинах легенів (Walsh J.J., et al. 1961). ОРН-D-M нормалізує цитокіновий профіль, який відіграє ключову роль при вродженій імунній відповіді, у хворих на діабет (Хунов Ю. А., та ін. 2014; Зельоний І.І., та ін. 2014), ВІЛ-інфікованих осіб із токсоплазмозом інвазією (Грижак І.Г., та ін. 2017), пацієнтів з хронічним гепатитом С (Frolov V.M., et al. 2012). Припускалося, що широкий спектр біологічної дії ОРН-D-M пов'язаний з їх впливом на вроджений імунітет. Для того, щоб дослідити вплив ОРН та їхніх комплексів на грип-індуковану вроджену імунну відповідь, було відібрано та досліджено ряд генів, експресія яких суттєво зростає у відповідь на вірус грипу.

**Експресія прооксидантних генів під впливом ОРН та ОРН-D-M в умовах грипу.** Патогенна роль вільних радикалів під час інфекції вірусу грипу реалізується через підвищення експресії прооксидантних генів *Nos2*, *Xdh* (Zou W., et al. 2013). Активация гену *Arg* при респіраторних вірусних захворюваннях легень призводить до зниження експресії гена *Nos2* (134, 135). Враховуючи, що

при запальних процесах неінфекційної природи ОРН стабілізують активність NOS (Tkachuk Z. et al., 2006), логічно припустити, що ОРН можуть впливати на експресію прооксидантних генів під час інфекції грипу. Для перевірки цього припущення було досліджено зміни експресії *Nos2*, *Xdh* та *Arg2* на моделі грипозної пневмонії у мишей за профілактичною та лікувальною схемами введення ОРН та ОРН-D-M.

Виявлено суттєве підвищення експресії генів *Nos2*, *Xdh* та *Arg2*, які беруть участь у оксидативно-нітрозативному стресі у мишей через 48 год після інфікування вірусом грипу А/М/1/47/Н1Н1 (рис. 8, а). Профілактичне введення ОРН та ОРН-D-M знижувало рівні мРНК генів *Nos2* (у 3,6 та 3 рази відповідно), *Xdh* (у 3,6 та 2,3 рази відповідно) та *Arg2* (на 34 та 37 % відповідно), надекспресія яких була індукована вірусом грипу.

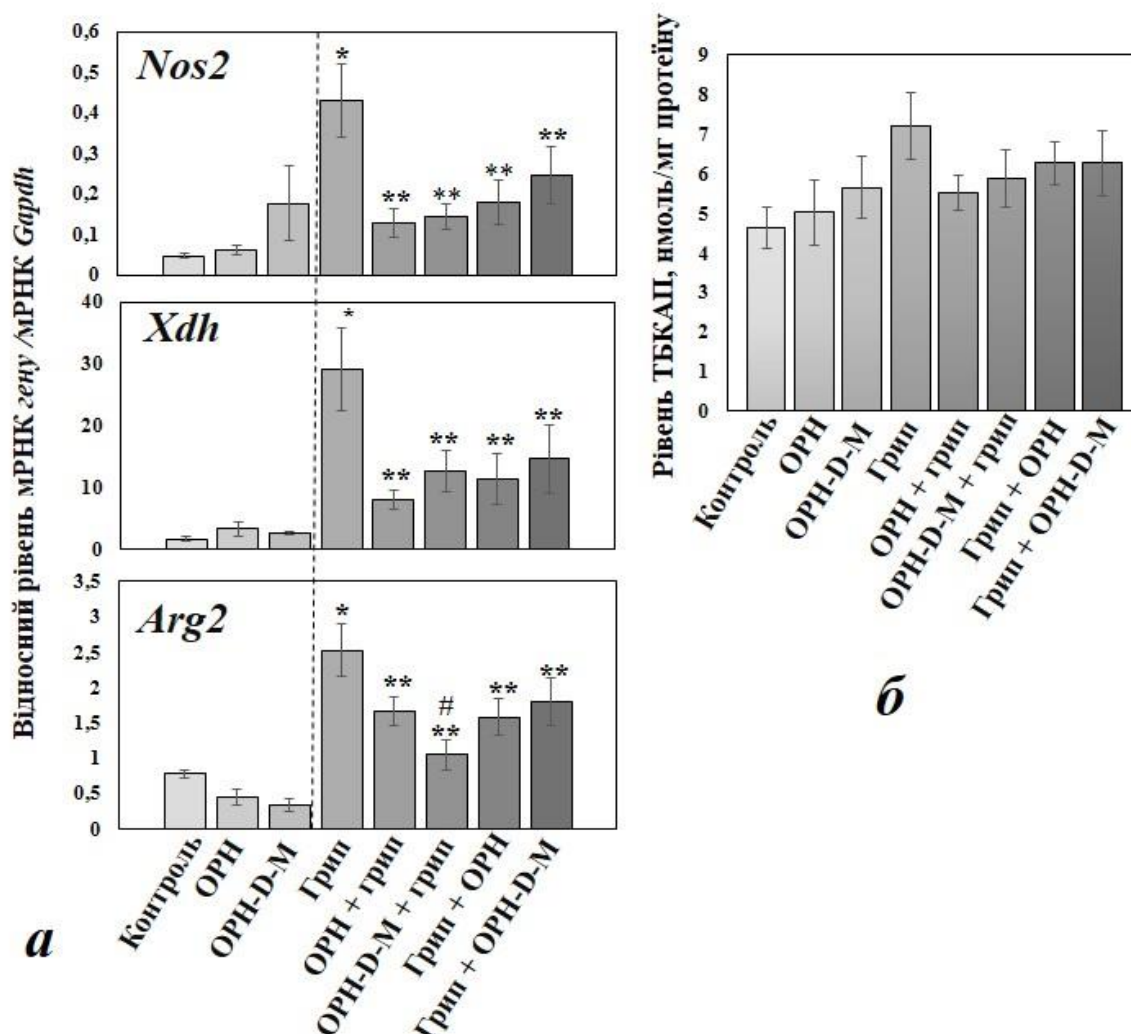


Рис. 8. Рівень мРНК генів *Nos2*, *Xdh*, *Arg2* (а) та рівень ТБКАП1 (б) у легенях мишей BALB/c через 48 год після інфікування вірусом грипу А/М/1/47/Н1Н1 та профілактичного (24 год до інфікування) або лікувального (24 год після інфікування) впливу ОРН або ОРН-D-M: \* – різниця порівняно з контролем,  $p < 0,05$ ; \*\* – різниця порівняно з інфекцією вірусу грипу,  $p < 0,05$ ; # – порівняно з лікувальною схемою застосування ОРН-D-M,  $p < 0,05$

