

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

МЕЛЬНІЧУК Наталія Сергіївна

УДК 577.113:578.23:578.24

ДИСЕРТАЦІЯ

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

03.00.03 – молекулярна біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
_____ Н. С. Мельнічук

Науковий керівник: **Ткачук Зеновій Юрійович**, кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник

Київ – 2021

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.

Грип – гостре інфекційне захворювання, спричинене вірусом грипу. За оцінками Всесвітньої організації охорони здоров'я, сезонний вірус грипу А спричиняє до 500 тисяч смертей щороку. Основною причиною смерті пацієнтів від грипу є цитокіновий шторм. Показано, що летальна дія інфекції вірусу грипу детермінована швидше іммунопатологічними наслідками хазяїна ніж прямою цитопатичною дією вірусної реплікації. Цитокіновий шторм або гіперпродукція цитокінів призводить до надмірного запалення, набряку, дисфункції та пошкодження тканин легенів і є результатом вродженої імунної відповіді клітин хазяїна на вірус грипу. 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 в альвеолярний простір та оксидативно-нітрозативно-опосередковані пошкодження у тканинах легенів. Тому використання терапевтичного препарату для ослаблення вродженої імунної відповіді у поєднанні з противірусною дією може призвести до зменшення симптомів та пошкодження тканин легенів, які спричинені вірусом грипу.

Постійна мінливість НА вірусу грипу забезпечує безперервну еволюцію нових штамів вірусу грипу та епідемії грипу, що у свою чергу ускладнює підбір

відповідної вакцини. У зв'язку з відсутністю інгібіторів НА та резистентністю вірусу грипу до існуючих ліцензійних протигрипозних препаратів, актуальним завданням для дослідників є пошук та розробка протигрипозного препарату з іншим механізмом дії, а саме, здатного інгібувати активність НА та перешкоджати надмірній вродженій імунній відповіді.

Природні олігорибонуклеотиди (ОРН) та їхні комплекси з D-манітолом (ОРН-D-M) мають противірусну дію проти широкого спектру ДНК- та РНК-вірусів. Показано, що ОРН-D-M є ефективним протизапальним препаратом, який може застосовуватися як кардіо- та гепатопротектор. Доклінічні та клінічні дослідження свідчать про протигрипозну дію ОРН-D-M. Однак механізм одночасної протизапальної та протигрипозної дії ОРН-D-M залишається досі незрозумілим.

Тому представлена дисертація присвячена вивченню впливу ОРН та їхніх комплексів ОРН-D-M на інфекційність вірусу грипу *in vitro* та індуковану експресію генів вродженого імунітету у відповідь на інфекцію вірусу грипу *in vivo*.

Аналіз життєздатності клітин MDCK після інфікування вірусом грипу, який попередньо інкубували з препаратами ОРН та ОРН-D-M показав зниження цитопатичної дії вірусу грипу та високу життєздатність клітин. Більше того, показано, що природні ОРН та ОРН-D-M можуть знижувати інфекційний титр вірусу грипу A/FM/1/47/H1N1. Отримані результати стали передумовою для подальшого дослідження впливу препаратів ОРН на активність НА вірусу грипу та вперше показали пряму інактивуючу дію ОРН та ОРН-D-M на вірус грипу A/FM/1/47/H1N1.

З'ясовано, що ОРН та ОРН-D-M інгібують зв'язування білків НА вірусу грипу до залишків сілової кислоти гліканів еритроцитів. Таким чином показано, що ОРН та ОРН-D-M знижують активність НА вірусу грипу, що перешкоджає НА-глікановій взаємодії та знижує інфекційний титр вірусу.

Використання ізольованого НА дозволило встановити зниження активності НА після інкубації з ОРН та ОРН-D-M у 32 рази. Також показано

тривале та незворотне інгібування активності НА препаратом ОРН-D-M, яке ймовірно свідчить про здатність природних олігорибонуклеотидів змінювати конформацію НА. Аналіз флуоресцентної спектроскопії показав гасіння інтенсивності флуоресценції НА після титрування з ОРН та ОРН-D-M з константами дисоціації у мікромольних кількостях вказуючи на взаємодію між НА і ОРН, ОРН-D-M з доволі низькою афінністю. Додатково 3D-спектри флуоресценції НА-ОРН та НА-ОРН-D-M показали утворення нового флуоресцентного компонента, який ймовірно демонструє зміни у конформації НА. Суттєвіший вплив ОРН-D-M на НА забезпечується D-манітолом шляхом стабілізації ОРН. Отримані результати дозволи нам припустити, що ОРН та їхні комплекси ОРН-D-M потенційно можуть зв'язуватися до амінокислот на або біля глікан зв'язуючого регіону НА, який необхідний для проникнення вірусу грипу у клітину хазяїна, змінюючи його конформацію і таким чином проявляти протигрипозну дію.

Зниження інфекційності пандемічного вірусу грипу A/CA/7/09/H1N1 та пташиного вірусу грипу A/MP/10218/84/H5N2 під дією комплексів ОРН-D-M показало, що неспецифічна взаємодія досліджуваних олігорибонуклеотидів з НА може забезпечити подолання резистентності вірусу грипу.

Дослідження відносної експресії генів вродженого імунітету показало, що вірус грипу штаму A/FM/1/47/H1N1 індукує гіперекспресією мРНК *Xdh*, *Nos2*, *Arg2*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oas3*, *Mx1*, *Eif2ak2*, *Ifnε*, *Ifnk*, *Ifnα2*, *Ifnβ1*, *Ifnγ*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Il6*, *Il1β*, *Il12α*, *Tnfa*, *Nfkb1*, *Nfkb1a*, *Tlr3*, *Tlr7* та *Tlr8* у тканинах легенів мишей лінії BALB/c через 48 год після інфікування. Вперше визначено підвищену експресію мРНК *Ifnε*, *Ifnk* за умов грипу у тканинах легенів мишей.

Введення ОРН та ОРН-D-M мишам за профілактичною та лікувальною схемами призводило до зниження рівнів мРНК генів *Xdh*, *Nos2*, *Arg2*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oas3*, *Mx1*, *Eif2ak2*, *Ifnε*, *Ifnk*, *Ifnα2*, *Ifnβ1*, *Ifnγ*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Il6*, *Il1β*, *Il12α*, *Tnfa*, *Nfkb1*, *Nfkb1a*, *Tlr3*, *Tlr7* та *Tlr8*, чия транскрипція була індукованою вірусом грипу. Ослаблення надрегуляції *Nfkb1*,

Nfkb1a, *Xdh*, *Nos2* терапевтичними олігорибонуклеотидами спостерігалось також на рівні трансляції. Інгибування підвищення рівнів мРНК деяких генів вродженого імунітету у відповідь на вірус грипу було суттєвішим за умови профілактики грипу ОРН та ОРН-D-M. Було виявлено, що результати відносної експресії генів вродженого імунітету узгоджуються з даними реплікації вірусу грипу у тканинах легенів. Отримані результати дозволяють припустити, що ОРН та ОРН-D-M інгибують гіперекспресію *Tlr3*, *Tlr7*, *Tlr8*, яка індукується вірусом грипу, перешкоджаючи гіперекспресії генів NF-κB, цитокінів, хемокінів, ISG та прооксидантів шляхом інгибування активації сигнальних шляхів TLR-3, TLR-7 та TLR-8. Природні олігорибонуклеотиди модулюють вроджену імунну відповідь на вірус грипу шляхом взаємодії з TLR-3, TLR-7 та TLR-8.

Отримані результати дозволяють припустити, що природні ОРН виступаючи інгібітором НА є ефективним протигрипозним препаратом. Протизапальна дія терапевтичних олігорибонуклеотидів забезпечує нормалізацію імунопатологічних наслідків грипу шляхом інгибування активації TLR-асоційованих сигнальних шляхів.

Отже, у дисертаційній роботі встановлено інгибування інфікування вірусом грипу клітин хазяїна природними олігорибонуклеотидами за умов *in vitro*. Виявлена низькоафінна взаємодія ОРН та ОРН-D-M з НА та підтверджено інгибування активності НА, який є невід'ємним елементом інфекційності вірусу грипу. Встановлено, що препарати ОРН та їхні комплекси ОРН-D-M перешкоджають індукції експресії генів вродженого імунітету у відповідь на інфекцію вірусом грипу у тканинах легенів за умов *in vivo*. Показано, що застосування ОРН та ОРН-D-M за профілактичною схемою введення призводило до суттєвого зниження гіперекспресії генів вродженого імунітету за умов грипу.

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

Список публікацій здобувача:

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.
2. **Мельнічук Н., Ткачук З.** Інгібування гемаглютенін-гліканової взаємодії комплексами олігорибонуклеотидів з D-манітолом // *Допов. Нац. Акад. Наук Укр.* – 2018. – № 1. – С. 92-99.
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 // *Pharmaceuticals*. – 2018. – V. 10. – № 59. – P. 1-11.
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.
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.
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. **Melnychuk 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. **Melnychuk 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. **Melnychuk 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, xdh, nfkb1a, nfkb1 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. **Melnychuk N.**, Kashuba V., Tkachuk Z. Oligoribonucleotide effects on expression of nos2, arg2, xdh, nfkb1a, nfkb1 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. **Melnychuk 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.

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.

Influenza is an infectious disease caused by an influenza virus. According to the World Health Organization, a seasonal influenza A virus causes 500,000 deaths each year. Cytokine storm is known to be the main cause of death of patients from influenza. It has been shown that the lethal effect of influenza virus infection is determined more by the host immunopathological effects than by the direct cytopathic action of viral replication. Cytokine storm or cytokine hyperproduction leads to excessive inflammation, swelling, dysfunction and damage of lung tissues and is the result of host's innate immune cells response to influenza virus. Activation of the innate immune response to influenza occurs by binding of the viral nucleic acid to TLR 3, 7 and 8 leading to activation of the transcription factor NF- κ B and activation of the NF- κ B dependent production of the cytokines and chemokines. Overproduction of the cytokines causes the recruitment of immune cells into the alveolar space and oxidative-nitrosative-mediated lung tissue damage. Therefore, using a therapeutic drug to impair the innate immune response in combination with antiviral action has the potential to diminish symptoms and tissue damage caused by the influenza virus infection.

The constant variability of the HA of influenza virus ensures the continuous evolution of new influenza virus strains and an influenza epidemics, which makes it difficult to select appropriate vaccine strains. Due to the absence of HA inhibitors and resistance of the influenza virus to the licensed anti-influenza drugs, the HA is a promising target to create a new anti-influenza drug. So anti-influenza therapeutic

agents with HA inhibit activity and attenuate excessive the innate immune responses to the influenza virus are needed.

Natural oligoribonucleotides (ORNs) and their complexes with D-mannitol (ORNs-D-M) have antiviral action against a wide range of the DNA and RNA viruses. The ORNs-D-M are shown to be an effective anti-inflammatory drug that can be used as a cardio- and hepatoprotector. Pre-clinical and clinical studies have demonstrated the anti-influenza effect of the ORNs-D-M. However, the ORNs-D-M mechanisms of both antiviral and anti-inflammatory activities are still not clear.

Therefore, the manuscript is dedicated to study effects of the ORNs and their complexes (ORNs-D-M) on infectivity of the influenza virus *in vitro* and overexpression of the innate immunity genes caused by the influenza virus infection *in vivo*.

Using viability analysis of the MDCK cells infected with the influenza virus, which had been pre-incubated with the ORNs and ORNs-D-M, showed decrease cytopathic effects of the influenza virus and a high cell viability. Moreover, it has been shown that the natural ORNs and ORNs-D-Ms can reduce the infectious titer of A/FM/1/47/H1N1 influenza virus. The results obtained were precondition for further investigation of the effect of ORNs drugs on influenza virus activity and they showed the direct action of the ORNs and ORNs-D-M on the A/FM/1/47/H1N1 influenza virus at the first time.

The ORNs and ORNs-D-M have been shown to have an inhibitory effect on the binding of the influenza virus proteins HA to the sialic acid residues of erythrocyte glycans. Thus, it is shown that the ORNs and ORNs-D-M reduce the HA activity of influenza virus leading to blocking the HA-glycan interaction and reduces the virus infectivity.

The use of isolated HA allowed to study the decreased HA activity by 32 times after incubation with the ORNs and ORNs-D-M. It also has shown the long and irreversible HA activity inhibition by the ORNs-D-M, which is likely to indicate the ability of natural oligoribonucleotides to change the HA conformation. Analysis of fluorescence spectroscopy showed the quenching of the HA fluorescence intensity,

after ORNs and ORN-D-M titration, with micromolar dissociation constants that indicates the interaction between the HA and the ORNs, ORNs-D-M with low-affinity. Additionally, the 3D fluorescence spectra of the HA-ORNs and HA-ORNs-D-M indicated the new fluorescence component, which probably demonstrates some changes in the HA conformation. By stabilizing the ORN, the D-mannitol provides significantly effect of the ORNs-D-M on HA. The obtained results suggest that the ORNs and their complexes can potentially bind to an amino acids at or around the glycans binding region of HA required for the penetration of the influenza virus into host cells, changing its conformation and in this manner have the anti-influenza activity.

Decreasing infectivity of the pandemic influenza virus A/CA/7/09/H1N1 and avian influenza virus A/MP/10218/84/H5N2 by the ORNs-D-M complexes showed that influenza virus will not able to develop resistance to the oligoribonucleotides because of non-specific interaction of the investigated oligoribonucleotides with HA.

The study of the relative expression of the innate immunity genes showed that the influenza virus A/FM/1/47/H1N1 induces the mRNA overexpression of *Xdh*, *Nos2*, *Arg2*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oas3*, *Mx1*, *Eif2ak2*, *Ifnε*, *Ifnk*, *Ifnα2*, *Ifnβ1*, *Ifnγ*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Il6*, *Il1β*, *Il12α*, *Tnfa*, *Nfkb1*, *Nfkbia*, *Tlr3*, *Tlr7* and *Tlr8* in mice lung tissues after 48 hours infection. For the first time increased the mRNA expression of *Ifnε*, *Ifnk* was identified in influenza-infected mice lung tissues.

The both prevention and treatment with the ORNs and ORNs-D-M of the influenza infection decrease the mRNA levels of *Xdh*, *Nos2*, *Arg2*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oas3*, *Mx1*, *Eif2ak2*, *Ifnε*, *Ifnk*, *Ifnα2*, *Ifnβ1*, *Ifnγ*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Il6*, *Il1β*, *Il12α*, *Tnfa*, *Nfkb1*, *Nfkbia*, *Tlr3*, *Tlr7* and *Tlr8*, whose transcription was induced by the influenza virus. The attenuation upregulation of the *Nfkb1*, *Nfkbia*, *Xdh*, *Nos2* by the therapeutic oligoribonucleotides was also observed at translational level. Impair up-expression of mRNA levels of some innate immunity genes in response to the influenza virus was more significant when the ORNs and ORNs-D-M injected for prevention compared to the injected for treatment. The results of the relative expression of innate immunity genes have been found to be

consistent with the data of the influenza virus replication in the lung tissues. The results suggest that the ORNs and ORNs-D-M inhibit the overexpression *Tlr3*, *Tlr7*, *Tlr8* induced by the influenza virus infection, suppress the up-regulation of NF- κ B, cytokines, chemokines, ISGs, and pro-oxidants genes by inhibiting activation of the TLR-3, TLR-7, and TLR-8 signaling pathways. By binding to the TLR-3, TLR-7, and TLR-8, the natural oligoribonucleotides can modulate the innate immune response to an influenza virus infection.

The results suggest that the natural ORNs are effective anti-influenza drug by HA inhibiting. The anti-inflammatory action of the therapeutic oligoribonucleotides cause normalization of the immunopathological effects of influenza by inhibiting the activation of TLR-associated signaling pathways.

Since, the thesis has discovered that the natural oligoribonucleotides impair infection of the host cell by influenza virus *in vitro*. Low-affinity interaction of the ORNs and ORNs-D-M with HA was detected and inhibition of the HA activity, which is an integral element of influenza virus infectivity, was confirmed. The ORNs and their complexes have been found to inhibit the induction of expression of the innate immunity genes response to the influenza virus infection in lung tissues *in vivo*. It is shown that the the ORNs and ORNs-D-M injection for prevention leads to a significant decrease overexpression of the genes of innate immunity under influenza conditions.

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

List of scientific publications published on the topic of the dissertation:

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.
2. **Melnichuk N.**, Tkachuk Z. Inhibition of hemagglutinin-glycan interaction by complexes of oligoribonucleotides with D-mannitol // *Dopov. Nac. akad. nauk Ukr.* – 2018. – № 1. – P. 92-99.
 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.
 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.
 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.
 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. **Melnichuk N.**, Semernikova L., Yakovenko T., Tkachuk Z. Inhibition of H1N1 A / FM 1/47 influenza virus infectivity by complexes of oligoribonucleotide with D-mannitol // *Materials of V scientific conference of PC «Farmak» young scientists school*. – Kyiv, Ukraine. 2017. – P. 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*, *xdh*, *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*, *xdh*, *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. **Melnichuk N.**, Tkachuk Z. Influence of complexes of oligoribonucleotides with D-mannitol on the innate immune response to influenza a virus H1N1 // Materials of VI scientific conference of PC "Farmak" young scientists school.– Kyiv, Ukraine. – 2018. – P. 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 // Materials of XII Congress of Ukrainian biochemical, medical and clinical chemistry.– Ternopil, Ukraine. – 2019. – T. 21, №3. – P. 217.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	19
ВСТУП.....	21
РОЗДІЛ 1.....	27
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	27
1.1. Вірус грипу та особливості патогенезу грипозної інфекції.....	27
1.1.1. НА як можлива мішень дії препаратів.....	30
1.2. Система вродженого імунітету як неспецифічний захист проти вірусу грипу.....	32
1.2.1. TLR-асоційована імунна відповідь на вірус грипу.....	35
1.2.2. Роль універсального фактора транскрипції NF-κB під час грипу.....	36
1.2.3. Роль цитокінів та хемокінів в умовах грипу.....	37
1.2.4. Утворення та роль АФК та АФН під час інфекції вірусом грипу.....	43
1.3. Терапевтичні олігонуклеотиди.....	45
1.3.1. Характеристика ОРН та ОРН-D-M та їх властивості.....	47
1.3.2. Противірусна активність ОРН та ОРН-D-M.....	49
РОЗДІЛ 2.....	51
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	51
2.1. Біологічний матеріал.....	51
2.2. Культивування клітин MDCK.....	52
2.3. Аналіз життєздатності клітин за дії вірусу грипу A/FM/1/47/H1N1 та ОРН та ОРН-D-M.....	52
2.4. Визначення впливу ОРН та ОРН-D-M на інфекційність вірусу грипу A/FM/1/47/H1N1.....	54
2.5. Аналіз впливу ОРН та ОРН-D-M на активність НА вірусу грипу A/FM/1/47/H1N1.....	55
2.6. Визначення взаємодії ОРН та ОРН-D-M з ізольованим НА.....	56