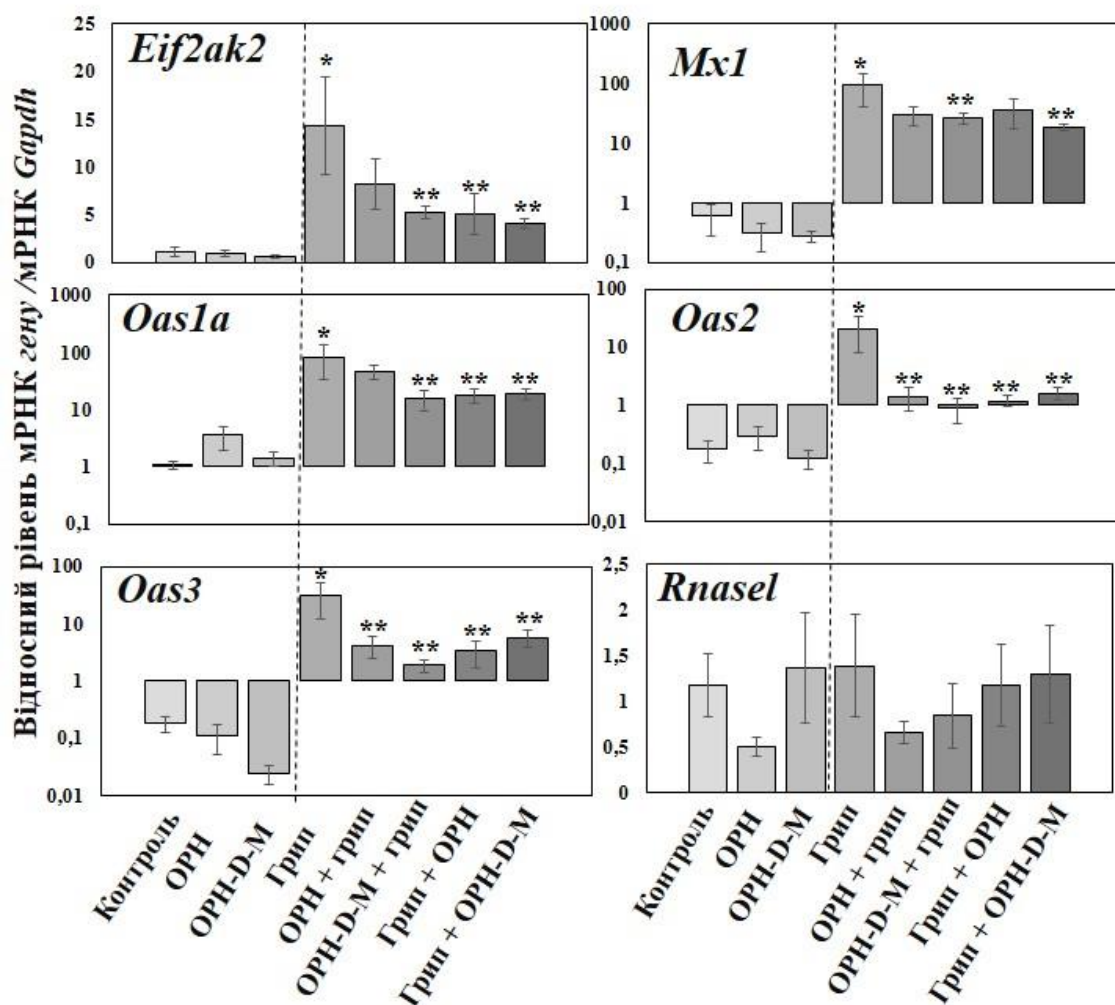
Така сама ситуація спостерігалася за умов лікування препаратами ОРН та ОРН-D-M грип-інфікованих тварин. Зокрема, рівні мРНК генів *Nos2*, *Xdh* та *Arg2* у інфікованих тварин знижувалися через 24 год після введення ОРН (у 2,4; 2,6 та 2 разів відповідно) та ОРН-D-M (на 44 %, у 2 рази та на 28 % відповідно) у порівнянні з групою «контроль вірусу грипу». Незміні рівні мРНК генів *Nos2*, *Xdh* та *Arg2* спостерігались у тварин, яким вводили ОРН та ОРН-D-M в якості контролю препаратів.

Під час інфекції вірусу грипу А Н1N1 у легенях мишей результатом оксидативно-нітрозативного стресу є підвищення рівня продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) у мембранах клітин (Nikam S.V. et al., 2010). Внаслідок ПОЛ виникають продукти, які реагують з тіобарбітуратами (ТБКАП), тому їх використовують як один із показників оксидативно-нітрозативного стресу (Asakawa T. et al., 1980). Нами було виявлено, що досліджувані препарати при профілактичній та лікувальній схемах введення дещо знижують грип-індукований рівень ПОЛ у тканинах легенів мишей (рис. 8, б).

Експресія гену може змінюватися на рівні мРНК, проте не змінюватися на рівні протеїну (Vogel C. et al., 2012). Враховуючи, що високий рівень ПОЛ є результатом надекспресії *Nos2*, *Xdh*, можна було очікувати, що вміст ТБКАП має бути нижчим у легенях інфікованих тварин після введення ОРН. Отримані дані вказують, що ОРН та ОРН-D-M можуть знижувати експресію *Nos2* та *Xdh* на рівні мРНК та протеїну у легенях мишей під час інфекції грипу. Одночасна нормалізація експресії генів *Nos2*, *Xdh* та *Arg2* вказує на опосередковану дію ОРН.

**Перешкодження грип-індукованої експресії ISG за дії ОРН та ОРН-D-M.** Вірусна інфекція у різних типах клітин індукує універсальний спектр генів захисту хазяїна – ISG, які кодують білки з противірусною дією (OAS/RNase L система, MX1 білок та PKR) (Villalon-Letelier F. et al., 2017). Ми припустили, що ОРН мають ефективну противірусну активність проти широкого спектру вірусів шляхом індукції експресії ISG. Однак, введення ОРН та ОРН-D-M здоровим тваринам не викликало підвищення експресії генів *Eif2ak2*, *Mx1*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oas3* та *Rnasel* (рис. 9). Навпаки, індуковані вірусом грипу рівні мРНК *Eif2ak2*, *Mx1*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oas3* (у 14, 155, 76, 114, 178 разів відповідно) знижувалися у тварин, яким вводили препарати ОРН та ОРН-D-M за профілактичною та лікувальною схемами (рис. 9). Наприклад, за умов лікування інфікованих мишей препаратами ОРН, рівень мРНК *Eif2ak2*, *Mx1*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oas3* знижувався на 43 %; у 3 рази; на 44 %; у 14,6; 7,8 разів відповідно, у той час коли препаратами ОРН-D-M - у 2,7; 3,4; 5,5; 23; 17 разів відповідно порівняно з контрольною групою інфікованих мишей. Рівень мРНК *Eif2ak2*, *Mx1*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oas3* у мишей після введення ОРН для профілактики грипу знижувався у 2,8; 2,6; 4,7; 17,2; 9,7 разів відповідно, тоді як введення ОРН-D-M за таких самих умов призводило до зниження рівня мРНК *Eif2ak2*, *Mx1*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oas3* у 3,5; 5; 4,4; 13; 5,5 разів відповідно у порівнянні з контролем інфікованих тварин. У цій серії дослідження рівень мРНК *Rnasel*,

залишався майже незмінним у всіх досліджуваних групах тварин у порівнянні з контрольною групою.



**Рис. 9.** Рівень мРНК генів системи ISG у легенях мишей BALB/c через 48 год після інфікування вірусом грипу A/FM/1/47/H1N1 та профілактичного (24 год до інфікування) або лікувального (24 год після інфікування) впливу ОРН або ОРН-D-M: \* – різниця порівняно з контролем,  $p < 0,05$ ; \*\* – різниця порівняно з інфекцією вірусу грипу,  $p < 0,05$

Результати експресії ISG вказують, що ОРН та ОРН-D-M не стимулюють імунний противірусний захист клітини хазяїна. Тоді як інгібування препаратами ОРН грип-індукованої експресії ISG може свідчити про вплив ОРН на IFN I типу.

**Експресія цитокінів та хемокінів за дії препаратів ОРН та ОРН-D-M в умовах інфекції вірусу грипу.** Відомо, що під час вірусної інфекції експресія прооксидантних генів та ISG регулюється цитокінами (Cox G.W. et al., 1992; Schoggins J.W., 2014). У тканинах легень тварин через 48 год після інфікування вірусом грипу A/FM/1/47/H1N1 було виявлено гіперекспресію рівнів мРНК генів *Ifna2*, *Ifnb1*, *Ifng*, *Il6*, *Il1b*, *Il12a*, *Tnfa*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11* (рис. 10, 11). Крім того, нами вперше показано індуковану вірусом грипу надекспресію генів *Ifne* та *Ifnk* на рівні мРНК.



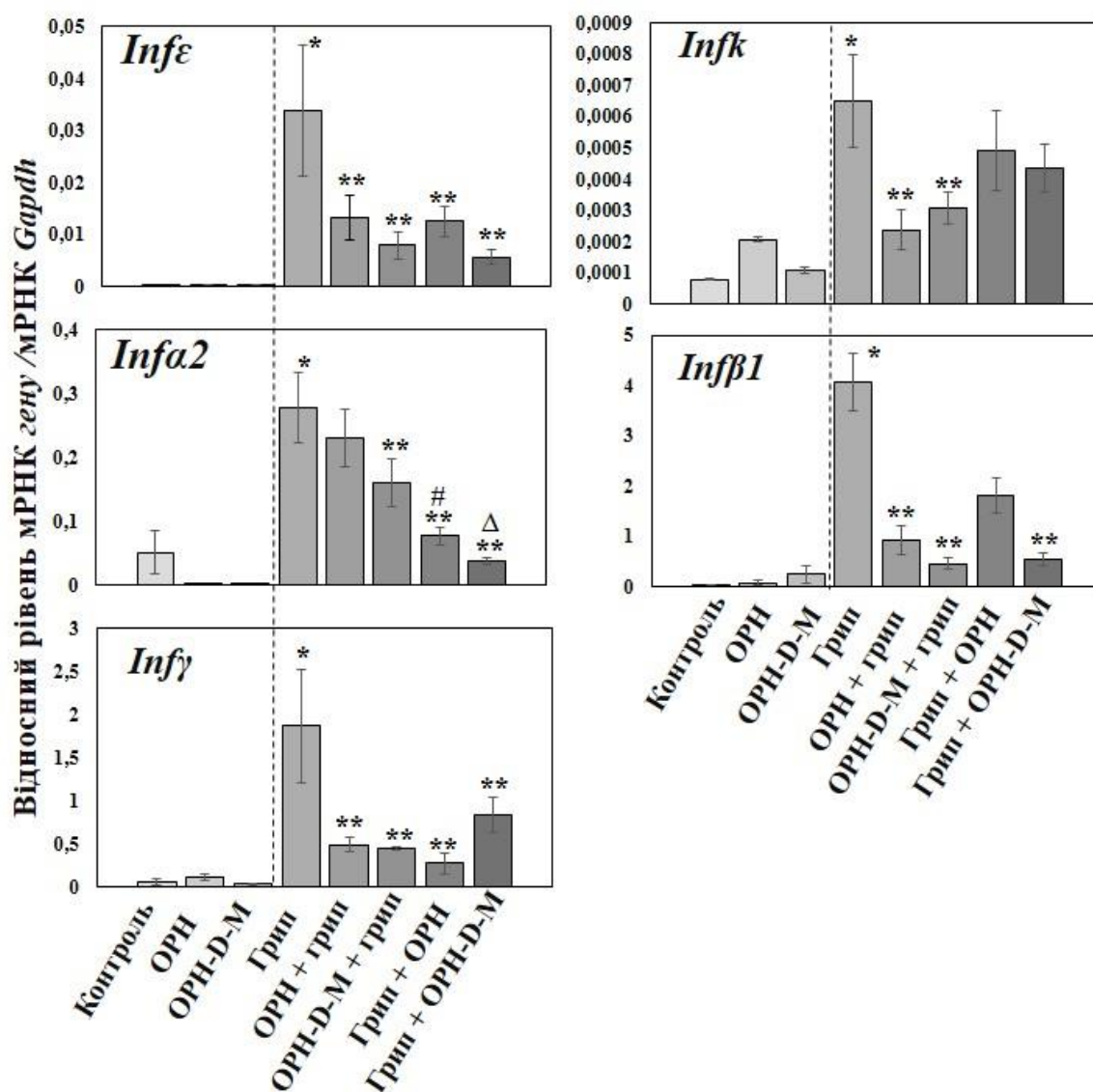


Рис. 10. Рівень мРНК IFN у легенях мишей BALB/c через 48 год після інфікування вірусом грипу A/FM/1/47/H1N1 та профілактичного (24 год до інфікування) або лікувального (24 год після інфікування) впливу ОРН або ОРН-D-M: \* – різниця порівняно з контролем,  $p < 0,05$ ; \*\* – різниця порівняно інфекцією вірусу грипу,  $p < 0,05$ ; # – різниця порівняно з профілактичною схемою застосування ОРН,  $p < 0,05$ ; Δ – різниця порівняно з профілактичною схемою застосування ОРН-D-M,  $p < 0,05$

Вивчення експресії 15 ключових генів цитокінів та хемокінів, після профілактичного та лікувального застосувань ОРН та ОРН-D-M під час інфекції вірусу грипу, показало зниження гіперекспресії мРНК *Ifne*, *Infk*, *Ifna2*, *Ifnb1*, *Ifny*, *Il6*, *Il1b*, *Il12a*, *Tnf*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10* та *Cxcl11* у легенях мишей (рис. 10, 11). Слід відзначити, що у групах контроль ОРН та ОРН-D-M нами спостерігався незмінний рівень експресії мРНК *Ifne*, *Infk*, *Ifna2*, *Ifnb1*, *Ifny*, *Il6*, *Il1b*, *Il12a*, *Tnfa*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10* та *Cxcl11* у легенях здорових мишей, на 24 години після введення ОРН та ОРН-D-M порівняно з контролем.