2.6.1. Визначення впливу ОРН та ОРН-D-M на утворення НА-гліканової взаємодії.....	57
2.6.2. Аналіз впливу ОРН та ОРН-D-M на інтенсивність флуоресценції НА	57
2.7. Дослідження протівірусної дії ОРН-D-M проти вірусів грипу А/СА/7/09/Н1N1 та А/МР/10218/84/Н5N2	58
2.8. Аналіз впливу ОРН та ОРН-D-M на індуковану вірусом грипу А/FM/1/47/Н1N1 гіперекспресію генів вродженого імунітету.....	59
2.8.1. Виділення тотальної РНК.....	60
2.8.2. Визначення кількості та чистоти виділеної РНК.....	61
2.8.3. Синтез кДНК	61
2.8.4. Полімеразна ланцюгова реакція у режимі реального часу (ПЛР-РЧ) .	63
2.8.5. Вестерн-блот аналіз	66
2.8.6. Визначення вмісту перекисного окислення ліпідів.....	67
2.8.7. Визначення інфекційного титру вірусу грипу	67
2.9. Статистичний аналіз	67
РОЗДІЛ 3.	69
РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	69
3.1. Дослідження впливу ОРН та ОРН-D-M на інфекційність вірусу грипу <i>in vitro</i>	69
3.1.1. Пряма інактивуєча дія препаратів ОРН та ОРН-D-M на вірус грипу А/FM/1/47/Н1N1.....	69
3.1.2. Вплив ОРН та ОРН-D-M на інфекційність вірусу грипу А/FM/1/47/Н1N1 та його взаємодію з гліканами.....	72
3.1.3. Аналіз взаємодії ОРН та ОРН-D-M з НА	75
3.1.4. Протівірусна дія комплексів ОРН-D-M проти вірусів грипу А/СА/7/09/Н1N1 та А/МР/10218/84/Н5N2	81
3.2. Модуляція грип-індукованої гіперекспресії генів вродженого імунітету препаратами ОРН та ОРН-D-M <i>in vivo</i>	86

3.2.1. Вивчення реплікації вірусу грипу A/FM/1/47/H1N1 у тканинах легенів мишей за дії препаратів ОРН та ОРН-D-M	87
3.2.2. Вплив препаратів ОРН та ОРН-D-M на експресію ISG, яка індукована вірусом грипу A/FM/1/47/H1N1	88
3.2.3. Вивчення експресії прооксидантних генів під впливом ОРН та ОРН-D-M в умовах грипу	90
3.2.4. Вплив ОРН та ОРН-D-M на експресію цитокінів та хемокінів в умовах інфекції вірусу грипу	94
3.2.5. Вивчення експресії генів транскрипційного фактору NF-κB за умов інфікування вірусом грипу за дії ОРН та ОРН-D-M	99
3.2.6. Вивчення експресії генів паттерн-розпізнаючих рецепторів Tlr3, Tlr7 та Tlr8 за дії грипу та ОРН та ОРН-D-M	102
РОЗДІЛ 4.	107
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	107
ВИСНОВКИ.....	116
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	118
ДОДАТОК А.....	141
ДОДАТОК Б	145

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ОРН	– олігорибонуклеотиди
ОРН-D-M	– комплекси олігорибонуклеотидів з D-манітолом
АФК	– активні форми кисню
АФН	– активні форми нітрогену
МТТ-тест	– колориметричний тест для оцінки метаболічної активності клітин
ТЦД ₅₀	– тканино-цитопатична доза, що інфікує 50 % культури клітин
НАО	– одна НА одиниця (кількість НА або вірусу, яка викликає реакцію аглютинації еритроцитів)
ПЛР-РЧ	– полімеразна ланцюгова реакція у режимі реального часу
кДНК	– комплементарна РНК-матриці ДНК, що отримана за допомогою зворотної транскрипції
НА	– hemagglutinin (гемаглютинін)
НА	– neuraminidase (нейрамінадаза)
NOS2	– nitric oxide synthase 2, inducible (NO синтетаза 2, індукцибельна)
ARG2	– arginase type II (аргіназа II типу)
XDH	– xanthine dehydrogenase (ксантиндегідрогеназа)
OAS1a/2/3	– 2'-5' oligoadenylate synthetase 1A, 2 and 3 (2'-5' олігоаденілатсинтетаза 1A, 2 і 3)
MX1	– MX dynamin like GTPase 1 (гуанозинтрифосфат зв'язуючий білок Mx1)
RNAseL	– 2',5'-oligoadenylate synthetase-dependent ribonuclease L (рибонуклеаза L, 2',5'-олігоаденілат залежна ендонуклеаза)
Eif2αk2	– eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 2 (кіназа

	2 еукаріотичного фактору ініціації трансляції 2-альфа)
IFN-ε	– interferon epsilon (інтерферон епсилон)
IFN-κ	– interferon kappa (інтерферон каппа)
IFN- α2	– interferon alpha 2 (інтерферон альфа 2)
IFN-β1	– interferon beta 1 (інтерферон бета 1)
IFN-γ	– interferon gamma (інтерферон гамма)
CCL3/4/5	– chemokine (C-C motif) ligand 3, 4 and 5 (хемокіновий (C-C мотив) ліганд 3, 4 і 5)
CXCL9/10/11	– chemokine (C-X-C motif) ligand 9, 10 and 11 (хемокіновий (C-X-C мотив) ліганд 9, 10 і 11)
IL-6	– interleukin 6 (інтерлейкін 6)
IL-1β	– interleukin 1 beta (інтерлейкін 1 бета)
IL-12α	– interleukin 12 alpha (інтерлейкін 12 альфа)
TNF-α	– tumor necrosis factor alpha (фактор некрозу пухлин альфа)
NF-κB1	– nuclear factor kappa B 1 (білок родини транскрипційного фактору NF-κB (інша назва p50))
NF-κB1α/IκB	– nuclear factor kappa B inhibitor alpha (інгібітор транскрипційного фактору NF-κB альфа)
TLR3/7/8	– toll-like receptor 3, 7 and 8 (Toll-подібний рецептор 3, 7 і 8)
GAPDH	– glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа)
LD ₅₀	– lethal dose, 50% (доза, що інфікує 50 % тварин)
PBS	– phosphate buffered saline (фосфатно-буферний розчин)
ISG	– interferon-stimulated gene (інтерферон стимульований ген)
GTPase	– guanosine triphosphatase (гуанозинтрифосфатаза)
RIG-1	– retinoic acid-inducible gene I, RIG-I-like receptor, dsRNA helicase enzyme (RIG-I-подібний рецептор, фермент хеликаза)
NK	– natural killer cells (природні кілери – тип лімфоцитів)

ВСТУП

Актуальність теми. За оцінками Всесвітньої організації охорони здоров'я, сезонний вірус грипу А спричиняє до 500 тисяч смертей та великі економічні втрати щороку (4). Щорічні тривалентні або чотиривалентні вакцини є найефективнішим способом запобігання зараженню та важких наслідків, які спричинені вірусами грипу (who.int/influenza/vaccines). Однак висока мінливість НА вірусу грипу забезпечує безперервну еволюцію нових штамів вірусу грипу та епідемій грипу, що у свою чергу ускладнює підбір відповідної вакцини (204-207). 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 (24, 25, 208).

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 (13).

Основною причиною смерті пацієнтів від грипу є цитокіновий шторм, який призводить до надмірного запалення, набряку, дисфункції та пошкодження тканин легенів і є результатом вродженої імунної відповіді клітин хазяїна на вірус грипу (212, 213). 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 (46, 47). 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 (213).

Природні препарати ОРН та ОРН-D-M на основі сумарної дріжджової РНК мають противірусну дію проти широкого спектру ДНК- та РНК-вірусів (162, 163, 177-180, 183). До того ж ОРН є ефективним протизапальним препаратом, який може застосовуватися як кардіо- та гепатопротектор (164, 172, 173, 175). Доклінічні та клінічні дослідження свідчать про протигрипозну дію ОРН-D-M при грипі (181, 183). 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 досліджень. 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 такі завдання:

1. Дослідити можливу пряму інактивуючу 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 ТЦД₅₀, 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, яка призводить до зниження активності НА. Суттєвий 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*, *Il12α*, *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*, *Il12α*, *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 генів NF- κ B, 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 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 працях, 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 роботи. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел, який охоплює 229 найменувань. Дисертацію викладено на 145 сторінках стандартного машинопису, вона містить 30 рисунків, 4 таблиці та 2 додатки.

РОЗДІЛ 1.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Вірус грипу та особливості патогенезу грипозної інфекції

Вірус грипу належить до родини *Orthomyxoviridae* та класифікується на 4 типи: А, В, С та D (1). Серед цих типів, вірус грипу А є клінічно найбільш важливим патогеном, що викликає інфекції у респіраторному тракті людини, тварин та шлунково-кишковому тракті птахів. Вірус грипу А спричиняє численну смертність і великі економічні втрати щороку. В Україні за останній епідемічний сезон (жовтень 2018-лютий 2019 р.) на грип та гострі респіраторні вірусні інфекції перехворіли 9,4 % українців та зареєстровано 33 летальних випадки (2).

Іноді вірус грипу А викликає пандемії (3). Лише пандемія 2009 року, за оцінками Всесвітньої організації охорони здоров'я Європейського регіону (4), призвела до 100 000–400 000 смертей не тільки серед груп, які вважаються з більш високими ризиками ускладнень, таких як літні люди, люди з хронічними захворюваннями та вагітні жінки, а також у молодих здорових осіб (4). Під час найсильнішої пандемії останнього століття, в 1918 р., смертність обумовлена інфекцією вірусом грипу становила 21 мільйон людей у всьому світі (5).

Віруси грипу містять одноланцюгову антизмистовну (негативну) РНК і для успішної реплікації потребують синтезу вірусної РНК. Синтез змістовної РНК здійснюється полімеразою на вірусному геномі (6). Зрілий віріон містить вісім протеїнів, які оточені білковою оболонкою, яка включає два основні поверхневі глікопротеїни – гемаглютинін (НА) і нейрамінадазу (НА) (7, 8, 9). НА

опосередковує зв'язування віріона з рецептором (гліканом) та злиття з мембраною для проникнення у клітину хазяїна (8), тоді як рецептор-руйнуючий фермент NA забезпечує вихід віріона з клітини (9).

За сучасною класифікацією вірус грипу А поділяють на 18 субтипів за HA (H1–H18) та 11 за NA (N1–N11) з яких H1–H3 успішно адаптовані до людини (10, 11, 12, 13). HA та NA є важливими антигенами, які визначають антигенні варіації вірусів грипу та імунітету хазяїна. Мінливість у HA в перш за все відповідальна за постійну еволюцію нових штамів та наступні епідемії грипу (14). Цикл репродукції вірусу грипу умовно поділяють на такі фази: проникнення вірусу у клітину хазяїна і власне його репродукція; вихід та поширення вірусу. В патогенезі грипозної інфекції виділяють неспецифічні (вроджений імунітет) та специфічні (адаптивний імунітет) захисні реакції хазяїна (рис. 1.1) (15).

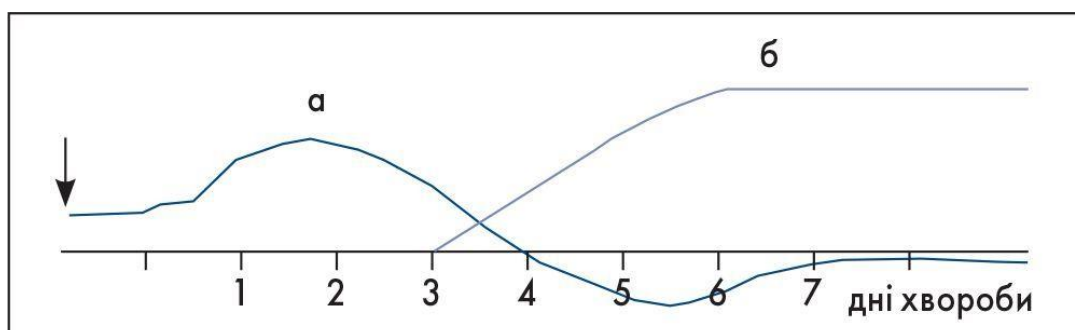


Рис. 1.1. Схема захисних імунних реакцій за умов інфекції грипу у людини: *а* – неспецифічні; *б* – специфічні (15)

Вірус грипу високо тропний до епітеліальних клітин дихальних шляхів та альвеол, оскільки вони експресують глікани з залишками α 2-6 та α 2-3 сіалової кислоти, які функціонують як вірусні рецептори (рис. 1.2). У результаті їх інфікування відбувається пошкодження епітелію та ексудації рідини і протеїнів у дихальний та альвеолярний простір, які перешкоджають газообміну (16, 17).

НА-гліканова взаємодія ініціює ендоцитоз віріона (19). Підкислення ендосоми призводить до злиття вірусного НА з ендосомальною мембраною і активації іонного каналу M2, що дозволяє протонам входити у вірусне ядро, щоб дисоціювати рибонуклеопротеїновий комплекс, який потім імпортується в ядро, де відбудеться реплікація вірусної РНК (20). Новосинтезовані копії вірусного нуклеопротеїну концентруються у цитозолі біля плазматичної мембрани та зв'язуються з поверхневими вірусними протеїнами (НА, NA), які концентруються у ліпідних рафтах на плазматичній мембрані за допомогою інших вірусних протеїнів (M1, M2) (6). Відбруньковування таких регіонів плазматичної мембрани формує завершене вірусне потомство, яке зв'язане з плазматичною мембраною через НА-гліканові взаємодії. Відщеплення від сілової кислоти глікана каталізується NA, що призводить до інфікування сусідніх клітин або виділення вірусних часток назовні через повітряно-крапельні секрети дихальних шляхів (6).

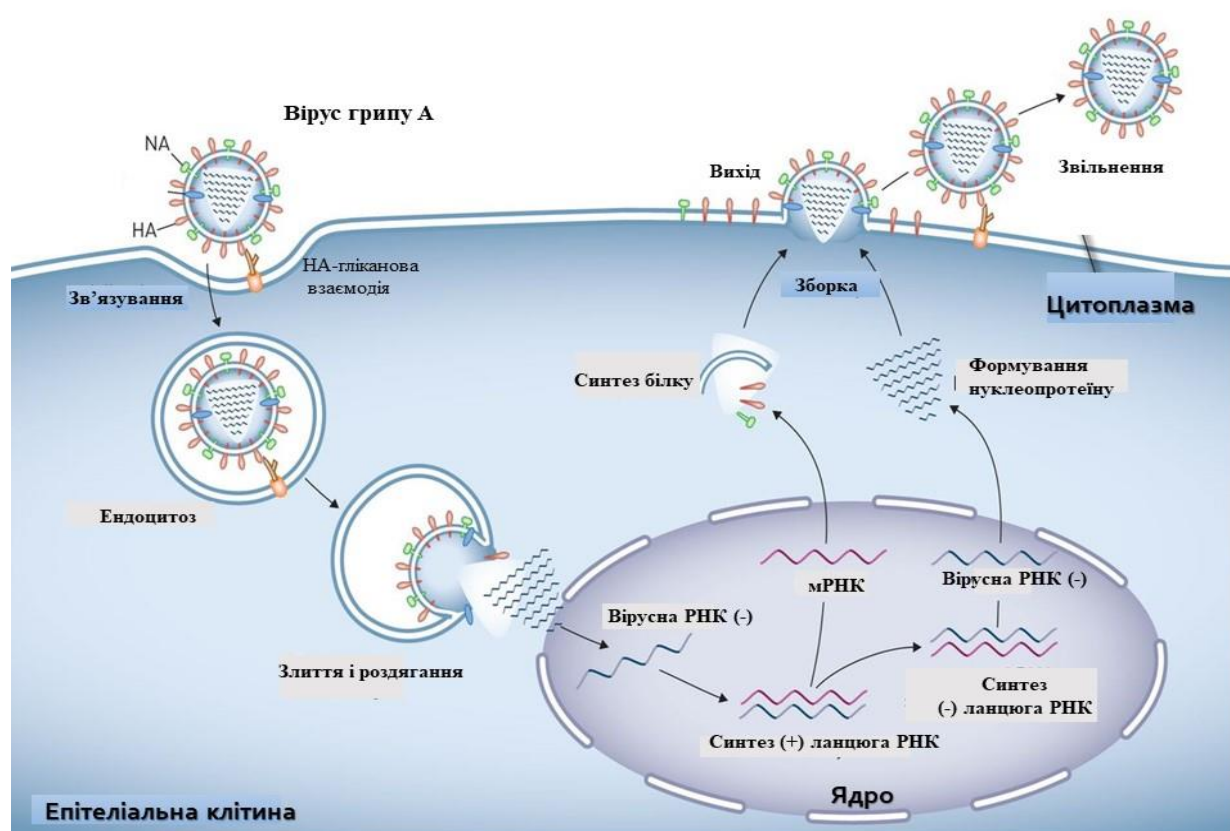


Рис. 1.2. Схематичне зображення реплікації вірусу грипу А у епітеліальних клітинах легень, адаптовано за (18)

1.1.1. НА як можлива мішень дії препаратів. Для профілактики та лікування вірусної інфекції грипу існують два класи ліцензованих протигрипозних препаратів: інгібітори НА та іонних каналів М2. Інгібітори НА (озельтамівір (Tamiflu), занамівір (Relenza)) перешкоджають виходу новосинтезованих віріонів з клітини хазяїна (21). Тоді як інгібітори іонних каналів М2 (амантадин (Symmetrel), римантадин (Flumadine)) блокують процес вивільнення вірусного рибонуклеопротеїнового комплексу у цитоплазму (22, 23). Проте розвиток резистентності вірусу грипу до цих препаратів призвів до зниження їх ефективності (22, 24, 25).

Глікопротеїн НА знаходиться на поверхневій мембрані вірусу грипу і є невід'ємним елементом його інфекційності (8). За структурною конформацією НА належить до I класу білків, які зливаються з мембраною. НА володіє багатофункціональною активністю, а саме приєднання та злиття з мембраною клітини хазяїна (26). Тому НА є перспективною мішенню для розроблення нового протигрипозного препарату, який буде блокувати початковий етап у життєвому циклі вірусу – проникнення у клітину хазяїна. Ідентифіковані 18 типів НА можна розділити на 2 групи (12, 13). Мінлива природа НА створює великі труднощі у розробленні препарату, крім того різноманітність НА може збільшитись у зв'язку з антигенним дрейфом та шифтом (14). Тому актуальним є розробка препарату, який буде неспецифічно взаємодіяти з НА та інгібувати його активність.

НА – гомотример, мономери якого синтезуються як єдиний поліпептид (НА0), який розщеплюється протеазами-хазяїна на дві субодиниці (НА1 і НА2). НА зв'язується з рецепторами клітини, які містять глікани з залишками сіалової кислоти Neu5Ac α 2-3Gal linked (α 2-3) та Neu5Ac α 2-6Gal linked (α 2-6), за допомогою рецептор зв'язуючого домену, який розташований у кожному НА мономері на дистальному кінці (НА1) від вірусної мембрани (рис. 1.3) (27).

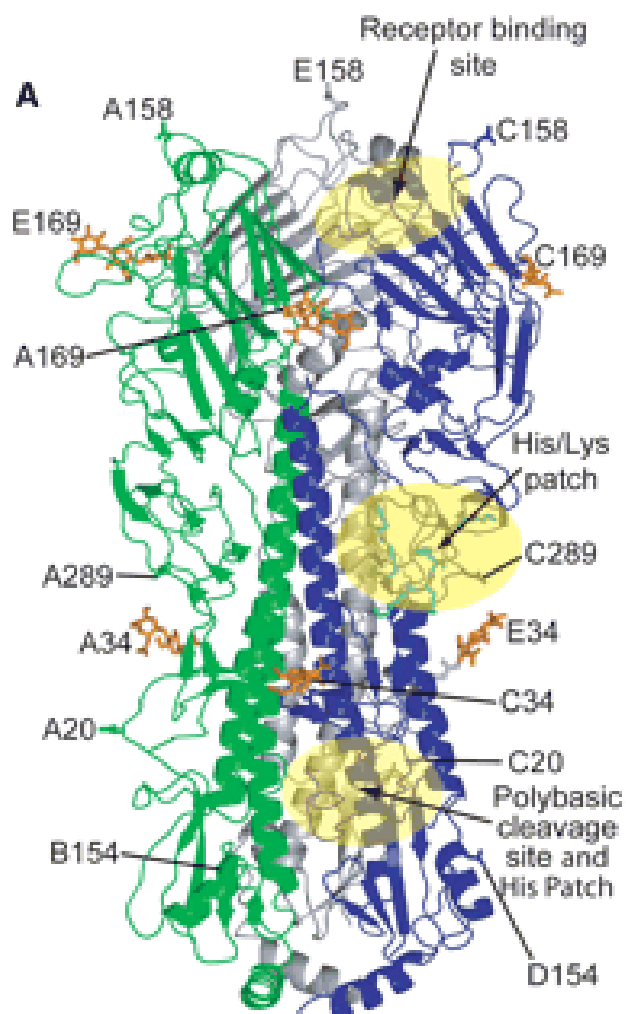


Рис. 1.3. Структура гомотримера НА. Три мономерів показані відповідно у зелений, сірий та синій кольори (27)

Рецептор зв'язувальний сайт НА взаємодіє з гліканами з дуже низькою (мілімолярною) афінністю (28). Однак вірус грипу може підвищити свою авідність до клітин-хазяїв шляхом багатовалентного зв'язування через високу щільність тримерів НА на поверхні вірусу (29). Усі НА мають аналогічний рецептор зв'язувальний домен. Сайт зв'язування складається з трьох структурних елементів, а саме α -спіралі та двох петель (30).

Відомості про структуру НА дозволяють розробити новий протигрипозний препарат, який буде стійким до вірусної резистентності (13).

1.2. Система вродженого імунітету як неспецифічний захист проти вірусу грипу

Вроджений імунітет є першою стадією захисту організму від вторгнення патогенів і пов'язаний з високо консервативним механізмом клітинної сигналізації хазяїна. Система вродженого імунітету виконує низку наступних функцій: рекрутинг імунних клітин до місця інфекції через надвиробництво медіаторів запалення, цитокінів (31, 32); ідентифікація та видалення чужорідних субстанцій, присутніх в органах, тканинах, крові та лімфі, за допомогою спеціалізованих лейкоцитів; активація адаптивної імунної системи (33).

Вроджена імунна система розпізнає вірус грипу за допомогою лімітованої кількості детерміновано закодованих патерн-розпізнавальних рецепторів (RIG-1, TLR 3, 7, 8 та 9), які активують про-запальний фактор транскрипції NF-κB (34). Активований NF-κB викликає секрецію INF I типу, про-запальних цитокінів, ейкозаноїдів та хемокінів (рис. 1.4). Надпродукція INF I типу зумовлює противірусний стан шляхом стимулювання експресії тисячі генів, які відомі як інтерферон-стимульовані гени (ISG) (35, 36).

Після інфікування епітеліальних клітин, тканино-резидентні альвеолярні макрофаги перші відповідають на вірусну інфекцію у легенях. Вони можуть сприяти знищенню вірусу шляхом фагоцитозу збирально-опсонізованих вірусних частинок або інфікованих апоптотичних клітин (ефероцитоз) та вивільнення великої кількості запальних цитокінів та хемокінів, які ініціюють та стимулюють імунну відповідь (37-40). Про-запальні цитокіни викликають рекрутинг циркулюючих попередників моноцитів та їхню диференціацію на альвеолярні макрофаги моноцитарного походження та дендритні клітини (рис. 1.5).

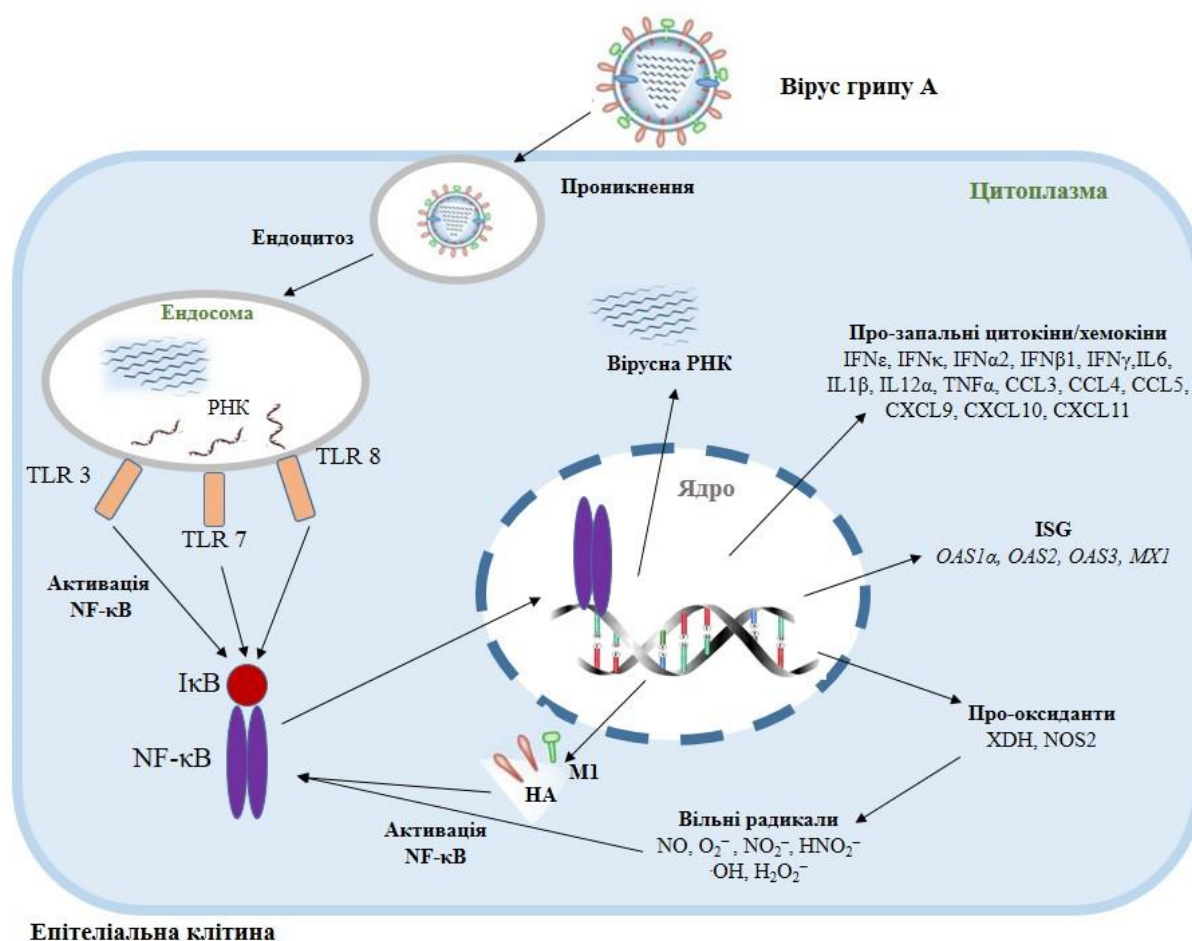


Рис. 1.4. Схематичне зображення вродженої імунної відповіді на вірус грипу у епітеліальних клітинах легенів

Індуковані вірусом дендритні клітини мігрують до регіональних лімфатичних вузлів активуючи цитотоксичні (CD8⁺) та хелперні (CD4⁺) Т-клітини, а також рідкісні Т-клітини пам'яті, які здатні викликати адаптивну імунну відповідь (41, 42). Паралельно вірусні антигени та ендоцитовані віруси індукують вивільнення IFN типу I та запальні цитокіни з тканино-резидентних альвеолярних макрофагів та дендритних клітин (43). Високий рівень про-запальних цитокінів «цитокіновий шторм» призводить до місцевого та системного запалення індукуючи оксидативно-опосередковані пошкодження, лихоманку та анорексію.

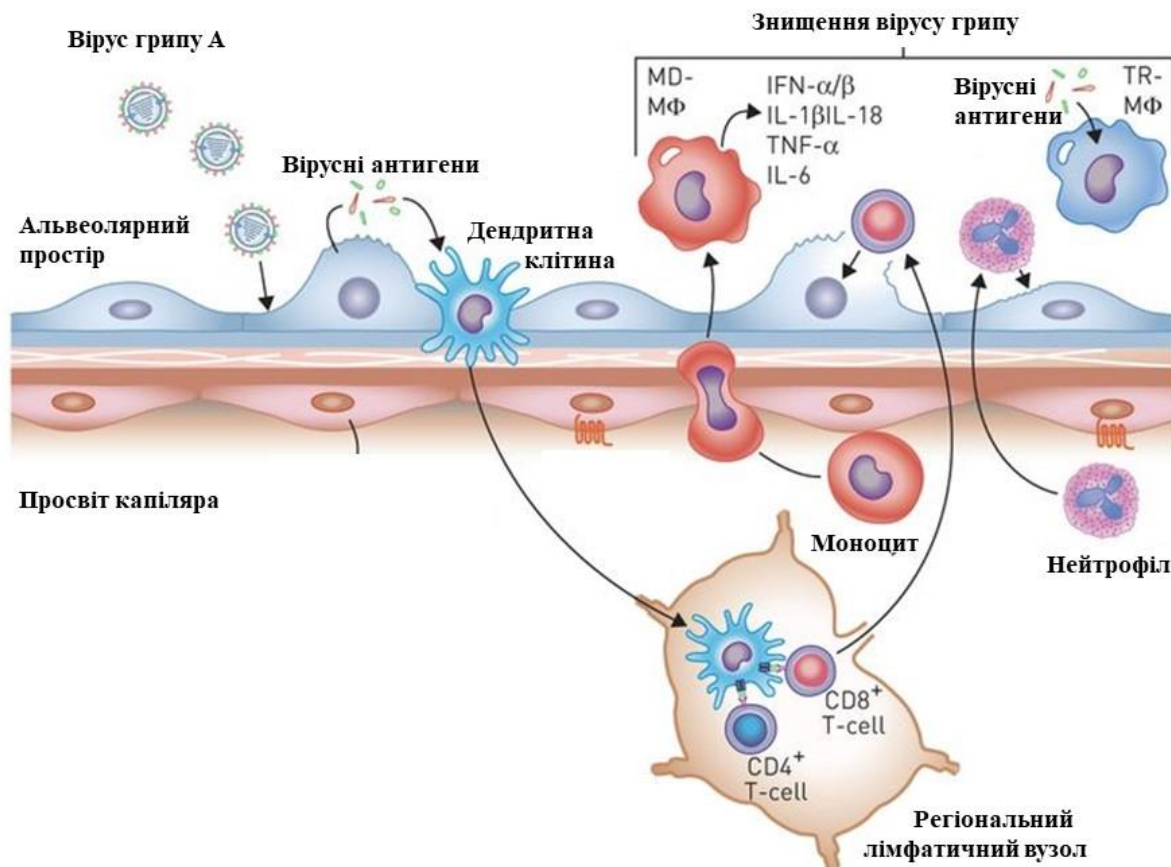


Рис. 1.5. Схематичне зображення клітино-опосередкованого знищення вірусу грипу шляхом рекрутингу мононуклеарних клітин до інфікованих тканин: MD-MΦ – альвеолярні макрофаги моноцитарного походження; TR-MΦ – тканино-резидентні альвеолярні макрофаги; T-cell – T-клітини, адаптовано до (43)

Хемокіни, які продукуються на місці інфекції, рекрутують додаткові імунні клітини, включаючи нейтрофіли, моноцити і природні кілери (NK), до дихальних шляхів. Вірус-інфіковані епітеліальні клітини стають мішенями для NK-клітин, які опосередковують знешкодження вірусу (44). Моноцити і нейтрофіли швидко рекрутують до легень, які інфіковані вірусом грипу, і допомагають знищити інфіковані мертві клітини. Фагоцитарне знешкодження інфікованих вірусом клітин є важливим механізмом вірусного знищення оскільки у такому випадку активується адаптивний імунітет.

1.2.1. TLR-асоційована імунна відповідь на вірус грипу. Різні патерн-розпізнавальні рецептори розпізнають патогенні компоненти, відомі як патоген-асоційовані молекулярні патерни, які ініціюють сигнальні каскади включаючи продукцію цитокінів (34).

Toll-подібні рецептори (TLR) являють собою патерн-розпізнаючі рецептори, які експресуються антиген-присутніми дендритними клітинами, моноцитами, макрофагами, епітеліальними клітинами (34). Вони індують експресію про-запальних цитокінів та виступають ко-стимулюючими молекулами, які запускають вроджений та набутий імунітет (45).

Вірусні нуклеїнові кислоти детектуються TLR 3, 7, 8 та 9 у ендосомах. При патогенезі вірусу грипу TLR 3, 7, 8 та 9 індують експресію генів вродженого імунітету, лімітують вірусну реплікацію/поширення, опосередковують запалення тканин і пов'язані з розвитком набутого імунітету. Активація TLR 3, 7 та 8 запускає каскад сигналів, які призводять до активації NF-κB і NF-κB-залежної індукції про-запальних цитокінів і IFN типу I (46, 47). Під час інфекції вірусом грипу виявлено, що підвищення експресії TLR7, 8 та 3 корелює з ключовими внутрішньоклітинними сигнальними молекулами (MAPKs, NF-κB) та високим рівнем про-запальних цитокінів (IL-6, TNF-α) (47).

TLR3 детектують подвійно ланцюгові РНК вірусів у ендолізосомі та беруть участь у розпізнаванні поліінозитол-поліцитидилової кислоти (полі I:C) та синтетичних аналогів дволанцюгової РНК (48). В той час як TLR7/8 розпізнають одноланцюгові РНК вірусів, а також малі компоненти пуринових аналогів (49-51).

Грип-індукована активація TLR3 у епітеліальних клітинах викликає тканинне запалення через індукцію IL-6, TNF-α, CXCL8 та рекрутинг ефektorних клітин. Тоді як TLR7 та 8 пов'язані з IFN I типу та цитокінами, які задіяні у процесі активації адаптивної імунної відповіді (IFN-γ, CXCL10, CXCL9) (52, 53).

Було показано, що неконтрольована про-запальна цитокінова відповідь може призвести до імунопатологічного пошкодження легень при грипозній інфекції з подальшим стимулюванням TLR на більш високому рівні (53).

1.2.2. Роль універсального фактора транскрипції NF-κB під час грипу. Вірусна інфекція грипу активує декілька транскрипційних факторів (ядерний фактор карра В (NF-κB), INF регулюючий фактор (IRF), сигнальний трансдусер та активатор транскрипції (STAT)), які беруть участь в індукції експресії генів цитокінів, хемокінів та ін (54).

Універсальний сигнальний шлях NF-κB відіграє незамінну роль у модуляції запалення, імунної відповіді, проліферації та апоптозі (55, 56). Родина транскрипційного фактору NF-κB включає п'ять членів: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF-κB1) та p52/p100 (NF-κB2). Активованій ІКК кіназний комплекс опосередковує фосфорилування і деградацію молекули ІκB, вивільняючи у такий спосіб димери p50/RelA, p50/c-Rel (57). Вільні NF-κB димери транслокуються до ядра, де вони зв'язуються з κB специфічними послідовностями у промоторних чи енансерних регіонах мультиплетних таргетних генів, включаючи тих, які кодують про-запальні цитокіни, адгезивні молекули, IFN та про-апоптозні молекули (58).

Грип-індукована активація NF-κB складається із двох етапів (рис. 1.4). Рання активація NF-κB спостерігається у першій годинні після інфікування, тоді як пізня фаза активації NF-κB корелює з вірусною реплікацією та синтезом вірусних протеїнів (54). Чимало літературних джерел показали, що NF-κB високо експресується під час інфекції вірусу грипу (59-61).

Сигнальний шлях NF-κB відіграє подвійну роль під час інфекції грипу. З однієї сторони NF-κB активує експресію IFN і таким чином є важливим у індукції вродженої імунної відповіді хазяїна проти вірусної інфекції (62). Загалом вірусна інфекція може активувати декілька сигнальних каскадів через TLR (TLR3, TLR7/8 та TLR9) та TLR-залежні (RIG-I та Mda-5) шляхи, які призводять до активації NF-κB чи INF регулюючих факторів (IRF-3 and IRF-7) (63). Через критичну роль NF-κB у опосередковуванні протівірусної відповіді,

багато вірусів еволюціонують до таргетних специфічних аспектів цього сигнального шляху та вродженої імунної відповіді (64).

На противагу цьому показано, що необхідною умовою для ефективної реплікації вірусу грипу є активація NF-κB (58, 65). Для того щоб протистояти вродженій імунній відповіді, яка активується через NF-κB, вірус грипу кодує мультифункціональний білок NS1, який служить антагоністом клітинної IFN відповіді (66). Таким чином вірус грипу здатний протидіяти противірусним функціям NF-κB одночасно використовуючи його для власної реплікації (58). До того ж показано, що клітини з низькою активністю NF-κB практично стійкі до інфікування вірусом грипу (67).

Дослідниками було ідентифіковано, що надекспресія вірусних білків, а особливо НА, нуклеопротеїну NP та матричного білку М1, може також активувати NF-κB (67, 68). Самих вірусних білків достатньо для транскрипційної активації NF-κB шляхом залучення вільних радикалів, які активують сигнальний трансдукційний інтермедіат ІКК, кіназу, яка фосфорилує ІκB і у такий спосіб регулює активацію NF-κB (67, 68).

1.2.3. Роль цитокінів та хемокінів в умовах грипу. Цитокіни та хемокіни відіграють дуже важливе значення для наслідків інфекції вірусу грипу з точки зору важкості захворювання, оскільки високий патогенез вірусу грипу часто пов'язаний з надпродукцією цитокінів та хемокінів (69). Надекспресія цих протеїнів призводить до пошкодження легеневої тканини, зменшення респіраторної здатності, важких захворювань і смертності (70).

Інтерферони (IFN) – мультигенна родина індукцибельних цитокінів (71-73) і складова першої лінії захисту проти патогенів таких як віруси, бактерії та паразити (74, 75). IFN також відіграють важливу роль у пригніченні росту пухлин та модуляції імунної відповіді (76). Виділяють три типи IFN (I, II і III) за їхньою амінокислотною послідовністю та типом рецепторів, які вони використовують для сигналізації (77). IFN типу I, які включають IFN- альфа (α), -бета (β), -дельта (δ), -епсилон (ε), -каппа (κ), -тау (τ), -омега (ω). та IFN типу III

(IFN-лямбда (λ)) і відомі як вірусні IFN, а IFN типу II (IFN- гамма (γ)) відомі як імунні IFN (74, 78).

За нормальних умов у організмі спостерігається ліміт у генерації кількості IFN (79). Однак під час інфекції вірусу грипу IFN продукуються в основному у епітеліальних клітинах дихальних шляхів, плазмоцитоїдних дендритних клітинах та макрофагах (77, 80). Індукція IFN- α/β здійснюється через активацію TLR3, TLR7, TLR8 або TLR9 за рахунок присутності вірусної РНК у ендосомі (81). У мишей, IFN типу I включає 14 ізоформ IFN- α та одну форму IFN- β (82). Індукований вірусом синтез IFN типу I у фібробластах є ієрархічний, а саме першим надекспресується IFN- β , за яким у другій хвилі IFN- α (83, 84). Показано, що IFN- β надекспресуються протягом 3-6 годин після інфікування епітеліальних клітин дихальних шляхів вірусом грипу (85, 86).

IFN- α/β сприяють початковому контролю вірусної реплікації активуючи каскад ISG, які безпосередньо перешкоджають реплікації та поширенню вірусу (35, 36). ISG включають білки, які інгібують проникнення вірусу (MX1), модулюють мембранні ліпіди запобігаючи вивільненню вірусу у клітину (Viperin, Tetherin), індукують апоптоз інфікованих клітин (PKR), регулюють транскрипційні (Viperin), посттрансляційні (OAS/RNASEL, PKR) механізми та посттрансляційні події (ISG15) (35, 36).