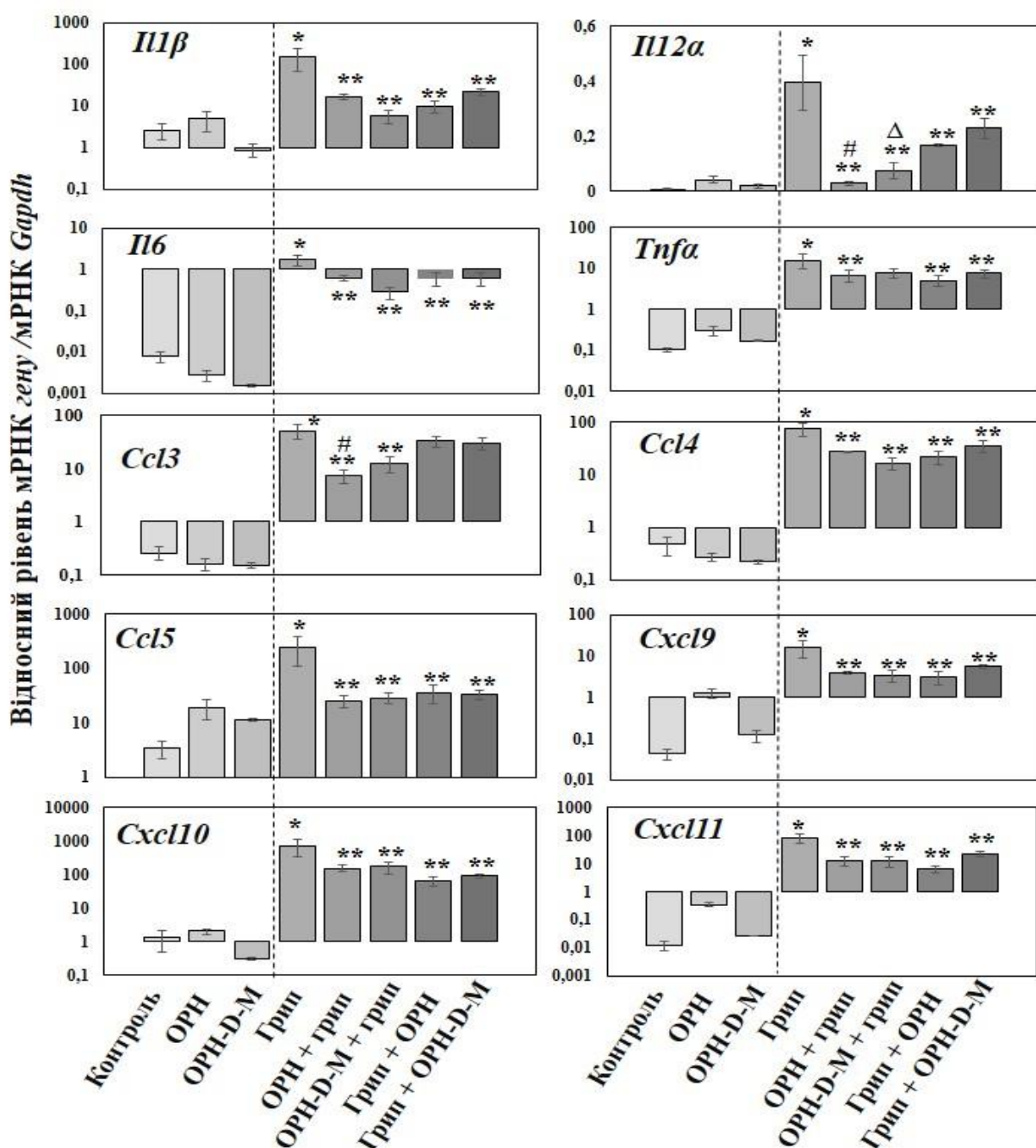
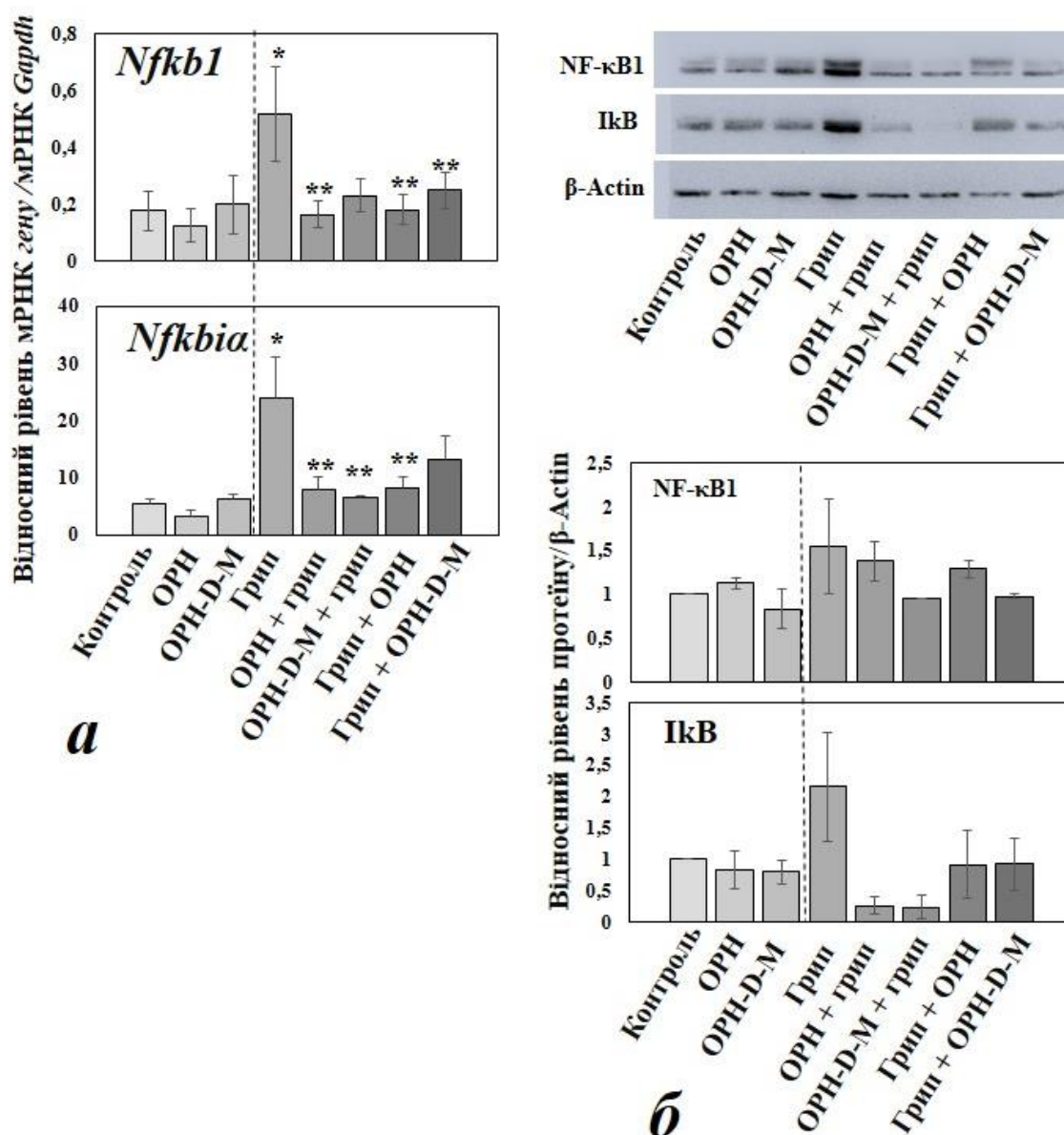


Рис. 11. Рівень мРНК про-запальних цитокінів та хемокинів у легенях мишей BALB/c через 48 год після інфікування вірусом грипу A/FM/1/47/H1N1 та профілактичного (24 год до інфікування) або лікувального (24 год після інфікування) впливу ОРН або ОРН-D-M: \* – різниця порівняно з контролем,  $p < 0,05$ ; \*\* – різниця порівняно з інфекцією вірусу грипу,  $p < 0,05$ ; # – різниця порівняно з лікувальною схемою застосування ОРН,  $p < 0,05$

Загалом дані змін експресії мРНК генів цитокінів, хемокинів узгоджуються з даними змін експресії мРНК ISG, прооксидантних генів у легенях мишей за дії препаратів ОРН та вірусу грипу. Отже, ОРН та ОРН-D-M знижують гіперекспресію цитокінів та хемокинів на рівні мРНК під час інфекції грипу.

**Експресія генів транскрипційного фактору NF-κB за умов інфікування вірусом грипу за дії ОРН та ОРН-D-M.** Високо експресований транскрипційний фактор NF-κB за умов інфекції вірусом грипу надрегулює експресію генів вродженого імунітету та бере участь у реплікації вірусу (Julkunen I. et al. 2001; Flory E. et al. 2000; Nimmerjahn F. et al. 2004). Згідно отриманих даних, рівень мРНК генів *Nfkb1* та *Nfkbia* у тканинах легенів мишей після 48-год інфекції грипу A/FM/1/47/H1N1 підвищується у 5 та 4,3 разів відповідно у порівнянні з групою контрольних тварин (рис. 12, а).



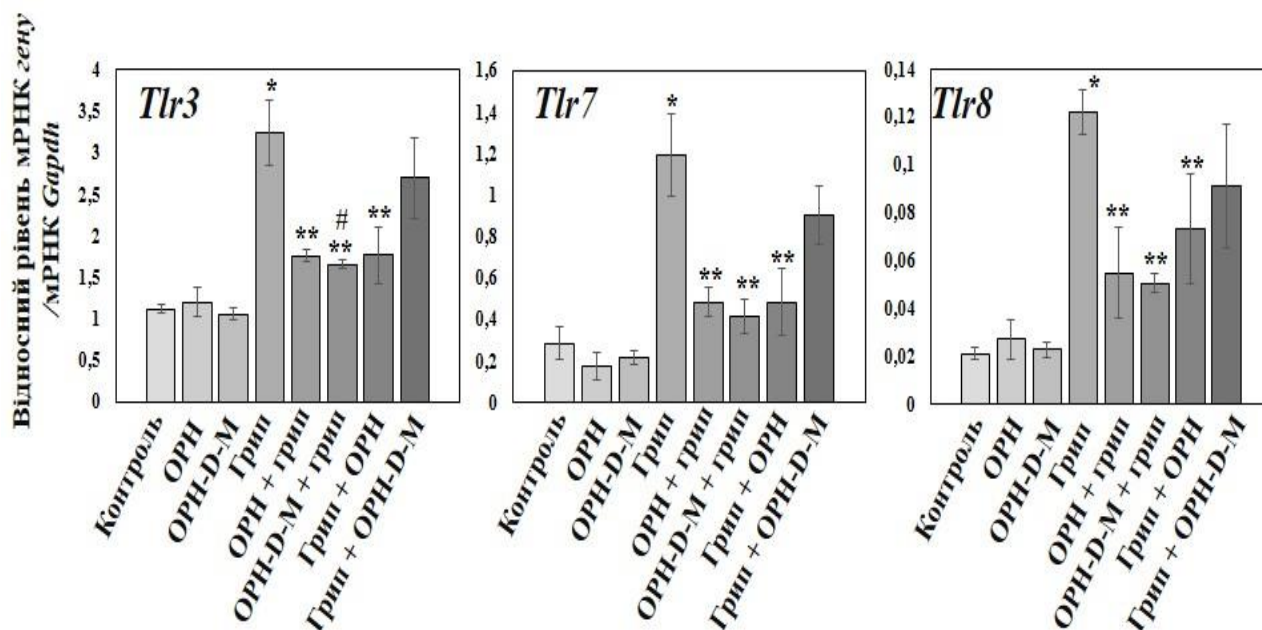
**Рис. 12.** Рівень мРНК (а) та протеїну (б) транскрипційного фактору NF-κB у легенях мишей BALB/c через 48 год після інфікування вірусом грипу A/FM/1/47/H1N1 та профілактичного (24 год до інфікування) або лікувального (24 год після інфікування) впливу ОРН або ОРН-D-M: \* – різниця порівняно з контролем,  $p < 0,05$ ; \*\* – різниця порівняно з інфекцією вірусом грипу,  $p < 0,05$

Після введення ОРН та ОРН-D-M тваринам для профілактики та лікування інфекції грипу (грип+ОРН, грип+ОРН-D-M, ОРН+грип, ОРН-D-M+грип) спостерігалось значне зниження рівнів мРНК *Nfkb1* (у 3,1; 2,5; 3; 2 разів відповідно) та *Nfkb1a* (у 3; 3,7; 3 разів; на 45 % відповідно) у порівнянні з інфікованими тваринами (рис. 12, а). У той же час, значних змін у рівнях мРНК генів *Nfkb1* та *Nfkb1a* після введення ОРН та ОРН-D-M неінфікованим тваринам не було виявлено.

Використовуючи аналіз на основі Вестерн-блотингу, було показано, що після 48-годинної інфекції грипу рівні протеїнів *Nfkb1* та *IκB* у легенях мишей були підвищені, тоді як після профілактики та лікування грипу з ОРН та ОРН-D-M рівні експресії білків *Nfkb1* та *IκB* були нижчими у порівнянні з грип-інфікованими мишами (рис. 12, б). Рівень експресії протеїнів даних генів залишався без змін у легенях неінфікованої групи тварин – контроль препаратів. Отримані дані вказують, що препарати ОРН знижують експресію *Nfkb1* та *Nfkb1a* генів на рівні транскрипції та трансляції, ймовірно впливаючи на паттерн-розпізнаючі рецептори, які індукують експресію багатьох генів вродженого імунітету через активацію NF-κB.

**Вивчення експресії генів паттерн-розпізнаючих рецепторів Tlr3, Tlr7 та Tlr8 за дії грипу та ОРН, ОРН-D-M.** Екзогенні олігонуклеотиди проникають у живі клітини за допомогою ендоситозних шляхів (Juliano R.L. et al. 2012). Одно- чи дволанцюгові олігонуклеотиди здатні зв'язуватися з TLR 3, 7, 8, які знаходяться у ендосомах клітин. Крім того, нуклеїнова кислота вірусу грипу розпізнається TLR 3, 7, 8 у ендосомах, що призводить до активації NF-κB та індукції експресії генів вродженого імунітету (Kawai T. et al. 2011). Дослідження впливу природних олігорибонуклеотидів на рецептори TLR 3, 7, 8 є важливою частиною вивчення можливого механізму протизапальної дії препаратів ОРН та ОРН-D-M.