IFN-індуцибельна протеїнкіназа R (PKR) активується дволанцюговою РНК призводячи до аутофосфорилування і фосфорилування клітинних білків, включаючи субодиницю еукаріотичного фактора ініціації 2 (eIF2) (87). Фосфорилування eIF2, шляхом активації PKR, призводить до інгібування синтезу білка, включно з вірусними білками, тим самим обмежуючи реплікацію вірусу в інфікованих клітинах. У результаті фосфорилування I κ B, PKR активує транскрипційний фактор NF- κ B (88). Додатково PKR стабілізує мРНК IFN I типу забезпечуючи таким чином надійну генерацію IFN (89).

Частиною противірусної відповіді індукованої IFN I і III типу є Mx білки (GTPase), які асоціюються з певними внутрішньоклітинними компартментами. У мишей Mx1 експресується в ядрі і має противірусну активність (90),₂ шляхом

блокування елонгації вірусної мРНК у ядрі (91, 92), тоді як Mx2 експресується в цитоплазмі та інгібує віруси, які реплікуються у цитоплазмі (93). Mx1 білок має потужну противірусну активність проти вірусу грипу шляхом таргетування вірусної рибонуклеопротеїн-асоційованої полімеразної активності блокуючи при цьому первинну транскрипцію вірусних генів (94, 95).

Ще одними важливими ISG є гени, які кодують білки системи 2',5'-олигоденилатсинтетаза (OAS)/RNASEL. OAS/RNASEL – шлях вродженого імунітету, який реагує на патоген асоційований патерн індукуючи деградацію вірусних і клітинних РНК і тим самим блокує вірусні інфекції (96). Дволанцюгова РНК активує патоген розпізнавальний рецептор 2'-5'А синтетази, або OAS, в результаті чого продукуються 2-5А з АТФ (97). У мишей, OAS представляють собою сім'ю IFN-індукованих білків, які кодуються чотирма групами генів: *Oas1*, *Oas2*, *Oas3* (функціональні гени) та *OasL* (ген кодує OAS споріднений білок, який не має OAS активності) (98, 99). 2-5А активують універсальну клітинну ендорибонуклеазу RNASEL (2-5А-залежна РНКаз) (100). Активована RNASEL деградує вірусні і клітинні ssRNA і тим самим обмежує реплікацію вірусу та індукує апоптоз інфікованих клітин. Крім того, деякі з цих продуктів деградації можуть зв'язуватися і активувати RIG-I підвищуючи експресію IFN (101).

Інші IFN I типу, IFN- κ та IFN- ϵ конститутивно експресуються у специфічний спосіб залежно від типу клітини та дуже помірно індукуються рецептор розпізнаючим патерними шляхами вказуючи таким чином на відмінний шлях регуляції від IFN- α/β (102-105).

IFN- ϵ є унікальний тип I IFN, який має відмінні функції від IFN- α/β . По-перше, противірусна, НК-цитотоксична та антипроліферативна активність IFN- ϵ нижча ніж IFN- α та IFN- β (106). По-друге, у макрофагах IFN- ϵ відрізняється від IFN- α/β через індукцію противірусного стану за допомогою більш різноманітних факторів (104, 105). По-третє, IFN- α є медіаторами більшості генів та їх підвищеної регуляції у сигнальному шляху IFN типу I у

порівняні з IFN ϵ , в той час як IFN- ϵ індукує більше генів у TNF- α сигнальному шляху та більшу генерацію АФК, фагоцитну активацію ніж IFN- α (107).

Відміною особливістю IFN- κ серед IFN типу I – експресія у неіндукованих клітинах, особливо у кератиноцитах (103). Рівень експресії мРНК IFN κ може підвищитися вірусною інфекцією, іншими IFN типу I та IFN- γ . Показано, що IFN- κ має протекторну функцію у людських клітинах фібробластоїдного походження проти вірусів везикулярного стоматиту, енцефаломіокардиту та папіломи (102, 108).

IFN- γ , який належить до IFN типу II, є критичним цитокіном для регулювання як вродженої, так і адаптивної імунної відповіді (109). Рані рівні IFN- γ (в межах перших трьох днів інфекції вірусу грипу) експресуються макрофагами та НК. Пізніше (5-10 днів після інфекції грипу) IFN- γ генерується антивірусними CD4⁺ та CD8⁺ Т клітинами у легенях та вторинно лімфоїдних тканинах. IFN- γ індукує експресію: білків з противірусною дією (PKR, OAS, Mx1); ферментів, які перешкоджають трансляцію вірусних білків та прозапальних цитокінів, хемокінів, які включають макрофаги, нейтрофіли та Т клітини до вогнища інфекції (110).

Вважається, що IFN- α/β та IFN- γ мають захисну дію проти вірусної інфекції, тоді як IL-1, TNF- α та IL-6 беруть участь у запальній фазі вірусної інфекції (111, 112).

Важливою молекулою у реакції запалення є IL-1, який прямо або опосередковано впливає на хемотаксис нейтрофілів, як основних представників запалення. Родина цитокінів IL-1 складається з IL-1 α та IL-1 β , які кодуються різними генами та мають дві ізоформи одного білка. В основному IL-1 α - мембрано-асоційований, в той час як IL-1 β – секреторний (113). Під час вірусної інфекції підвищення генерації IL-1 β спостерігається у моноцитах, макрофагах, кератиноцитах, Т-лімфоцитах, нейрофілах та ендотеліальних клітинах. IL-1 β експресується у інактивованій формі, яка активується після протеолітичного розщеплення каспазою-1 (54). Незважаючи на те, що IL-1 не

впливає на знищення вірус-інфікованих клітин, він підвищує імуноглобулінову IgM відповідь та стимулює рекрутинг Т-лімфоцитів до вогнища інфекції (114).

Інший про-запальний цитокін, TNF- α продукується у моноцитах, макрофагах, Т- та В-лімфоцитах, NK клітинах, астроцитах, епітеліальних та ендотеліальних клітинах (115) та опосередковує широкий спектр множинних про-запальних та імунологічних функцій. За умов вірусної інфекції TNF- α може індукувати вивільнення IL-1 та IL-6, які важливі під час інфекції грипу та ймовірно кооперується з іншими імунорегуляторами (IL-2, IL-8, IFN- α/β). TNF- α може стимулювати ріст фібробластоподібних та ендотеліальних клітин у процесі пост-інфекційного тканино-репараційного процесу, а також здатний активувати та рекрутувати нейтрофіли, макрофаги, Т-лімфоцити та NK клітини (31, 32). *In vitro* було показано, що TNF- α може інгібувати вірусну реплікацію як найменше двома механізмами: прямий лізис вірус-інфікованих клітин або індукція селективного антивірусного стану у неінфікованих клітинах (31).

IL-1 β та TNF- α надрегулюють лейкоцитарні адгезивні молекули (CCL2, CCL7) на ендотелії судин і таким чином опосередковують перший етап секвестрації нейтрофілів та макрофагів у респіраторний тракт (116, 117). IL-1 β та TNF- α також беруть участь у дозріванні тканинних макрофагів та дендритних клітин (54).

Підвищений рівень мультифункціонального цитокіну IL-6, який спостерігається під час інфекції грипу продукується стимульованими цитокінами (111). IL-6 слугує ко-стимулюючим фактором для Т-лімфоцитів і фактором росту для В-лімфоцитів, викликаючи диференціювання В-лімфоцитів до плазматичних клітин і подальше продукування антитіл, стимулює IgA відповідь у слизовій оболонці і може збільшити Т-лімфоцит-залежну генерацію IgE (116). IL-6 регулює імунну, гострофазну відповідь і гематопоез (112, 118).

Інфільтрація мононуклеарних клітин до інфікованих вірусом грипу тканин має вирішальне значення для клітино-опосередкованого очищення від респіраторних вірусів (119, 61). Дослідження *in vitro* показали, що інфекція грипу індукує експресію хемокінів родини CC (CCL3, CCL4, CCL5) та CXС

(CXCL9, CXCL10, CXCL11) (Таблиця 1.1), які також рекрутують моноцити, НК, Т- та В-клітини (119-121).

Таблиця 1.1.

Характеристика деяких хемокінів, які індукуються інфекцією вірусу грипу

Хемокін	Інша назва	Клітинні мішені	Біологічні ефекти
CCL3	MIP-1 α	макрофаги, моноцити	участь у гострому запальному стані; рекрутинг і активація поліморфноядерних лейкоцитів
CCL4	MIP-1 β	макрофаги, моноцити, CD8 ⁺ Т клітини	рекрутинг НК, Т клітин, дендритних клітин та моноцитів
CCL5	RANTES	макрофаги, моноцити, мастоцити, еозинофіли	хемотоксичний для Т-клітин, еозинофілів, базофілів, і рекрутинг лейкоцитів; за допомогою цитокінів IL-2 і IFN- γ , які вивільняються Т-клітинами, CCL5 індукує проліферацію і активацію деяких НК
CXCL9	MIG, CRG-10	Т клітини, альвеолярні макрофаги, моноцити	IFN-індукований Т-клітинний хемоатрактант впливає на ріст, рух або активаційний стан клітин, які беруть участь у імунній та запальній реакції

продовження Таблиця 1.1.

CXCL10	IP-10, CRG2	Т клітини, альвеолярні макрофаги	рекрутинг ефektorних Т-клітин; хемотаксичний для Т-клітин, макрофагів і дендритних клітин; стимуляція моноцитів, НК-клітин і міграція Т-клітин, модуляція експресії молекул адгезії
CXCL11	ITAC, β -R1, IP-9	Т клітини	рекрутинг Т-клітин, НК-клітин і макрофагів до місце запалення

Отже контроль рекрутингу та активації лейкоцитів є фундаментальною вимогою для захисту хазяїна та розв'язання запалення. Найважливішим етапом успішного розв'язання будь-якого запального явища, є перехід від вродженого до адаптивного імунітету (33). Показано, що IL-6 регулює запалення через нормалізацію експресії хемокінів CXС і СС, що сприяє придушенню рекрутингу нейтрофілів та одночасного залученню мононуклеарних лейкоцитів (122), а також перехід від вродженої до адаптивної імунної відповіді (33).

1.2.4. Утворення та роль АФК та АФН під час інфекції вірусом грипу.

Вірус грипу індукує пошкодження тканин легенів, викликаючи надпродукцію вільних радикалів включаючи активні форми нітрогену (АФН) (оксид нітрогену (NO), діоксид нітрогену (NO_2^-), нітритна кислота (HNO_2^-)) та активні форми кисню (АФК) (супероксидний аніон (O_2^-), пероксид водню (H_2O_2^-), гідроксильний радикал ($\cdot\text{OH}$)) (123). Під час гострої інфекції грипу підвищений рівень вільних радикалів може безпосередньо сприяти загибелі інфікованих клітин у тканинах легенів, загострювати патологію, яка спричинена реплікацією вірусу (124) та брати участь у транскрипційній активації NF- κ B вірусними білками (67, 68).

Xdh та *Nos2* є важливими прооксидантними генами, які індукують генерацію вільних радикалів (61, 125). Патогенна роль АФК та АФН під час

інфекції вірусу грипу реалізується підвищенням експресії мРНК *Xdh*, *Nos2* та відповідно ензимної активності індукцйбельної NO-синтетази (NOS), ксантинооксидази (ХО) (61, 126, 127).

O_2^- генерується ХО, чия активність збільшується у грип-індукованих епітеліальних клітинах легенів або лейкоцитах (127, 128). В той час як NO продукується іNOS у грип-активованих макрофагах (129), нейтрофілах (130), пневмоцитах II типу (131) і епітеліальних клітинах дихальних шляхів (131). Підвищення рівня АФК та АФН у клітині регулюється за рахунок грип-індукованих імунних та про-запальних цитокінів (IFN- γ , IL-6 та TNF- α) (132). Генерація O_2^- збільшується в часовій залежності з часовим профілем майже паралельним до NO індукції (125). Часовий профіль іNOS індукції у легенях добре корелює з патологічними проявами вірусної пневмонії, що може бути безпосередньо пов'язаним з патогенезом вірусної пневмонії (125, 127).

У зв'язку з тим, що L-аргінін використовується у якості субстрату для іNOS та метаболізується за допомогою ARG як частина циклу сечовини, між NOS та ARG існує тісний взаємозв'язок (133) (рис. 1.6). Крім того проміжний продукт утворення NO, гідроксйаргін є потенційним інгібітором ARG, тоді як аргініновий метаболіт, агматин інгібує синтез NO (134-136). Обидві форми ARG (ARGI та ARGII) містяться у легенях і відрізняються у регуляції і часі експресії; а саме ARGII індукувалася швидше (135, 137, 138). Активація ARG у епітеліальних клітинах дихальних шляхів спричиняє зниженню активності NOS2, знижуючи тим самим генерацію NO (135). Вище зазначені літературні дані вказують, що таргетне підвищення експресії ARGII може мати терапевтичне значення при інфекції грипу.

АФК виступають стимулюючими молекулами різних запальних процесів. Вони також прямо впливають на мембрани викликаючи перекисне окислення ліпідів (ПОЛ) (139); стимулюють метаболізм арахідонової кислоти з підвищенням продукції простагландинів, тромбоксину та лейкотрієнів (140); стимулюють акумуляцію нейтрофілів (141). АФН на противагу АФК володіють

прямими противірусними впливами, а саме сприяючи вродженій резистентності хазяїна до вірусу (127).

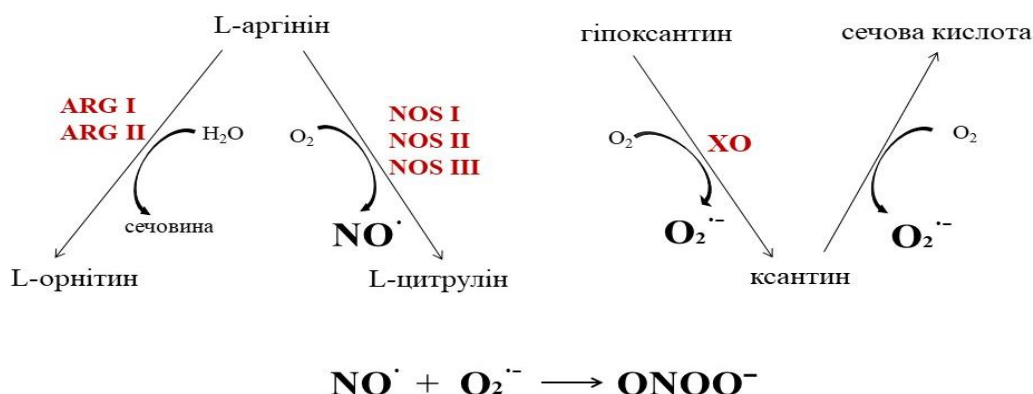


Рис. 1.6. Утворення АФК та АФН у клітині

Найбільш потужним оксидантом є пероксинітрит (ONOO^-), який утворюється унаслідок взаємодії NO та $\text{O}_2^{\bullet-}$ у інфікованих запальних тканинах і який ймовірно є найважливішим патогенним фактором пневмонії індукованої вірусом грипу у мишей (125). ONOO^- може викликати різні патологічні події під час вірусних інфекцій, такі як апоптоз та некроз клітин хазяїна. Виявлено, що ONOO^- -індукований апоптоз виникає через пошкодження мітохондрій призводячи до вивільнення цитохрому С (142). Крім того, ONOO^- активує матриксні металопротеїнази, які беруть участь у внутрішньоклітинному пошкодженні тканин та ремоделюванні (143). Відповідно оксидативно-нітрозативні пошкодження у інфікованих вірусом грипу легенях можуть бути зумовлені ONOO^- -індукованою активацією металопротеїнази. ONOO^- також викликає окислення та нітрування амінокислотних залишків протеїнів та гуанідину ДНК, ПОЛ та розщеплення ДНК (144).









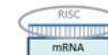



1.3. Терапевтичні олігонуклеотиди

Останні десятиліття широкого дослідження набула олігонуклеотидна терапія у якій використовуються хімічно синтезовані невеликі нуклеотид-

подібні молекули. До числа терапевтичних олігонуклеотидів відносять малі РНК (siRNA), мікроРНК (miRNA), аптамери, антисенсусні та CpG (cytosine-phosphodiester-guanine oligonucleotides) олігонуклеотиди (Таблиця 1.2) (145-149).

Таблиця 1.2.

Класифікація та характеристика основних синтетичних олігонуклеотидів

	Антисенсусні олігонуклеотиди	siRNA	miRNA	аптамери	CpG олігонуклеотиди
Типова структура	Одноланцюгова ДНК/РНК 	Дволанцюгова РНК 	Дволанцюгова РНК 	Одноланцюгова ДНК/РНК 	Одноланцюгова ДНК 
Механізм дії	 деградація мРНК, пригнічення транскрипції.  інгібування мРНК	 мРНК деградація мРНК	 деградація мРНК  пригнічення транскрипції	 інгібування функцій білка	 стимуляція імунної системи
Характеристики	Різноманітні механізми. деградація мРНК, регуляція сплайсенгу, інгібування мРНК	Специфічні впливи на мРНК з комплементарною послідовністю	Одні miRNA можуть регулювати декілька транскриптів	Висока специфічність через трьохрозмірну структуру	Висока стимуляція імунної системи

siRNA, miRNA та антисенсусні олігонуклеотиди – короткі, некодуючі молекули РНК (~18 - 30 нуклеотидів), які відіграють важливу роль у клітинних процесах, таких як диференціювання, ріст/проліферація, міграція, апоптоз/смерть, метаболізм та захист клітин (150, 151). Короткі РНК можуть негативно регулювати експресію генів на транскрипційному чи посттранскрипційному рівні у результаті чого відбувається пряма специфічно-

комплементарна деградація мРНК. Даний процес описаний як РНК інтерференція (152, 153).

Аптамери – синтетичні одноланцюгові ДНК (ssDNA) або послідовності РНК, які можуть зв'язуватися з високою афінністю та специфічністю до широкого спектру молекул-мішеней, таких як білки, поверхневі рецептори клітини і навіть цілі клітини (148, 149), а також інших органічних або неорганічних молекул, таких як аденозин (також АМФ і АТФ), барвники, амінокислоти, лікарські засоби або прості невеликі катіони (154). Показано, що 2'-5'-олігоаденилати мають противірусну активність і можуть зв'язуватися з деякими білками (інтерферон α , S100 кальцій-зв'язуючий білок А1, протеїнкінази) та змінювати їх конформацію (155-157).

Теоретично синтетичні олігонуклеотиди можуть застосовуватися терапевтично при будь-яких захворюваннях та інфекціях (145-147, 158, 159). Однак олігонуклеотиди погано транспортуються до цільового місця (160). Ефективності дії олігонуклеотидів у організмі вдається досягнути за рахунок підвищення стабільності цих препаратів шляхом хімічної модифікації молекули нуклеїнової кислоти (161).

Окрім синтетичних олігонуклеотидів, відомі також природні олігонуклеотиди, які можна використовувати як терапевтичні агенти (162, 163). На противагу синтетичним, природні олігонуклеотиди взаємодіють із молекулами-мішенями неспецифічно та мають активність при різних захворюваннях.

1.3.1. Характеристика ОРН та ОРН-D-M та їх властивості. Олігорибонуклеотиди (ОРН) – природна гетерогенна низько-полімерна РНК з різною кількістю нуклеотидів (5 до 25 нуклеотидів). Відомо, що у тотальній РНК дріжджів переважають олігонуклеотиди і тРНК з великою кількістю мінорних основ (164).

У зв'язку з широким застосуванням у фармакології цукрових наповнювачів (манітолу, сорбітолу, лактози) були проведені дослідження

комплексоутворення ОРН з цукровими лігандами. Аналіз результатів показав, що максимум утворення комплексу між ОРН та манітолом, майже 100 %, відбувається при співвідношенні РНК : D-манітол - 75 : 25 %, у той час як максимум комплексоутворення ОРН і лактози був лише 38 %, а ОРН та сорбітолу - 25 % (165).

Манітол – це поліморфна кристалічна тверда речовина, яка здатна структурувати водяну оболонку, підвищувати розчинність і стабільність лікарських засобів (166). Манітол може мати декілька кристалічних форм, що впливає на фізико-хімічні властивості речовин, до складу яких він входить. Таким чином у результаті аналізу літературних та дослідних даних нашими колегами було створено комплекси ОРН з D-манітолом (ОРН-D-M). Методом мас-спектрометрії виявлено, що у ОРН-D-M молекула D-манітолу взаємодіє з азотистими основами ОРН змінюючи їхню хімічну будову (167). ОРН-D-M зареєстровані в Україні під комерційною назвою Nuclex.

ОРН та ОРН-D-M можуть взаємодіяти з IFN- β виступаючи у ролі ліганду, змінюючи його вторинну конформацію *in vitro* (168). Дослідження ліганд-білкової взаємодії показало, що препарати ОРН взаємодіють з IFN- β не специфічно з низькою афінністю. Також виявлено, що ОРН-D-M взаємодіють з білком з суттєвою константою дисоціації у порівнянні з ОРН. Інтенсивність взаємодії ОРН забезпечується D-манітолом шляхом стабілізації ОРН (168).

ОРН та ОРН-D-M мають протизапальну дію. (164, 169). ОРН характеризуються вираженою мембраностабілізуючою дією, яка супроводжується нормалізацією активності NO-синтетази та антиоксидантної активності в умовах *in vitro* та *in vivo* (168). Мембранна стабільність у присутності надлишку вільних радикалів забезпечується ОРН шляхом нормалізації процесу транспортування протонів (що пояснюється станом білкових і ліпідних компонентів еритроцитарних плазматичних мембран) (164). У той же час, ОРН нормалізують метаболізм арахідонової кислоти та рівень її ключових метаболітів, тромбоксану і лейкотрієну. ОРН також здатні

нормалізувати деякі імунологічні показники, а саме рівень моноклеарних клітин (Т-лімфоцити, В-лімфоцити і макрофаги (164, 169).

У хворих на діабет ОРН-D-M регулює цитокінетичний профіль (TNF α , IL-1 β , IL-2, IL-4), що вказує на протизапальну дію препарату і його вплив на загальну систему уродженого захисту (170, 171).

Окрім протизапальної дії, ОРН-D-M – ефективний кардіо- та гепатопротектор (172-175), а також стимулює міграцію стовбурових клітин кісткового мозку (176).

У місці інфаркту міокарда виявлено, що ОРН-D-M зменшує зону та масу некрозу і попереджує пошкодження кардіоміоцитів при кардіоцитолізі (173). При внутрішньокоронарній інфузії ОРН-D-M підвищував адренергічну реактивність серця та покращував відновлення вихідних показників кардіогемодинаміки після стимуляції адренергічних рецепторів серця впливаючи на функціональний стан адренергічної і холінергічної систем та процесів синтезу оксиду азоту (172).

При тіоацетамід-індукованому ураженню печінки ОРН-D-M проявляє захисний ефект, який може бути пов'язаний з його протизапальною дією, інгібуючи надекспресію мРНК цитокінів і безпосередньо впливаючи на метаболізм токсину (175).

1.3.2. Противірусна активність ОРН та ОРН-D-M. ОРН та ОРН-D-M володіють противірусним ефектом проти широкого спектру ДНК- та РНК-вірусів: гепатиту С, вірусу простого герпесу I та II типу, парагрипу, грипу, Епштейна-Бар, аденовірусу та ВІЛ (162, 163, 177-180).

Показано, високу протигрипозну активність препарату ОРН-D-M як при профілактиці так і лікуванні інфекції грипу (181). Було також виявлено, що препарат інгібує активність NA в умовах *in vitro* (181).

Клінічні дослідження на гепатит С позитивних пацієнтах показали, що ОРН-D-M має специфічну противірусну дію, безпосередньо впливаючи на репродукцію вірусу та нормалізуючи підвищення сигналізації IFN, який вказує

на здатність препарату регулювати антивірусний захист на рівні вродженої імунної системи (177).

Отже, ОРН-D-M може впливати на поверхневі вірусні білки та систему вродженого імунітету під час вірусної інфекції. Вивчення впливу ОРН-D-M на поверхневі глікопротеїни та сигнальні шляхи вродженої імунної відповіді є важливим для характеристики механізму дії ОРН-D-M як противірусного препарату.

ОРН-D-M може також використовуватися як противірусний препарат при ко-інфекціях як з вірусними так і бактеріальними патогенами (182, 183). Під час комплексного лікування з ОРН-D-M пацієнтів з (ГРВІ) спостерігалася ерадикація вірусів грипу, парагрипу, риновірусів та аденовірусів (183). Крім того у ВІЛ-інфікованих осіб із токсоплазмозом додаткове до антиретровірусної терапії застосування ОРН-D-M сприяло зростанню CD4⁺T-лімфоцитів в периферійній крові та призводило до підвищення рівня IL-2, INF- γ та зниження підвищених рівнів IL-10, TNF- α (182).

Незважаючи на широкий спектр біологічних властивостей ОРН та ОРН-D-M, молекулярні механізми їхньої дії досі залишаються невідомими. Вивчення впливу ОРН та ОРН-D-M на гемаглютенін-гліканову взаємодію, яка є невід'ємним елементом інфекційності вірусу, є актуальним та допоможе встановити механізм дії препаратів ОРН при вірусних інфекціях, зокрема вірусу грипу. Тоді як вивчення впливу ОРН та ОРН-D-M на TLR-асоційовану вроджену імунну відповідь індуковану вірусом грипу дозволить з'ясувати механізм протизапальної дії препаратів ОРН. Для з'ясування впливу ОРН та їхніх комплексів на вроджену імунну відповідь нами відібрано низку генів, експресія яких, як відомо, суттєво зростає у відповідь на інфекцію вірусом грипу. Отримані результати дослідження могли б допомогти виявити гени-мішені ОРН під час інфекції вірусом грипу.

РОЗДІЛ 2.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Біологічний матеріал

У роботі було використано лінію клітин MDCK, миші лінії BALB/c, вакцина «Ваксигрип/VAXIGRIP», еритроцити людини 0 (I), вірус грипу A/Fort Monmouth/1/1947-адаптований до мишей (H1N1) (A/FM/1/47/H1N1), пандемічний A/California/07/2009(H1N1)pdm09 (A/CA/7/09/H1N1) та пташиний вірус грипу A/mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2) (A/MP/10218/84/H5N2). Віруси грипу A/FM/1/47/H1N1, A/CA/7/09/H1N1 та A/MP/10218/84/H5N2 було отримано з Національної вірусологічної колекції музею Інституту вірусології ім. Д.І. Івановського Російської академії медичних наук (РФ) та клітини MDCK отримано з колекції Російські культури клітин РФ. Миші BALB/c були отримані з Інституту біоорганічної хімії ім. М. М. Шемякіна-Ю.А. Овчинникова РФ. Вірус грипу A/FM/1/47/H1N1 пройшов 15 пасажів у мишах BALB/c. П'ять днів після зараження вірусом грипу A/FM/1/47/H1N1 спостерігалася 100 % смертність тварин.

ОРН, кристалічна тотальна РНК виділена з дріжджей *Saccharomyces cerevisiae*, отримана від компанії Goodwill Associates Ins, США. Домінуюча фракція ОРН – 3-6 нуклеотидів. Сумарна молекулярна маса ОРН становить 3 кДа (3000 г/моль). Природні ОРН є високоочищеним, апірогеним препаратом рибонуклеїнової кислоти, який не містить білки та продукти їхнього часткового гідролізу, полісахариди та інші домішки (№UA/2810/01/01 реєстраційного посвідчення на лікарський засіб МОЗ України). ОРН є одноланцюговими молекулами, які можуть мати різні типи просторової структури, у яких деякі нуклеотиди одного і того ж ланцюга приєднуються один до одного.

ОРН-D-M (комплекси ОРН та D-манітолу) отримані з Дочірнього підприємства «Biosell», Київ, Україна (№UA/5066/01/02 реєстраційного посвідчення на лікарський засіб МОЗ України). ОРН та ОРН-D-M (до 10 мг/мл) розчині у 0,9 % NaCl, буфері PBS (pH 7,4) та у культуральному середовищі.

2.2. Культивування клітин MDCK

Клітини MDCK культивували у середовищі RPMI-1640 (SIGMA, США) з додаванням фетальної бичачої сироватки (FBS) (SIGMA, США) до кінцевої концентрації 10 %, у CO₂ інкубаторі (Thermo Scientific, США) при 37 °C та 5% CO₂. Попередньо до середовища RPMI-1640 додавали антибіотико-антимікотичний розчин (SIGMA, Ізраїль) та HEPES (SIGMA, США) у концентраціях запропонованих виробником. При досягненні клітинами конфлюентності (90 %) їх пересівали в розведенні 1:2-1:6. Для відкріплення клітин з поверхні вентильованого флакону (Orange Scientific, Бельгія) відбирали культуральне середовище, клітини промивали розчином Версену (0.2 г/л ЕДТА розведеного у PBS) та інкубували у розчині трипсин-ЕДТА (SIGMA, США) 5-15 хв при 37 °C. Після цього клітини ресуспендували та переносили у середовище для культивування. Для роботи у стерильних умовах використовували вертикальний ламінарний бокс II класу захисту з HEPA-фільтром H14 (Thermo Scientific, Німеччина).

2.3. Аналіз життєздатності клітин за дії вірусу грипу A/FM/1/47/H1N1 та ОРН та ОРН-D-M

Пряму інактивуючу дію ОРН та ОРН-D-M оцінювали за допомогою аналізу інгібування вірусної цитопатичної дії (ЦПД) та МТТ-тесту. Клітини лінії MDCK висівали на плоскодонний 96-лунковий планшет (5×10³/лунку) та

інкубували у ростовому середовищі RPMI-1640 (10 % FBS) протягом 24 год. Після інкубації з усіх лунок відбирали ростове середовище і тричі промивали клітини, додаючи 35 мкл/лунку RPMI-1640 з трипсином ТРСК (2 мкг/мл). Вірус грипу A/FM/1/47/H1N1 (інфекційний титр – 4,0 lg ТЦД₅₀, титр НА – 128 НАО) попередньо інкубували з ОРН (2,5 мг/мл) та ОРН-D-M (3,5; 0,35; 0,035 мг/мл) протягом 30 хв при 20 °С. Далі підготовлені клітини інфікували вірусом, додаючи 35 мкл/лунку. У серії дослідів у якості контролю були клітини, які не були інфіковані вірусом та не піддавалися дії препаратів, тоді як контролем вірусу грипу служили клітини, яких заражали вірусом грипу без попередньої інкубації з препаратами. Для контролю препаратів до клітин у планшеті додавали по 100 мкл/лунку ОРН (2,5 мг/мл), D-M (1,0 мг/мл) (Sigma, США), ОРН-D-M (3,5 мг/мл). Досліджувані препарати та вірус грипу готували у безсироватковому середовищі. Дослідження проводили у восьми паралелях ($n = 8$ лунок з клітинами) для кожної дослідної або контрольної точки. Після додавання вірусу грипу до клітин, планшети з клітинами інкубували протягом 45 хв при 37 °С для ефективної вірусної адсорбції. Після інкубації клітин з вірусом, з усіх досліджуваних та контрольних лунок відбирали вірус-вмісне середовище і додавали по 100 мкл RPMI-1640 з трипсином ТРСК (2 мкг/мл) без FBS. Надалі планшет з контрольними та інфікованими клітинами інкубували протягом 48 год при 37 °С у присутності 5 % CO₂.

Через 48 годин після інфікування, індуковану вірусом грипу ЦПД аналізували за допомогою інвертованого мікроскопа CETI Versus (CETI, Бельгія). Результати експерименту документували, фотографуючи моношари клітин, використовуючи USB камеру UCMOS та програмне забезпечення TopView.

Життєздатність клітин через 48 годин після інфікування вірусом грипу визначали використовуючи 3,4,5-диметилтіазол-2-іл-2,5-дифеніл-тетразоліум бромід (МТТ) (“Sigma”, США), який у живих клітинах за допомогою НАДФ-Н-залежних оксидоредуктаз перетворюється на фармазан (пурпурного кольору). Для цього з лунок з контрольними та дослідними клітинами відбирали

інкубаційне середовище та додавали 100 мкл/лунку розчину МТТ (15 мкл/лунку 5 мг/мл МТТ та 85 мкл безсироваткового середовища). Клітини у МТТ буфері інкубували протягом 4 год при 37 °С. Надалі МТТ буфер відбирали та лізували клітини додаючи по 150 мкл/лунку DMSO. Оптичну густину клітин вимірювали у планшетному приладі ELx800 Absorbance Reader (BioTek, США) при довжині хвилі 570 нм. Дані представляли як відсоток вмісту життєздатних клітин відносно 100 % контролю.

2.4. Визначення впливу ОРН та ОРН-D-M на інфекційність вірусу грипу A/FM/1/47/H1N1

Клітини MDCK висівали (5×10^3 /лунку) у чотири 96-лункові плоскодонні планшети (Orange Scientific, Бельгія) та культивували в середовищі RPMI-1640 з додаванням 10 % FBS. Після 24 годинної інкубації поживне середовище відбирали з кожної лунки всіх чотирьох планшетів і клітини тричі промивали середовищем RPMI-1640 з трипсином ТРСК (2 мкг/мл) (Sigma, США) додаючи 35 мкл/лунку. Вірус грипу A/FM/1/47/H1N1, 7,8 lg ТЦД₅₀, 512 НАО було розділено на чотири мікропробірки: контроль грипу (вірус без препаратів), вірус грипу+ОРН (вірус з ОРН, 2,5 мг/мл), вірус грипу+D-M (вірус з D-M, 1,0 мг/мл), вірус грипу+ ОРН-D-M (вірус з ОРН-D-M, 3,5 мг/мл). Вірус грипу разом та без препаратів попередньо інкубували протягом 30 хв при кімнатній температурі. Після вірусної передінкубації, вірус з кожної дослідної мікропробірки розводили десятикратно від 10^0 до 10^{-10} та надалі проводили зараження клітин. Клітини в одному з чотирьох 96-лункових планшетів заражали одним контрольним, або дослідним вірусом грипу (35 мкл/лунку) в десятикратних розведеннях від 10^0 до 10^{-10} (в одному 96-лунковому планшеті визначали інфекційний титр вірусу з однієї мікропробірки). Контролем клітин у кожному 96-лунковому планшеті служили клітини у яких змінювали ростове середовище на безростове, яке містило 2 мкг/мл трипсин ТРСК. Дослідження

проводили у восьми параллелях ($n = 8$ лунок з клітинами) для кожної дослідної або контрольної точки. Для вірусної адсорбції планшети з інфікованими клітинами інкубували протягом 45 хв при 37 °С. Після інкубації клітин з вірусом відбирали інфекційне середовище з усіх досліджуваних лунок і додавали до клітин по 100 мкл RPMI-1640 з трипсином ТРСК (2 мкг/мл) без FBS. Контрольні клітини (без інфікування вірусом грипу) залишалися без змін. Планшети з контрольними та інфікованими клітинами продовжували інкубувати протягом 48 год при 37 °С. Для того щоб оцінити вплив препаратів на інфекційний титр вірусу грипу проводили аналіз тканинної цитопатогенної дії (ТЦД₅₀) за методом Ріда і Менча (184). Інфекційний титр кожного з вірусів виражали як інфекційну дозу вірусу у культурі тканин, яка призвела до 50 % інфікування клітин.

Для того щоб оцінити зниження інфекційного титру вірусу грипу у залежності від концентрації ОРН-D-M, вірус грипу A/FM/1/47/H1N1 інкубували з ОРН-D-M різної концентрації (0,035; 0,35 та 3,5 мг/мл) протягом 30 хв при кімнатній температурі та визначали інфекційний титр як описано вище.

2.5. Аналіз впливу ОРН та ОРН-D-M на активність НА вірусу грипу A/FM/1/47/H1N1

Вплив ОРН та ОРН-D-M на активність НА вірусу грипу оцінювали опосередковано, визначаючи НА титр вірусу грипу A/FM/1/47/H1N1 за допомогою реакції гемаглютинації (РГА). РГА аналізували у 96-комірковому круглодонному планшеті з використанням 1 % еритроцитів людини 0 (I) розведених у 0,9 % NaCl. Спочатку в усі комірки планшета додавали по 50 мкл 0,9 % NaCl. Вірус грипу, 4,0 lg ТЦД₅₀, 128 НАО попередньо інкубували з препаратами ОРН (2,5 мг/мл), D-M (1,0 мг/мл) та ОРН-D-M (0,035; 0,35 та 3,5 мг/мл) при 20 °С протягом 30 хв. У першу комірку планшетного ряду додавали

50 мкл досліджуваного або контрольного зразка. Зразок перемішували, відбирали 50 мкл та переміщали в наступну комірку. Двократне розведення повторювали зліва направо до кінця колонки одного ряду планшета і відбирали 50 мкл з останньої лунки. У всі дослідні та контрольні лунки планшета додавали 50 мкл робочого 1 % розчину еритроцитів і обережно перемішували. Надалі реакційні суміші інкубували при кімнатній температурі протягом 60 хв. Негативними контролями були препарати ОРН, D-M та ОРН-D-M у таких самих концентраціях, як в дослідних зразках, але без попередньої інкубації з вірусом. Позитивним контролем служив вірус грипу, який попередньо інкубували без препаратів. Дослідження проводили у тьох паралелях для кожної досліджуваної або контрольної точки дослідження. Результати експерименту документували, фотографуючи реакційні планшети. Негативний результат мав вигляд крапки в центрі круглодонного планшета, тоді як позитивний результат — сформований рівномірний червоний колір в лунці. Титр НА вірусу грипу визначали як число крайнього розведення з позитивним результатом.

2.6. Визначення взаємодії ОРН та ОРН-D-M з ізольованим НА

Для дослідження взаємодії препаратів РНК з НА вірусу грипу було використано вакцину «Ваксигрип/VAXIGRIP» (Sanofi Pasteur, Франція). «Ваксигрип» – спліт-вірус грипу, а саме поверхневий антиген НА у концентрації 45 мкг/ 0,5 мл (вірусів грипу A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09-подібний (A/Michigan/45/2015, NYMC X-275), A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2)-подібний, (A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B) B/Brisbane/60/2008-подібний (B/Brisbane/60/2008, дикий тип), які культивували на курячих ембріонах здорових курей).

2.6.1. Визначення впливу ОРН та ОРН-D-M на утворення НА-гліканової взаємодії. Утворення НА-гліканової взаємодії оцінювали опосередковано визначаючи титр НА за допомогою РГА. НА у концентрації 225 нг/мл інкубували з ОРН (2,5 мг/мл), D-M (1,0 мг/мл) (Sigma, США) та ОРН-D-M (0,8; 1,7; 3,5 мг/мл) протягом 30 хв при кімнатній температурі. Препарати та білок розводили у фізіологічному розчині, 0,9 % NaCl. Після інкубації НА з препаратами, РГА проводили як описано у підрозділі 2.5.