Зміни рівнів мРНК генів *Tlr3*, *Tlr7*, *Tlr8* мали таку саму тенденцію як і рівні мРНК *Xdh*, *Nos2*, *Arg2*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oas3*, *Mx1*, *Eif2ak2*, *Ifnε*, *Ifnκ*, *Ifna2*, *Ifnβ1*, *Ifny*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Il6*, *Il1β*, *Il12α*, *Tnfa*, *Nfkb1* та *Nfkb1a*. Наприклад, рівень мРНК *Tlr3*, *Tlr7* та *Tlr8* зростав у 3, 4,3 та 6 разів відповідно у легенях мишей через 48 год після інфікування вірусом грипу у порівнянні з контролем (рис. 13). Рівень мРНК генів *Tlr3*, *Tlr7* та *Tlr8* достовірно знижувався при профілактичній схемі застосування ОРН (на 46 %, у 2,3 та 2,2 рази відповідно) та ОРН-D-M (у 2, 3, 2,4 рази відповідно) порівняно з групою інфікованих тварин. При лікуванні грипу препаратами також спостерігалось зниження рівня мРНК даних генів, однак лише у випадку лікування з ОРН було достовірне зниження мРНК *Tlr3*, *Tlr7* та *Tlr8* на 45,5 %, у 2,5 рази та на 42 % відповідно порівняно з контрольним інфікуванням вірусом грипу. Також виявлено, що при профілактиці грипу з ОРН-D-M експресія мРНК *Tlr3*, *Tlr7*, *Tlr8* нижча на 38, 46 та 44 % у порівнянні як при лікуванні грипу. Незмінна експресія мРНК генів *Tlr3*, *Tlr7*, *Tlr8* спостерігалася у тканинах легенів неінфікованих вірусом мишей після введення ОРН та ОРН-D-M.



**Рис. 13.** Рівень мРНК генів паттерн-розпізнаючих рецепторів *Tlr3*, *Tlr7* та *Tlr8* у легенях мишей BALB/c через 48 год після інфікування вірусом грипу А/ФМ/1/47/Н1N1 та профілактичного (24 год до інфікування) або лікувального (24 год після інфікування) впливу ОРН або ОРН-D-M: \* – різниця порівняно з контролем,  $p < 0,05$ ; \*\* – різниця порівняно з інфекцією вірусу грипу,  $p < 0,05$ ; # – різниця порівняно з лікувальною схемою застосування ОРН-D-M,  $p < 0,05$

Отже, за умов інфекції грипу пригнічення гіперекспресії *Tlr3*, *Tlr7*, *Tlr8* препаратами ОРН та ОРН-D-M може призводити до інгібування підвищення експресії TLR-стимульованих генів вродженого імунітету (*Nfkb1*, *Nfkbia*, *Ifne*, *Ifnk*, *Ifna2*, *Ifnb1*, *Ifny*, *Il6*, *Il1β*, *Il12α*, *Tnfa*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oas3*, *Mx1*, *Eif2ak2*, *Xdh*, *Nos2*, *Arg2*). Модуляція вродженої імунної відповіді на вірус грипу ОРН ймовірно відбувається шляхом перешкоджання активації сигнальних шляхів TLR-3, TLR-7 та TLR-8.

**Реплікація вірусу грипу А/ФМ/1/47/Н1N1 у тканині легенів мишей за дії препаратів ОРН та ОРН-D-M.** Нормалізація вродженої імунної відповіді на вірус грипу після введення препарату може сприяти його протигрипозній дії. Для перевірки цієї гіпотези, було досліджено інфекційний титр вірусу грипу у тканинах легенів у даній моделі експерименту.

Зниження інфекційного титру вірусу грипу було виявлено у легенях тварин, яким вводили ОРН та ОРН-D-M для профілактики та лікування інфекції грипу у порівнянні з групою контролю вірусу грипу. Однак інфекційний титр вірусу у інфікованих тварин після профілактики та лікування з ОРН та ОРН-D-M залишався високим, у той час як експресія генів вродженого імунітету суттєво знижувалася (Таблиця 1).



Таблиця 1.

Зниження інфекційного титру вірусу грипу A/FM/1/47/H1N1 у тканинах легенів грип-інфікованих мишей BALB/c після введення ОРН та ОРН-D-M за профілактичною та лікувальною схемами

Група	Інфекційний титр грипу, lgТЦД <sub>50</sub>
Контроль	0,0 ± 0,0
ОРН	0,0 ± 0,0
ОРН-D-M	0,0 ± 0,0
Грип	6,8 ± 0,1
ОРН + грип	4,8 ± 0,3
ОРН-D-M + грип	4,6 ± 0,6
Грип + ОРН	5,0 ± 0,2
Грип+ ОРН-D-M	5,4 ± 0,4

Таким чином, складається враження, що ОРН мають ефективнішу протизапальну дію порівняно з противірусною. Отже, ОРН та ОРН-D-M можуть одночасно інгібувати реплікацію вірусу грипу та ослаблювати надмірну імунну відповідь на вірус грипу.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі встановлено інгібування інфікування вірусом грипу клітин хазяїна природними олігорибонуклеотидами за умов *in vitro*. Встановлено, що препарати ОРН та ОРН-D-M перешкоджають індукції експресії генів вродженого імунітету у відповідь на інфекцію вірусом грипу за умов *in vivo*.

1. Встановлено, що природні ОРН та ОРН-D-M пригнічують інфекційність вірусом грипу (на 1 та 2 lg ТЦД<sub>50</sub> відповідно) у епітеліальних клітинах лінії MDCK шляхом блокування НА-гліканової взаємодії (у 2 та 4 рази відповідно).

2. Вперше описано сумарну флуоресценцію гемаглютиніну вірусом грипу та неспецифічну низькоафінну взаємодію ОРН та ОРН-D-M з НА. Зокрема, спостерігали взаємодію ОРН та ОРН-D-M з НА з відносно низькими константами дисоціації – 12,1 та 9,5 μM відповідно.

3. Вперше показано, що через 48 год після інфікування вірусом грипу A/Fort Monmouth/1/1947 (H1N1) у легенях мишей BALB/c підвищується експресія генів *Tlr3*, *Tlr7*, *Tlr8*, *Nfkb1*, *Nfkb1a*, *Ifnε*, *Ifnκ*, *Ifna2*, *Ifnb1*, *Ifnγ*, *Il6*, *Il1b*, *Il12a*, *Tnf*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oas3*, *Mx1*, *Eif2ak2*, *Xdh*, *Nos2*, *Arg2*.

4. Виявлено, що препарати ОРН та ОРН-D-M при профілактиці та лікуванні інфекції грипу знижують грип-індуковану надекспресію генів *Tlr3*, *Tlr7*, *Tlr8*, *Nfkb1*, *Nfkb1a*, *Ifnε*, *Ifnκ*, *Ifna2*, *Ifnb1*, *Ifnγ*, *Il6*, *Il1b*, *Il12a*, *Tnf*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oas3*, *Mx1*, *Eif2ak2*, *Xdh*, *Nos2*,

*Arg2* у легенях мишей BALB/c. При цьому самі препарати ОРН та ОРН-D-M не впливають на профілі експресії цих генів вродженого імунітету *in vivo*.

5. За умов інфекції вірусу грипу у легенях мишей показано, що пригнічення гіперекспресії мРНК *Tlr3*, *Tlr7*, *Tlr8* препаратами ОРН та ОРН-D-M призводить до перешкоджання підвищення експресії TLR-стимульованих генів вродженого імунітету.

### СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Melnichuk N.**, Semernikova L., Tkachuk Z. Complexes of Oligoribonucleotides with D-mannitol inhibit hemagglutinin–glycan interaction and suppress influenza A virus H1N1 (A/FM/1/47) infectivity in vitro // *Pharmaceuticals*. – 2017. – V. 10. – №3. – P. 1-9. (*Особистий внесок дисертанта – постановка та проведення експерименту, обробка та аналіз отриманих результатів, написання статті*).