Для того щоб оцінити тривалість впливу ОРН-D-M на активність НА, НА (225 нг/мл) інкубували з ОРН-D-M (3,5 мг/мл) протягом 30 хв, 1, 2, 4 та 24 год при кімнатній температурі та проводили РГА (див. підрозділ 2.5.).

2.6.2. Аналіз впливу ОРН та ОРН-D-M на інтенсивність флуоресценції НА. Гасіння флуоресценції НА за дії ОРН та ОРН-D-M вимірювали у спектрофлюориметрі FP-8200 (Jasco, Японія). Спектри та 3D-спектри флуоресценції НА, ОРН, ОРН-D-M, НА-ОРН та НА-ОРН-D-M реєстрували при кімнатній температурі. Дослідження проводили у буфері PBS (Sigma Aldrich, США), рН 7,4. Спочатку проводили вимірювання 3D-спектрів флуоресценції (тотальна флуоресценція зразка) білка НА та лігандів ОРН, ОРН-D-M для того щоб визначити максимум їх збудження та можливість перекривання спектрами. Вимірювання тотальної флуоресценції НА у концентрації 0,15 μM та ОРН, ОРН-D-M - 54,3 μM проводили при наступних умовах: довжина хвилі збудження λ_{Ex} 200-400 нм; довжина хвилі вимірювання, λ_{Em} 210-750; ширина щілини – 5 нм; швидкість сканування – 10 000 нм/хв; вольтаж детектора – 500 V.

Спектри флуоресценції НА за дії ОРН та ОРН-D-M реєстрували за таких параметрів: λ_{Ex} становила 275 нм; λ_{Em} становила 280-450 нм; інтервал даних – 1 нм; ширина щілини – 2,5 нм; швидкість сканування – 100 нм/хв; вольтаж детектора – 500 V. НА у концентрації 0,15 μM титрували по 5 мкл 1 мМ ОРН та ОРН-D-M до повного гасіння флуоресценції. Після повного гасіння флуоресценції білка НА з лігандами ОРН та ОРН-D-M, проводили вимірювання 3D-спектрів флуоресценції НА-ОРН та НА-ОРН-D-M для того щоб додатково

зробити висновок про зміни у конформації НА після взаємодії з препаратами ОРН та ОРН-D-M.

Побудову спектрів гасіння флуоресценції НА за дії ОРН та ОРН-D-M та розрахунок константи дисоціації проводили за допомогою програми Origin 8.1 (OriginLab, США). Для оцінки константи дисоціації була використана наступна формула:

$$K_d = \frac{(1 - \theta) \times (D - (\theta \times P_0))}{\theta}$$

де K_d – константа дисоціації; θ – фракція, пов'язана із тотальним білком у стехіометричній точці; P_0 – загальна концентрація білка в кюветі; D – концентрація ліганду у будь-якій точці титрування (185).

2.7. Дослідження протівірусної дії ОРН-D-M проти вірусів грипу A/CA/7/09/H1N1 та A/MP/10218/84/H5N2

Клітини MDCK (5×10^3 /лунку) культивували у середовищі MEM з додаванням 10 % FBS у 96-лунковому плоскодонному планшеті. Препарат ОРН-D-M у концентраціях 0,05; 0,17; 0,5; 1,7 та 5 мг/мл розчиняли у середовищі MEM з трипсином ТРСК (1 мкг/мл) без FBS. Для інкубації з ОРН-D-M, клітини промивали використовуючи середовище MEM без сироватки з трипсином ТРСК (1 мкг/мл). Надалі до клітин додавали 100 мкл/лунку ОРН-D-M відповідної концентрації та інкубували 1 год при 37 °С. Після інкубації клітини відмивали від препарату буфером PBS та інфікували з вірусом (MOI 0,01), 35 мкл/лунку протягом 1 год при 37 °С. Моношари клітин на наступному кроці відмивали двічі з буфером PBS від залишків вірусу грипу та додавали 100 мкл/лунку середовища, яке містило трипсин ТРСК (1 мкг/мл).

Плашки інкубували наступні 48 год при 37 °С у присутності 5 % CO₂. Титр вірусу визначали за методом ТЦД₅₀ як описано Рідом і Менчем (184) та розраховували 50 % інгібуючу концентрацію та селективний індекс для кожної концентрації ОРН-D-M. Римантадин використовували в якості референтного препарату. Дослідження було проведено у лабораторії експериментальної вірусології, Санкт-Петербурзького Інституту епідеміології та мікробіології імені Пастера.

2.8. Аналіз впливу ОРН та ОРН-D-M на індуковану вірусом грипу А/ФМ/1/47/Н1N1 гіперекспресію генів вродженого імунітету

Вплив ОРН та ОРН-D-M на гіперекспресію генів вродженого імунітету спричинену вірусом грипу *in vivo* вивчали на моделі грипозної пневмонії у мишей за профілактичною та лікувальною схемами [186]. Миші лінії BALB/c (14-16 г), 6-8 тижневого віку ділили на вісім груп: контрольна група – здорові миші, яким вводили 0,9 % NaCl ($n = 6$); група контроль ОРН – здорові миші, яким вводили ОРН ($n = 6$); група контроль ОРН-D-M – здорові миші, яким вводили ОРН-D-M ($n = 6$); група контроль грипу – миші інфіковані вірусом грипу ($n = 6$); група профілактичний вплив ОРН – введення ОРН мишам 24 години перед зараженням вірусом грипу ($n = 6$); група профілактичний вплив ОРН-D-M – введення ОРН-D-M мишам 24 години перед інфікуванням вірусом грипу ($n = 6$); група лікувальний вплив ОРН – введення ОРН мишам 24 години після інфікування вірусом грипу ($n = 6$); група лікувальний вплив ОРН-D-M – введення ОРН-D-M мишам 24 години після інфікування вірусом грипу ($n = 6$). Кожній миші у групі для інфікування вводили інтраназально 100 мкл вірусу грипу А/ФМ/1/47/Н1N1, 4,0 lg LD₅₀ розведеного у стерильному 0,9 % NaCl. А також кожній миші у групі для профілактики, лікування та контролю препаратів ОРН та ОРН-D-M, одноразово внутрішньочеревно вводили по

100 мкл ОРН (15 мг/кг) та ОРН-D-M (21 мг/кг), які розчиняли у стерильному 0,9 % NaCl. Концентрації даних препаратів підібрані як мінімально активна концентрація діючої речовини проти вірусу грипу A/FM/1/47/H1N1 *in vivo* (181). Через 48 годин після інфікування вірусом грипу (пік реплікації вірусу) тварин вбивали та їх легені заморожували на -80 °C у низькотемпературному холодильнику (Thermo Scientific, США). Дослідження було проведено у лабораторії експериментальної хіміотерапії вірусних інфекцій ДУ Інституту епідеміології та інфекційних захворювань ім. Л.В. Громашевського НАМН України. Лабораторія була сертифікованою ДП «Укрметртестстандарт» на проведення дослідження антивірусної та віруліцидної активності сполук хімічного та рослинного походження на тваринах та культурах клітин №ПТ 426/14 від 8 грудня 2014. Усі процедури під час дослідження були виконанні у відповідності з етичними стандартами (Federalwide Assurance No 00019663). Експеримент повторювали тричі.

2.8.1. Виділення тотальної РНК. Виділення тотальної РНК з тканин легенів проводили у приладі BeadRetriever system (Invitrogen, Фінляндія) з використанням NucleoMag 96 RNA Kit (MACHEREY-NAGEL, Німеччина). Гомогенізовані тканини легенів мишей (20 мг) у рідкому азоті лізували у 350 мкл лізис буферу MR1 з додаванням 6 мкл відновника TCEP та перемішували на шейкері Vortex V-1 plus (Biosan, Латвія). Лізати очищали центрифугуванням протягом 5 хв при 10 000 g. Для того щоб зв'язати тотальну РНК з магнітними частинками, до чистих лізатів додавали 28 мкл магнітних частинок NucleoMag B-Beads та 350 мкл зв'язуючого буферу MR2. Лізати з магнітними частинками перемішували та інкубували 5 хв при кімнатній температурі та центрифугували протягом 2 хв при 2 000 g. Після центрифугування відбирали надосадову рідину, а до осаду додавали 300 мкл буферу з ДНКазою та інкубували 15 хв при кімнатній температурі. Наступні етапи виділення РНК проводили у приладі BeadRetriever system. Етапи відмивання проходили згідно з протоколом NucleoMag 96 RNA Kit. Однак елюція РНК проходила у 100 мкл буферу для елюції MR5. Виділену тотальну

РНК відбирали у стерильні, чисті від РНКаз мікропробірки та швидко заморожували у низькотемпературному холодильнику на -80°C .

2.8.2. Визначення кількості та чистоти виділеної РНК. Кількість виділеної тотальної РНК визначали спектрометрично на MaestroNano Pro Micro-Volume MN-913 spectrophotometer (MAESTROGEN, Тайвань). Чистоту РНК оцінювали за відношенням 260/280 нм. Цілісність виділеної РНК оцінювали на приладі Microchip electrophoresis system (MCE-202/MultiNA SHIMADZU, Німечина) відповідно до протоколу наведеному в інструкції приладу використовуючи RNA reagent kit for MultiNA (SHIMADZU, Німечина), SYBR Green II RNA gel stain (lifetechnologies, США) та RNA 6000 Ladder (lifetechnologies, США), виділену тотальну РНК в концентрації 180 нг/мкл. Аналіз якості виділеної РНК виявляли за співвідношенням інтенсивності смуг 28S:18S рРНК (2:1). Результат аналізу видається у вигляді розмірних одиниць довжин пар нуклеотидів (пн). Зразки РНК які мали відповідну інтенсивність смуг 28S – 4700 пн. та 18S – 1900 пн у подальшому були використані у наступній роботі (рис. 2.1).

2.8.3. Синтез кДНК. З кожної виділеної тотальної РНК (2 мкг) синтезували кДНК використовуючи RevertAid H Minus First Standart cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, США). Зворотна транскрипція включала random hexamer та oligo (dT)18 праймери у співвідношенні (1:3) та проходила за наступних температурних умов: інкубація 120 хв при 42°C , нагрівання до 70°C за 5 хв та охолодження в льоду.

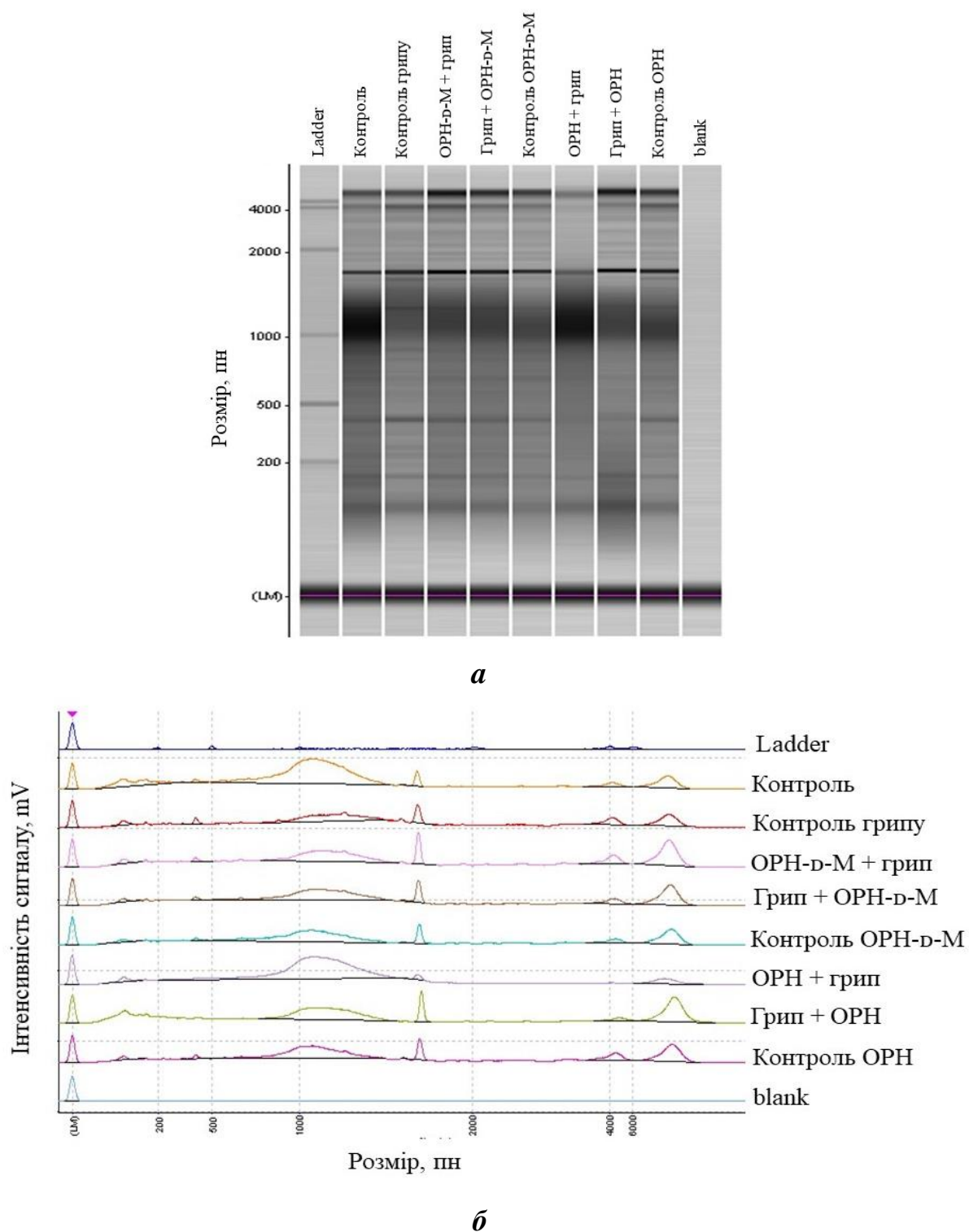


Рис. 2.1. Зображення гелю (*а*) та електрофореграми (*б*) зразків тотальної РНК: Ladder – маркер молекулярних мас РНК; blank – негативний контроль (без РНК); пн – пар нуклеотидів

2.8.4. Полімеразна ланцюгова реакція у режимі реального часу (ПЛР-РЧ). ПЛР-РЧ проводили у приладі Thermal Cycler CFX96 Real-Time system (BIO-RAD, Сінгапур) використовуючи 10 мкл maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR master mix (Thermo Scientific, США), 0,3 мкл кДНК зразка, 1,5 мкл ген специфічного праймера та 8,2 мкл води вільної від нуклеаз, за таких умов на першому циклі денатурація ДНК 10 хв при 95 °С, на наступних 40 циклах денатурація при 95 °С 40 с, реасоціація праймерів 30 с при 60 °С та синтез продукту 30 с при 72 °С. Негативним контролем була проба з реакційною сумішшю без кДНК.

Дизайн праймерів для ПЛР-РЧ виконували в базі даних GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) за допомогою програми BLAST (187). Синтез підібраних нами праймерів здійснювався компанією Invitrogen, Фінляндія. Праймери, які було використано в реакції ПЛР-РЧ, наведено в Таблиці 2.1.

Таблиця 2.1.

Послідовності праймерів, що використовувались для досліджень змін експресії генів

Ген	Протеїн, який кодується геном	Послідовності праймерів (5'→3')
<i>Nos2</i>	NOS2	F 5'-TTT GTG CGA AGT GTC AGT GG-3' R 5'-TCC TTT GAG CCC TTT GTG C-3'
<i>Arg2</i>	ARG2	F 5'-TGA TTG GCA AAA GGC AGA GG-3' R 5'-CTG ACA GCA ACC CTG TAT TAT GTA-3'
<i>Xdh</i>	XDH	F 5'-CCA AGA TGG TTC AGG TGG C-3' R 5'-TCT GAC AGG CTT CAT AAA TGG C-3'
<i>Oas1a</i>	OAS1	F 5'-ACA GCT CAG AAA AGC CAG G-3' R 5'-CAG TTC TCT TCT ACC TGC TCA AA-3'
<i>Oas2</i>	OAS2	F 5'-CTA TGA TGC ACT AGG TCA ACT GC-3'

продовження Таблиця 2.1.

		R 5'-TTC CTT TCA TAC TGT TTG TAC CAG T-3'
<i>Oas3</i>	OAS3	F 5'-CAA AGC GTG GAC TTT GAC G-3' R 5'-ATG GTC TTG TTA CAC TGT TGG TA-3'
<i>Mx1</i>	MX1	F 5'-TGC TGT ACT GCT AAG TCC AAA-3' R 5'-GCA GTA GAC AAT CTG TTC CAT CTG-3'
<i>Eif2ak2</i>	PKR	F 5'-CACAGAGATCTTAAGCCAGGTAAT -3' R 5'-AGATGTCCACTTCTTTTCCATAGT -3'
<i>Rnase1</i>	RNASEL	F 5'-GGA CTT GGG AGA ACC GCT AT-3' R 5'-CAT TTT TGT CGA TCT TAG ATG TCC A-3'
<i>Ifnε</i>	IFN-ε	F 5'-CTG GAA TAC GTG GAG TCA CTG-3' R 5'-GAA CCT GAA CAC AAA GAA CAT ACA-3'
<i>Ifnκ</i>	IFN-κ	F 5'-GGA GTT GGG CAA GTA TTT CTT CA-3' R 5'-CTT GAA GGT GGG TGA TTC TGA TA-3'
<i>Ifnα2</i>	IFN-α	F 5'-CTT ACT CAG CAG ACC TTG AAC C-3' R 5'-CTG CTG CAT CAG ACA GGT TT-3'
<i>Ifnβ1</i>	IFN-β	F 5'-GAT GCT CCA GAA TGT CTT TCT TGT-3' R 5'-CGA ATG ATG AGA AAG TTC CTG AAG A-3'
<i>Ifnγ</i>	IFN-γ	F 5'-AAC TGG CAA AAG GAT GGT GA-3' R 5'-GTT GTT GAC CTC AAA CTT GGC-3'
<i>Ccl3</i>	CCL3	F 5'-GCC ATA TGG AGC TGA CAC C-3' R 5'-TTC TCT TAG TCA GGA AAA TGA CAC C-3'
<i>Ccl4</i>	CCL4	F 5'-AGG GTT CTC AGC ACC AAT G-3' R 5'-TCT TTT GGT CAG GAA TAC CAC AG-3'
<i>Ccl5</i>	CCL5	F 5'-CTC ACC ATC ATC CTC ACT GC-3' R 5'-TGA CAA ACA CGA CTG CAA GA-3'
<i>Cxcl9</i>	CXCL9	F 5'-CAA AAC TGA AAT CAT TGC TAC ACT GAA-3' R 5'-GGC TGA TCT TCT TTT CCC ATT C-3'

продовження Таблиця 2.1.

<i>Cxcl10</i>	CXCL10	F 5'-TGT TGA GAT CAT TGC CAC GAT-3' R 5'-CCT TTT AGA CCT TTT TTG GCT AAA CG-3'
<i>Cxcl11</i>	CXCL11	F 5'-CTG CTC AAG GCT TCC TTA TGT T-3' R 5'-TTT TTC TAT TGC CTG CAT TAT GAG G-3'
<i>Il6</i>	IL-6	F 5'-CTA CCA AAC TGG ATA TAA TCA GGA AAT-3' R 5'-TCT TTT ACC TCT TGG TTG AAG ATA TGA-3'
<i>Il1β</i>	IL-1β	F 5'-TTC ATC TTT GAA GAA GAG CCC AT-3' R 5'-TGG AGA ATA TCA CTT GTT GGT TGA-3'
<i>Il12α</i>	IL-12	F 5'-GTG AAG ACG GCC AGA GAA AA-3' R 5'-ACA GGG TCA TCA TCA AAG ACG-3'
<i>Tnfα</i>	TNF-α	F 5'-AAA GGG ATG AGA AGT TCC CAA AT-3' R 5'-ACT TGG TGG TTT GCT ACG AC-3'
<i>Nfkb1</i>	NF-κB1	F 5'-GGA CAT GGG ATT TCA GGA TAA CC-3' R 5'-AGA GGT GTC TGA TAC AGG TCA T-3'
<i>Nfkb1α</i>	NF-κB1α	F 5'-GAG ACT CGT TCC TGC ACT TG-3' R 5'-AAG TGG AGT GGA GTC TGC TG-3'
<i>Tlr3</i>	TLR3	F 5'-CCT CTT GAA CAA CGC CCA AC-3' R 5'-AGA GAA AGT GCT CTC GCT GG-3'
<i>Tlr7</i>	TLR7	F 5'-ATC CTC TGA CCG CCA CAA TC-3' R 5'-TCA CAT GGG CCT CTG GGA TA-3'
<i>Tlr8</i>	TLR8	F 5'-GCC CCC TCA GTC ATG GAT TC-3' R 5'-GAG GGA AGT GCT ATA GTT TGG GG-3'
<i>Gapdh</i>	GAPDH	F 5'-TGT CGT GGA GTC TAC TGG TGT CTT C-3' R 5'-CGT GGT TCA CAC CCA TCA CAA-3'

Відносний рівень мРНК генів *Xdh*, *Nos2*, *Arg2*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oas3*, *Mx1*, *Rnasel*, *Eif2ak2*, *Ifnε*, *Ifnk*, *Ifnα2*, *Ifnβ1*, *Ifnγ*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*,

Cxcl11, *Il6*, *Il1 β* , *Il12 α* , *Tnfa*, *Nfkb1*, *Nfkbia*, *Tlr3*, *Tlr7* та *Tlr8* визначали кількісною ПЛР-ЧР. Розрахунок проводили використовуючи формулу $2^{-\Delta Ct}$ (188). Рівень мРНК усіх досліджуваних генів нормалізували до мРНК гена *Gapdh* як одного з найбільш поширених референтних генів (189). Рівень мРНК гена *Gapdh* виражали як 100 одиниць експресії.

2.8.5. Вестерн-блот аналіз. Гомогенізовані у рідкому азоті тканини легенів мишей (20 мг) лізували у PBS з інгібітором протеаз (Sigma Aldrich, США). Концентрацію тотального протеїну у лізатах визначали методом Бредфорда (190) використовуючи Реагент Бредфорда (Sigma Aldrich, США) згідно протоколу «аналіз в 96 лунковому планшеті» запропонованого виробником. Тотальні протеїни зразків (30 мкг) фракціонували електрофорезом у 10 % ПААГ згідно з протоколом, описаним у роботі Леммлі (191). Розділені білки переносили із гелю на нітроцелюлозну мембрану (Amersham BioSciences, UK) за допомогою приладу для переносу білків (BIO-RAD, США) протягом однієї години при силі струму 15V. Нітроцелюлозну мембрану з перенесеними білками інкубували 1 годину у буфері PBST (PBS, 0.1 % Tween-20) з додаванням 5 % знежиреного сухого молока для блокування неспецифічного зв'язування. Мембрану відмивали три рази по 5 хв та надалі інкубували протягом ночі при 4 °C з первинними антитілами проти NF- κ B1 (1:500; Rabbit monoclonal; cat. no. 13586; Cell Signaling Technology, Нідерланди), I κ B α (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha) (1:500; mouse monoclonal; cat. no. sc-1643; Santa Cruz Biotechnology, США), β -actin (1:20,000; rabbit polyclonal cat. no. A2103; Sigma Aldrich, США) з наступним відмиванням три рази по 5 хв у буфері PBST та інкубуванням з кон'югованими з пероксидазою хрому видоспецифічними вторинними антитілами anti-mouse (1:3000; cat. no. 7076; Cell Signaling Technology, Нідерланди) та anti-rabbit (1:3000; cat. no. 7074; Cell Signaling Technology, Нідерланди) при кімнатній температурі протягом години. Для детекції імунних комплексів використовували chemiluminescence detection kit (Thermo Scientific, США) у відповідності інструкцій виробника. Хемілюмінесцентні сигнали були

сфотографовані у приладі ChemiDoc XRS + system (BIO-RAD, США). Відносний рівень протеїнів визначали денситометричним аналізом (192). Об'єм (інтенсивність) кожної зони хемілюмінесцентного сигналу був визначений кількісно за допомогою Image Lab Software (BIO-RAD, США). Об'єм (інтенсивність) хемілюмінесцентного сигналу білків NF- κ B1 та NF κ B α (I κ B α) був нормований до об'єму (інтенсивності) β -actin, який використовували як контроль експресії генів на рівні білку. Рівень білка у контрольних тварин приймали за 1 умовну одиницю (у.о.).

2.8.6. Визначення вмісту перекисного окислення ліпідів. Легені мишей гомогенізували рідким азотом та розчиняли у 3 мл 50 мМ PBS, рН = 7.4. Надалі 100 мкл гомогенізованого зразку додавали до 2.5 мл 0.025 М Трис-НСl, рН = 7,4 (з 0.175 М КСl), 1 мл 17 % розчину трихлороцитової кислоти та центрифугували при 4000 g протягом 10 хв при 4 °С. Концентрацію білка у зразках визначали методом Лоурі (193). Ендогенні продукти перекисного окислення ліпідів, які реагують на 2-тіобарбітурову кислоту (ТБК-активні продукти) вимірювали за допомогою SPECORD 210 Plus (Analytik Jena AG, Німеччина) на довжині хвилі 532 нм, як було описано Асакавим та Мацусітою (194).

2.8.7. Визначення інфекційного титру вірусу грипу. Гомогенізовані легені мишей у рідкому азоті розчиняли у стерильному PBS (100 мг/0,5 мл). Надалі зразки центрифугували 20 хвилин при 4 000 g та +4 °С та відбирали супернатанти. Інфекційний титр вірусу грипу у супернатантах визначали інфікуючи клітини MDCK використовуючи аналіз ТЦД₅₀ за методом Ріда і Менча (184).

2.9. Статистичний аналіз

Статистична обробка результатів для МТТ-тесту, аналізів ТЦД₅₀ та РГА була здійснена з використанням *t*- критерію Стьюдента за допомогою програми Excel (MS Office 2010).

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 (195).

Дані представлені у вигляді середнього арифметичного значення із зображенням стандартного відхилення (\pm SD). За критичний рівень достовірності при перевірці статистичних гіпотез приймали $p \leq 0,05$. Кожен експеримент повторювали не менш, ніж 3 рази.

РОЗДІЛ 3.

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Дослідження впливу ОРН та ОРН-D-M на інфекційність вірусу грипу *in vitro*

Дослідження антигрипозної дії олігорибонуклеотидів, які проводилися раніше в Інституті епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського АМН України, показали, що при грипозній інфекції *in vitro* максимально переносима концентрація ОРН-D-M становить 5 мг/мл, а мінімально активна концентрація 31 мкг/мл, хіміотерапевтичний індекс дорівнює 161. Розраховано ефективні дози ОРН-D-M: 1,25-10 мг/мл при профілактичній схемі введення *in vitro* та 0,6–10 мг/мл при лікувальній схемі. Крім того, цими дослідження було показано зниження NA та HA активності після інкубації вірусу грипу з ОРН-D-M у концентраціях 30,0; 1,0; 3,0; 10,0 мг/мл. Попри встановлену протигрипозну дію ОРН-D-M наразі можливі молекулярно-біологічні механізми дії не з'ясовані, розуміння яких є вкрай актуальним. Тож, першим логічним кроком дисертаційної роботи було дослідити можливий механізм противірусної дії олігорибонуклеотидів за рахунок їхнього впливу на HA вірусу грипу.

3.1.1. Пряма інактивуєча дія препаратів ОРН та ОРН-D-M на вірус грипу A/FM/1/47/H1N1. Апоптоз, який індукується під час інфекції вірусу грипу є основним фактором, що сприяє загибелі інфікованих клітин та пошкодженню тканин (196, 197). Ми припустили, що ОРН та їхні комплекси ОРН-D-M можуть підвищувати життєздатність клітин після вірусного інфікування шляхом інгібування інфекційності вірусу грипу у результаті взаємодії з HA. Тому ми провели оцінку вірус індукованої ЦПД та визначення

життєздатності клітин через 48 годин після інфікування клітин MDCK вірусом грипу, який попередньо був інкубований з препаратами ОРН та їхніми комплексами ОРН-D-M.

Дослідження проводились на лінії клітин MDCK, до якої вірус грипу A/FM/1/47/H1N1 проявляє високу тропність. Клітини MDCK інфікували вірусом грипу (інфекційний титр в культурі клітин - $4 \lg$ ТЦД₅₀, титр НА - 1: 128 НАО), який перед цим піддавався 30 хв інкубації з ОРН та комплексом ОРН-D-M. ЦПД спостерігали під світловим мікроскопом, а життєздатність клітин визначали за допомогою реагенту МТТ на 2 добу після інфікування клітин (48 год). Як показано на рис. 3.1, чітка та помітна ЦПД спостерігалася на клітинах - контроль вірусу грипу, у той час як незначна ЦПД спостерігалася на клітинах, які були інфіковані вірусом грипу з попередньою олігорибонуклеотидною інкубацією (грип+ОРН та грип+ОРН-D-M) (198, 199).

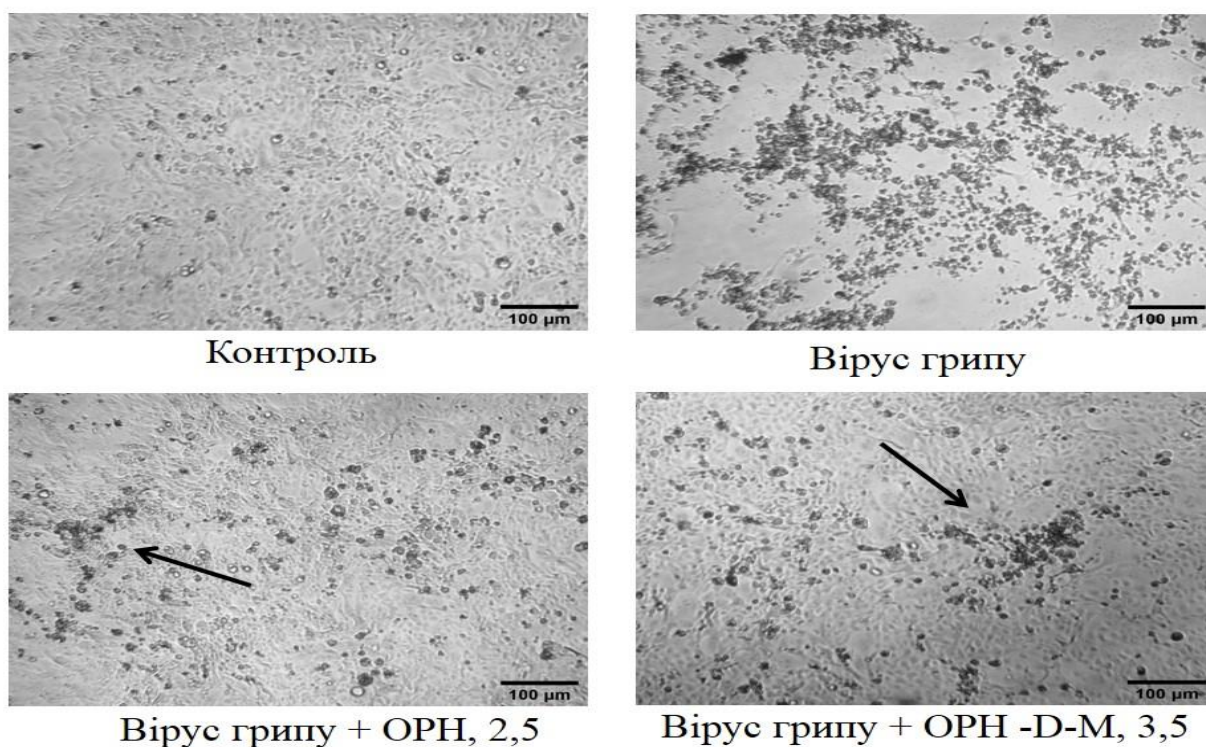
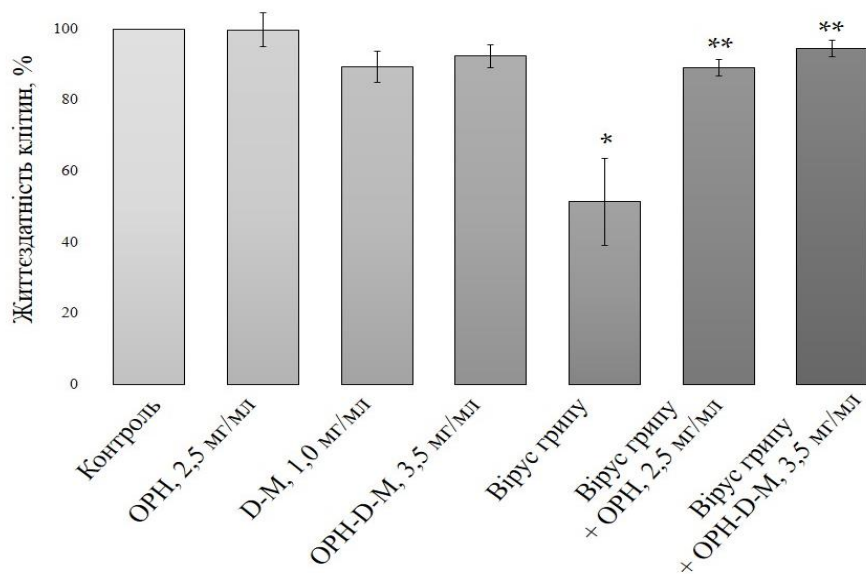
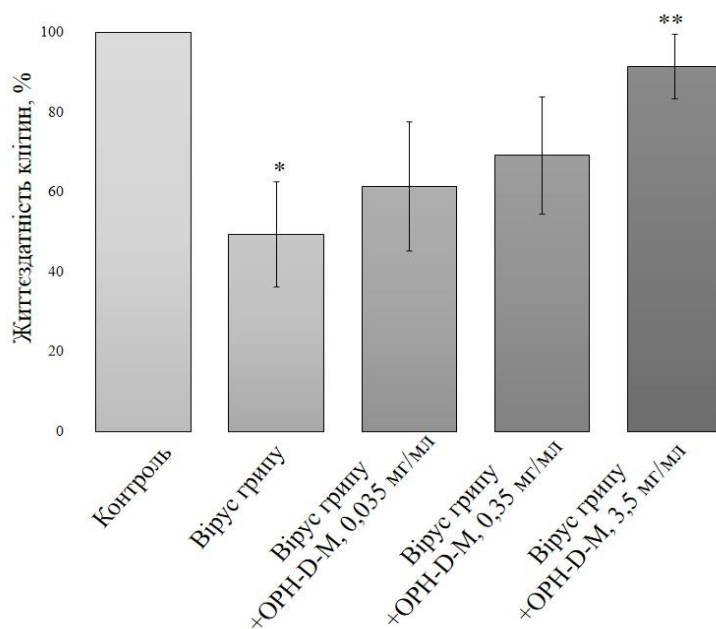


Рис. 3.1. Аналіз ЦПД у культурі клітин MDCK, яка індукована вірусом грипу A/FM/1/47/H1N1, який попередньо інкубували з ОРН та ОРН-D-M, мг/мл. Індуковану вірусом грипу ЦПД аналізували під світловим мікроскопом. Стрілками відмічено незначні ЦПД



a



б

Рис. 3.2. Життєздатність клітин лінії MDCK через 48 год після інфікування вірусом грипу A/FM/1/47/H1N1, який попередньо інкубували з ОРН, ОРН-D-М (а) та ОРН-D-М різної концентрації (б) Життєздатність клітин визначали в МТТ-тесті. * — відмінності статистично значущі щодо значень контролю клітин (Контроль), $p < 0,05$; ** — відмінності статистично значущі щодо значень контролю вірусу грипу (Вірус грипу), $p < 0,05$. Дані представлені як середнє значення для п'ятих незалежних експериментів

Окрім того нами показано, що життєздатність інфікованих клітин суттєво знижується ($p < 0,05$) порівняно з контрольними клітинами. Проте, життєздатність інфікованих клітин з вірусом грипу з преінкубацією з 2,5 мг/мл ОРН і 3,5 мг/мл ОРН-D-M, залишалася високою ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем інфікованих клітин. Не було також виявлено зниження життєздатності клітин під впливом ОРН та ОРН-D-M (рис. 3.2.a). Крім того, підвищення життєздатності інфікованих клітин спостерігалось у залежності від концентрації ОРН-D-M, якою інкубували вірус грипу перед зараженням клітин (рис.3.2.б) (198, 199).

Наведені результати досліджу вказують на пряму інактивуючу дію олігорибонуклеотидів та їхніх комплексів з D-манітолом по відношенню до вірусу грипу, яка може реалізуватися згідно робочої гіпотези через блокування зв'язування та проникнення вірусу грипу у клітину хазяїна.

3.1.2. Вплив ОРН та ОРН-D-M на інфекційність вірусу грипу A/FM/1/47/H1N1 та його взаємодію з гліканами. Попередніми дослідженнями було показано вплив досліджуваних препаратів на інфікування вірусом грипу клітин хазяїна. Припускалось, що пряма інактивуюча дія ОРН та їхніх комплексів з D-M призводить до зниження інфекційності вірусу грипу. Тому на наступному етапі роботи ми дослідили вплив препаратів олігорибонуклеотидів на інфекційність вірусу грипу за допомогою аналізу ТЦД₅₀. Встановлено достовірне зниження ($p < 0,05$) інфекційного титру вірусу грипу у $2 \lg$ ТЦД₅₀, який попередньо інкубувався з комплексами ОРН-D-M, порівняно з контролем вірусу грипу (рис. 3.3). При цьому не встановлено статистично значущого зниження інфекційного титру вірусу грипу, який попередньо інкубували з вихідними ОРН, D-M та нижчими концентраціями ОРН-D-M порівняно до контролю вірусу. Отримані результати вказують на інгібування інфекційності вірусу грипу препаратом ОРН-D-M ймовірно шляхом блокування НА-гліканової взаємодії.