2. **Мельнічук Н.**, Ткачук З. Інгібування гемаглютенін-гліканової взаємодії комплексами олігорибонуклеотидів з D-манітолом // *Допов. Нац. Акад. Наук Укр.* – 2018. – № 1. – С. 92-99. (*Особистий внесок дисертанта – постановка та проведення експерименту, обробка та аналіз отриманих результатів, написання статті*).

3. **Melnichuk N.**, Zarubaev V., Iosyk I., Andreychyn M., Semernikova L., Tkachuk Z. Pre-clinical and clinical efficiency of complexes of oligoribonucleotides with D-mannitol against respiratory viruses // *Pharmaceutics*. – 2018. – V. 10. – № 59. – P. 1-11. (*Особистий внесок дисертанта – разом із співавторами обробка та аналіз отриманих результатів, написання статті*).

4. **Melnichuk N.**, Rybalko S.L., Tkachuk Z.Yu. Impaired up-expression of pro-oxidation genes by oligoribonucleotides at influenza a virus infection in vivo // *Mikrobiol. Z.* – 2018. – V. 80. – № 4. – P. 88-95. (*Особистий внесок дисертанта – разом із співавторами постановка та проведення експерименту, проведення ПЛР-РЧ, визначення рівня ПОЛ, обробка та аналіз отриманих результатів, написання статті*).

5. **Melnichuk N.**, Kashuba V., Rybalko S., Tkachuk Z. Complexes of Oligoribonucleotides with D-mannitol modulate the innate immune response to influenza A virus H1N1 (A/FM/1/47) in vivo // *Pharmaceuticals*. – 2018. – V. 11. – № 73. – P.1-16. (*Особистий внесок дисертанта – разом із співавторами постановка та проведення експерименту, проведення ПЛР-РЧ, визначення рівня ПОЛ, вестерн блот, обробка та аналіз отриманих результатів, написання статті*).

6. **Melnichuk N.**, Vivcharyk M., Tkachuk Z. Effect of Oligoribonucleotides-D-mannitol complex on the hemagglutinin of influenza A (H1N1) virus // *Abstracts of 8th International Conference Bioresources and Viruses*. – Kyiv, Ukraine. –2016. – P. 45-46.

7. **Melnichuk N.**, Vivcharyk M., Tkachuk Z. Effects of Oligoribonucleotides-D-mannitol complexes on the hemagglutinin-glycan

interactions // In Proceedings of the 2nd Int. Electron. Conf. Med. Chem. Sciforum Electronic Conference Series. – 2016. – Vol. 2. – P.1-10.

8. **Мельнічук Н.**, Семерникова Л., Яковенко Т., Ткачук З. Пригнічення інфекційності вірусу грипу H1N1 A/FM 1/47 комплексами олігорибонуклеотидів з D-манітолом // Матеріали V науково-практичної конференції школи молодих науковців ПАТ «Фармак». – Київ, Україна. 2017. – С. 52-53.

9. **Melnichuk N.**, Semernikova L., Tkachuk Z. Study on oligoribonucleotides-D-mannitol complexes effects on the influenza A virus H1N1 (A/FM/1/47) infectivity in vitro and expression of some host genes under the influenza infection in vivo // Materials of XI annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Biopolymers and Cell. – 2017. – Vol. 33. – N 3. – P. 229.

10. **Melnichuk N.**, Rybenchuk A., Tkachuk Z. Analysis of oligoribonucleotides influence on the expression of some genes of antiviral defense in vivo // IX Conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics NASU dedicated to 160th Anniversary of M. F. Kastschenko. — Kyiv, Ukraine. – 2015. – P. 59.

11. **Melnichuk N.**, Rybenchuk A., Gerashchenko G., Kashuba V., Semernikova L., Yakovenko T., Tkachuk Z. Oligoribonucleotide effects on the influenza virus in vitro and expression of the *nos2*, *arg2*, *xhd*, *nfkbia*, *nfkbl* genes at the influenza virus infection in vivo // Abstracts of X Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Biopolymers and Cell. – 2016. – Vol. 32. – N 5. – P. 401.

12. **Melnichuk N.**, Kashuba V., Tkachuk Z. Oligoribonucleotide effects on expression of *nos2*, *arg2*, *xhd*, *nfkbia*, *nfkbl* genes under condition influenza virus infection in vivo // Abstracts of X Parnas Conference, Acta Biochimica Polonica. – Wroclaw, Poland. – 2016. – Vol. 63 (Suppl. 1). – P.11.

13. **Melnichuk N.**, Semernikova L., Tkachuk Z. Change of some genes expression in mice lung after prevention and treatment with oligoribonucleotides-D-mannitol complexes of influenza A virus H1N1 (A/FM/1/47) infection // Abstracts of 7th International Weigl Conference. – Lviv, Ukrain. – 2017. – P. 50.

14. **Melnichuk N.**, Tkachuk Z. Influence of the Oligoribonucleotides-D-mannitol Complexes on Upexpression of some Genes Induced by Influenza Virus *in vivo* // In Proceedings of the 3rd Int. Electron. Conf. Med. Chem. Sciforum Electronic Conference Series. – 2017. – Vol. 3. – P.1-15.

15. **Melnichuk N.**, Kashuba V., Rybalko S., Tkachuk Z. Modulating the innate immune response to influenza A virus (A/FM/1/47) by complexes of oligoribonucleotides with D-mannitol // Abstracts of XI Parnas Conference, Ukr. Biochem. J. – Kyiv, Ukraine. – 2018. – V. 90. – P. 50.

16. **Мельнічук Н.**, Ткачук З. Influence of complexes of oligoribonucleotides with D-mannitol on the innate immune response to influenza a virus H1N1 // Матеріали VI науково-практичної конференції школи молодих науковців ПАТ «Фармак». – Київ, Україна. – 2018. – С. 20-21.



17. **Melnichuk N., Kashuba V., Rybalko S., Tkachuk Z.** Complexes of oligoribonucleotides with d-mannitol normalize toll-like receptors-associated innate immune response to influenza a virus // *Матеріали XII українського біохімічного конгресу, Медична та клінічна хімія.* – Тернопіль, Україна. – 2019. – Т. 21, №3. – С. 217.

### АНОТАЦІЯ

**Мельнічук Н.С.** Вплив олігорибонуклеотидів на інфекційність вірусу грипу *in vitro* та грип-індуковану експресію генів вродженого імунітету *in vivo*. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.03 «Молекулярна біологія». – Інститут молекулярної біології та генетики Національної Академії Наук України, Київ, 2021.

Дисертаційна робота присвячена вивченню можливого інгібування інфекційності вірусу грипу шляхом взаємодії ОРН з НА та перешкоджання ОРН гіперекспресії генів вродженого імунітету у відповідь на інфекцію вірусу грипу.

Вперше показано, що препарати ОРН мають пряму інактивуючу дію на вірус грипу A/FM/1/47/H1N1, яка проявлялася у інгібуванні цитопатичної дії вірусу грипу у клітинах MDCK. З'ясовано, що ОРН та ОРН-D-M знижують інфекційність вірусу грипу та інгібують зв'язування білків НА вірусу грипу до залишків сілової кислоти гліканів еритроцитів. На ізольованому НА, показано взаємодію між НА і ОРН, ОРН-D-M з доволі низькою афінністю, яка призводить до інгібування активності НА.

Досліджено, що вірус грипу штаму A/FM/1/47/H1N1 викликає гіперекспресію мРНК генів уродженого імунітету (*Xdh, Nos2, Arg2, Oas1a, Oas2, Oas3, Mx1, Eif2ak2, Ifnε, Ifnk, Ifna2, Ifnβ1, Ifny, Ccl3, Ccl4, Ccl5, Cxcl9, Cxcl10, Cxcl11, Il6, Il1β, Il12α, Tnfa, Nfkb1, Nfkbia, Tlr3, Tlr7* та *Tlr8*) у тканинах легень мишей лінії BALB/c. Вперше визначено підвищену експресію мРНК *Ifnε, Ifnk* за умов інфекції грипу у тканинах легень мишей. Введення ОРН та ОРН-D-M мишам за профілактичною та лікувальною схемами призводило до зниження рівнів мРНК генів вродженого імунітету, чия транскрипція була індукованою грипом. Ослаблення надекспресії генів вродженого імунітету (*Nfkb1, Nfkbia, Xdh, Nos2*) терапевтичними ОРН спостерігалось також на рівні трансляції. Запропоновано, що за умов інфекції вірусу грипу у легенях мишей препарати ОРН та ОРН-D-M пригнічують гіперекспресію *Tlr3, Tlr7, Tlr8*, яка призводить до перешкоджання підвищення експресії TLR-стимульованих генів вродженого імунітету. Природні ОРН інгібують інфекційність вірусу грипу за рахунок взаємодії з НА та модулюють надмірну вроджену імунну відповідь на вірус грипу шляхом взаємодії з TLR-3, TLR-7, TLR-8.

**Ключові слова:** природні олігорибонуклеотиди, комплекси олігорибонуклеотидів з D-манітолом, вірус грипу, білок-лігандна взаємодія, експресія генів вродженого імунітету.

## АННОТАЦИЯ

**Мельничук Н.С. Влияние олигорибонуклеотидов на инфекционность вируса гриппа *in vitro* и грипп-индуцированной экспрессии генов врожденного иммунитета *in vivo*.** - Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук (доктора философии) по специальности 03.00.03 «Молекулярная биология». - Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2021.

Диссертационная работа посвящена изучению возможного ингибирования инфекционности вируса гриппа путем взаимодействия ОРН с НА и препятствование ОРН гиперэкспрессии генов врожденного иммунитета в ответ на инфекцию вируса гриппа.

Впервые показано, что препараты ОРН имеют прямое инактивирующее действие на вирус гриппа А/М/1/47/Н1N1, которое проявлялось в подавлении цитопатического действия вируса гриппа в клетках MDCK. Выяснено, что ОРН и ОРН-D-M снижают инфекционность вируса и ингибируют связывание белков НА вируса гриппа к остаткам сиаловой кислоты гликанов эритроцитов. На изолированном НА показано взаимодействие между НА и ОРН, ОРН-D-M с довольно низкой афинностью, которое приводит к ингибированию активности НА.

Доказано, что вирус гриппа штамма А/М/1/47/Н1N1 вызывает гиперэкспрессию мРНК генов врожденного иммунитета (*Xdh*, *Nos2*, *Arg2*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oas3*, *Mx1*, *Eif2ak2*, *Ifnε*, *Ifnk*, *Ifna2*, *Ifnβ1*, *Ifnγ*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Il6*, *Il1β*, *Il12a*, *Tnfa*, *Nfkb1*, *Nfkbia*, *Tlr3*, *Tlr7* и *Tlr8*) в тканях легких мышей линии BALB/c. Впервые определена повышенная экспрессию мРНК *Ifnε*, *Ifnk* в условиях гриппа в тканях легких мышей. Введение ОРН и ОРН-D-M мышам с профилактической и лечебной схемам приводило к снижению уровней мРНК генов врожденного иммунитета, чья транскрипция была индуцированной гриппом. Ослабление надэкспрессии генов врожденного иммунитета (*Nfkb1*, *Nfkbia*, *Xdh*, *Nos2*) терапевтическими ОРН наблюдалось также на уровне трансляции. Предложено, что при инфекции вируса гриппа в легких мышей препараты ОРН и ОРН-D-M подавляют гиперэкспрессию *Tlr3*, *Tlr7*, *Tlr8*, которая приводит к препятствованию повышения экспрессии TLR-стимулированных генов врожденного иммунитета. Природные ОРН ингибируют инфекционность вируса гриппа за счет взаимодействия с НА и модулируют чрезмерный ответ врожденного иммунитета на вирус гриппа путем взаимодействия с TLR-3, TLR-7, TLR-8.

**Ключевые слова:** природные олигорибонуклеотиды, комплексы олигорибонуклеотидов с D-маннитол, вирус гриппа, белок-лигандное взаимодействие, экспрессия генов врожденного иммунитета.

## SUMMARY

**Melnichuk N.S. Effect of oligoribonucleotides on infectivity of influenza virus *in vitro* and influenza-induced expression of innate immunity genes *in vivo*** – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

Thesis for obtaining the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, speciality 03.00.03 – Molecular Biology. – Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

The manuscript is dedicated to the study of possible inhibition of influenza virus infectivity by interaction of the ORNs with HA and prevention of the overexpression of the innate immunity genes in response to the influenza virus infection by the ORNs.

For the first time it has been shown, that the ORNs have the direct virucidal action on the influenza virus A/FM/1/47/H1N1, which manifested in the suppression of the cytopathic action of influenza virus in MDCK cells. It was also found that ORNs and ORNs-D-M reduce the virus infectivity and have an inhibitory effect on the binding of influenza HA proteins to sialic acid residues of erythrocyte glycans. Experiments with isolated HA demonstrated the interaction between HA and ORNs, ORNs-D-M with a quite low affinity, which leads to the inhibition of HA activity.

It was found out that the influenza virus A/FM/1/47/H1N1 causes hyperexpression mRNA of innate immunity genes (*Xdh*, *Nos2*, *Arg2*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oas3*, *Mx1*, *Eif2ak2*, *Ifnε*, *Ifnk*, *Ifna2*, *Ifnβ1*, *Ifnγ*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Il6*, *Il1β*, *Il12α*, *Tnfa*, *Nfkb1*, *Nfkbia*, *Tlr3*, *Tlr7* та *Tlr8*) in the lungs tissue of BALB/c mice. Up-regulation of *Ifnε* and *Ifnk* mRNA expression in lung tissues of influenza-infected mice was determined for the first time. The both prevention and treatment of the influenza infection with the ORNs and ORNs-D-M decrease the mRNA levels of the innate immunity genes, whose transcription was induced by the influenza virus. The attenuated upregulation of the innate immunity genes (*Nfkb1*, *Nfkbia*, *Xdh*, *Nos2*) by the therapeutic ORNs was also observed at the translational level. It has been suggested that the ORNs and ORNs-D-M inhibit the overexpression mRNA of the *Tlr3*, *Tlr7*, *Tlr8* that leads to suppression of the up-regulation of TLR-stimulated innate immune genes during the influenza in the mice lungs. The natural ORNs inhibit the infectivity of influenza virus by interaction with the HA and modulate the innate immune response to the influenza virus infection by interaction with the TLR-3, TLR-7, TLR-8.

**Key Words:** natural oligoribonucleotides, complexes oligoribonucleotides with D-mannitol, influenza virus, protein-ligand interaction, innate immunity genes expression.