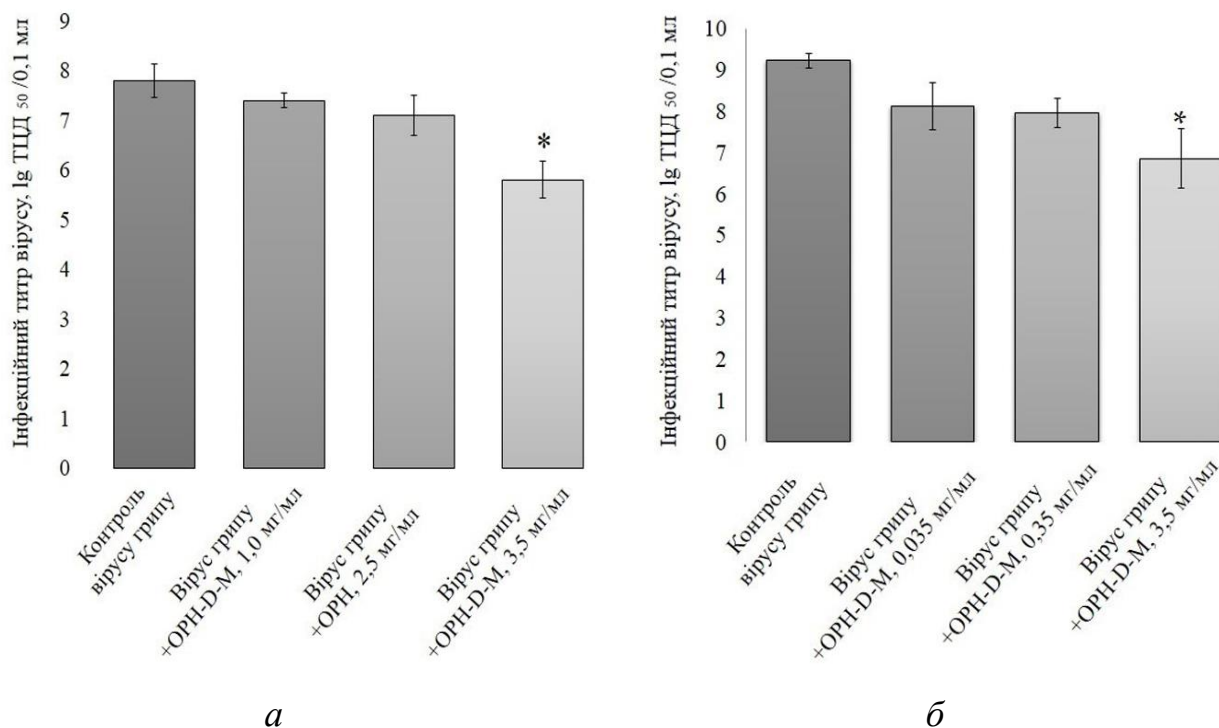


Рис. 3.3. Інфекційний титр вірусу грипу A/FM/1/47 H1N1 під дією ОРН, ОРН-D-M (а) та ОРН-D-M різної концентрації (б). Інфекційний титр вірусу грипу визначали методом Ріда – Менча (TCID₅₀). Дані наведені як середнє ±SD для восьми незалежних експериментів.* — відмінності статистично значущі щодо значень контролю вірусу грипу, $p < 0,05$. Дані представлені як середнє значення для п'ятьох незалежних експериментів

РГА широко використовується для опосередкованого кількісного визначення титру вірусу грипу, базуючись на специфічній взаємодії НА вірусу грипу гліканами (залишками сілової кислоти Neu5Ac α 2-3Gal linked (α 2-3) та Neu5Ac α 2-6Gal linked (α 2-6)), які розміщені на поверхні клітини (200). Для перевірки гіпотези, що олігорибонуклеотиди блокують утворення взаємодії між НА та гліканом, було проведено дослідження впливу препаратів олігорибонуклеотидів на утворення НА-гліканової взаємодії за допомогою РГА.

РГА показала (рис. 3.4), що аглютинація еритроцитів не спостерігалася у випадку контролів препаратів. Неаглютиновані еритроцити осідали на дно лунки у вигляді червоної крапки, що вказувало на відсутність впливу ОРН,

D-M, ОРН-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). Показано, що аглютинація еритроцитів вірусом грипу, попередньо проінкубованого з ОРН та ОРН-D-M протягом 30 хв при 20 °С (грип+ОРН та грип+ОРН-D-M), була зниженою у 2 та 4 рази відповідно порівняно до контролю вірусу грипу. В той час як, аглютинація еритроцитів вірусом грипу, який попередньо інкубували з D-M, та нижчими концентраціями ОРН-D-M залишилася незмінною відносно контролю вірусу грипу (198, 199).

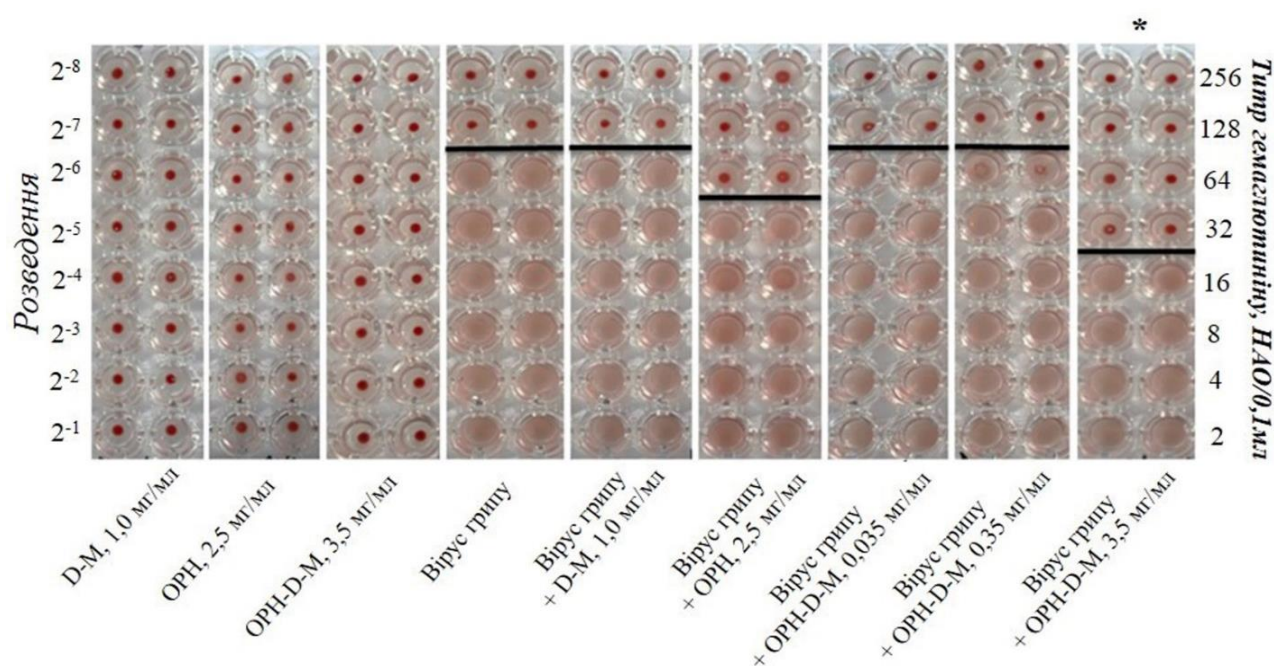


Рис. 3.4. Аглютинація еритроцитів, яка обумовлена НА вірусу грипу A/FM/1/47/H1N1. Вигляд реакційних сумішей РГА у круглодонному мікролунковому планшеті після додавання ОРН, D-M, ОРН-D-M, вірусу грипу та вірусу грипу, який попередньо інкубували з ОРН, D-M, ОРН-D-M. * — відмінності статистично значущі щодо значень позитивного контролю (грипу), $p < 0,05$. Дані представлені як середнє значення для п'ятих незалежних експериментів.

Таким чином, показано, що ОРН-D-M інгібують зв'язування протеїнів НА вірусу грипу до сіалових кислот рецепторів еритроцитів, що виражається у достовірному зниженні титру НА вірусу грипу ($p < 0.05$) (рис. 3.4). Результати дослідження вказують, що олігорибонуклеотиди можуть розпізнавати та взаємодіяти з НА вірусу грипу призводячи до інгібування НА-гліканової взаємодії під час інфікування клітин хазяїна. Перешкоджаючи утворенню НА-гліканової взаємодії, ймовірно природні олігорибонуклеотиди інгібують інфекційність вірусу грипу забезпечуючи високу життєздатність клітин після інфікування.

3.1.3. Аналіз взаємодії ОРН та ОРН-D-M з НА. Для того щоб підтвердити припущення, що природні ОРН володіють прямою інактивуючою дією проти вірусу грипу шляхом взаємодії з поверхневим антигеном, взаємодія ОРН з НА потребує подальших досліджень.

Тому для того, щоб дослідити взаємодію ОРН та ОРН-D-M з НА вірусу грипу використовували 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. 3.5). 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. Надалі ми дослідили вплив ОРН-D-M на НА активність у серії концентрацій і було показано, 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.

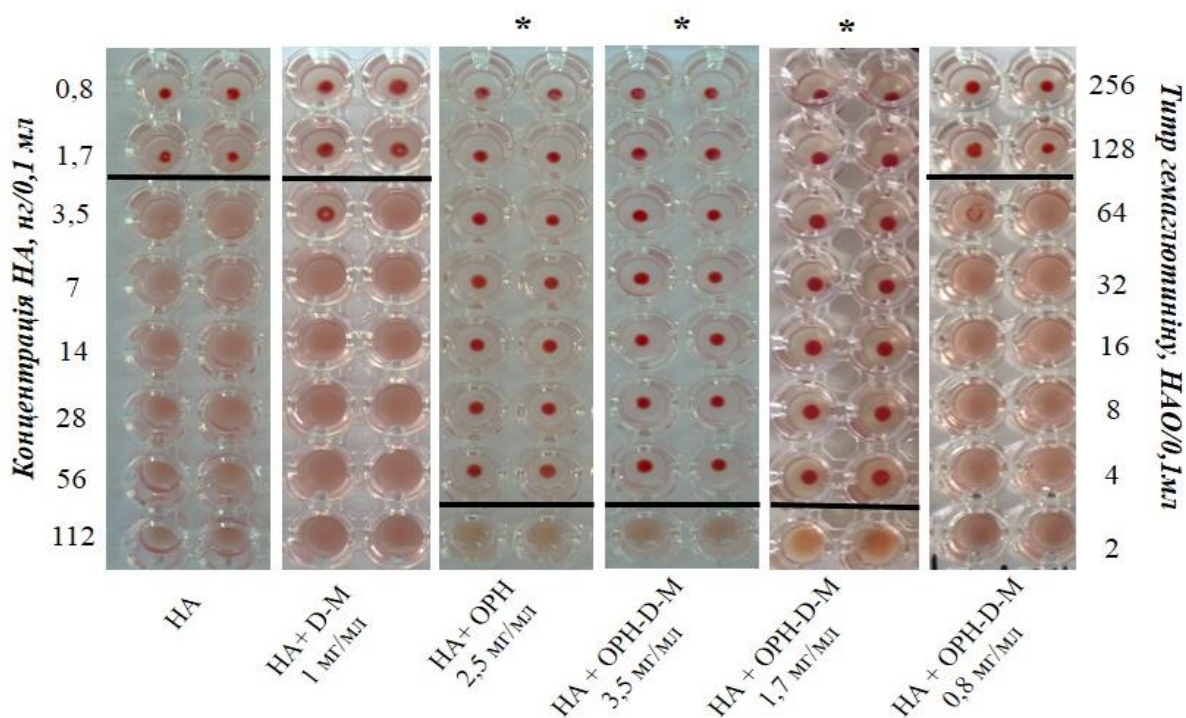


Рис. 3.5. Аглотинація еритроцитів, яка обумовлена протеїном НА (Ваксигрип). Вигляд реакційних сумішей РГА у круглодоному мікролунковому планшеті після додавання НА, який попередньо інкубували з ОРН та ОРН-D-M у концентрації 0,8-3,5 мг/мл. * — відмінності статистично значущі щодо значень контролю НА, $p < 0,05$. Дані представлені як середнє значення для п'ятьох незалежних експериментів

Наступним етапом роботи було охарактеризувати тривалість впливу та ОРН-D-M на активність НА. РГА проводили після попередньої інкубації НА з ОРН-D-M протягом 30 хв, 1, 2, 4 та 24 год (рис. 3.6). Інгібування активності НА, який інкубували від 30 хв до 24 год з комплексами ОРН-D-M свідчить про тривалу білок-ліганд взаємодію, що дозволяє припустити, про здатність ОРН-D-M змінювати конформацію НА.

Отримані результати узгоджуються із попередніми дослідженнями вказуючи, що ОРН можуть взаємодіяти з НА вірусу грипу, ймовірно з амінокислотами НА, у або навколо рецептор зв'язуючого місця, який необхідний для проникнення вірусу грипу в клітину-хазяїна. Однак різниці

впливу на активність НА між ОРН та ОРН-D-M не було виявлено, що ймовірно пов'язано з низькою чутливістю даного методу по відношенню до білок-лігандної взаємодії.

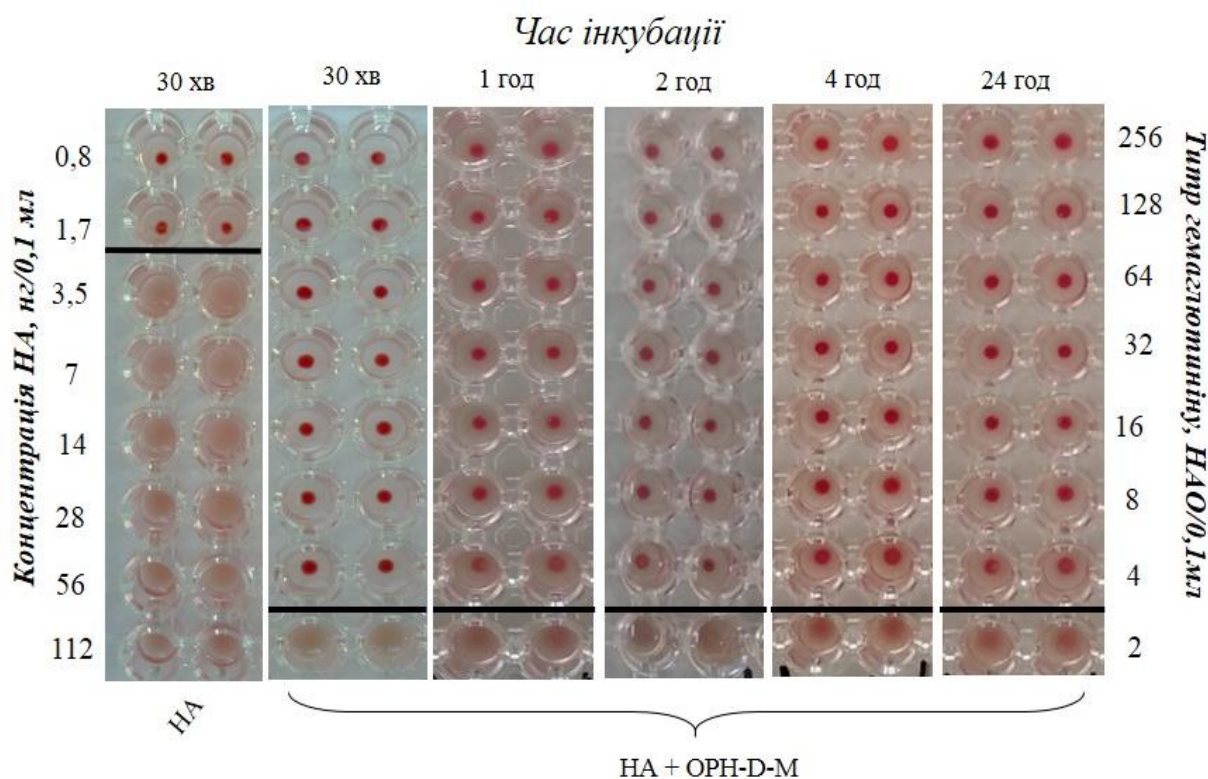


Рис. 3.6. Аглотинація еритроцитів, яка обумовлена протеїном НА (Ваксигрип). Вигляд реакційних сумішей РГА у круглодонному мікролунковому планшеті після додавання НА, який попередньо інкубували з ОРН-D-M у концентрації 3,5 мг/мл при різній тривалості досліду в годинах. Дані представлені як середнє значення для п'ятих незалежних експериментів

Тому на наступному етапі роботи, було використано метод флуоресцентної спектроскопії для вимірювання впливу ОРН та ОРН-D-M на інтенсивність флуоресценції НА. Повні спектри флуоресценції НА, ОРН та ОРН-D-M показали, що білок та ліганди не перекриваються «ландшафтними» спектрами вказуючи, що під час дослідження білок-лігандної взаємодії не відбуватиметься ефекту перепоглинання електронів (рис.3.7).

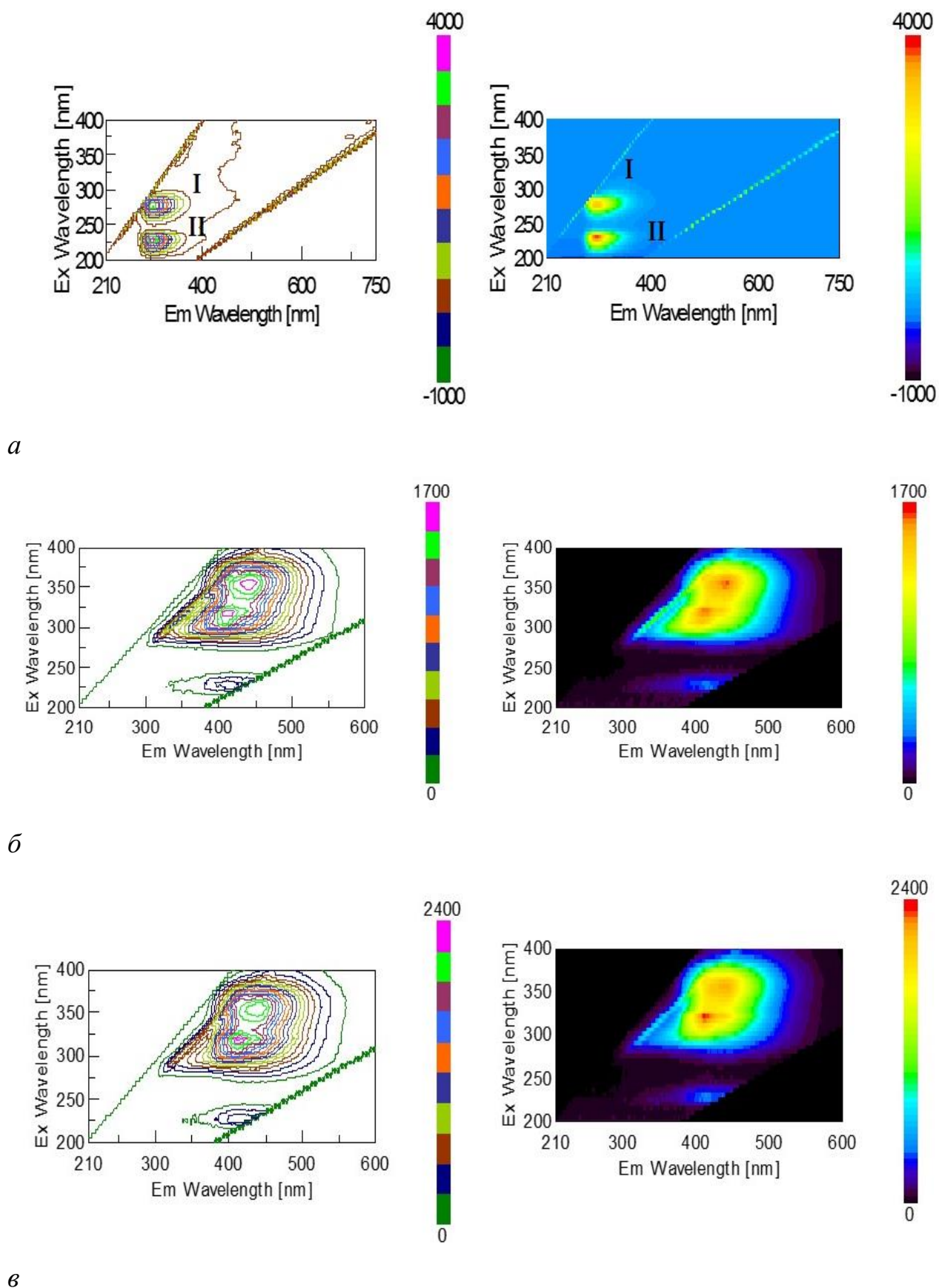


Рис. 3.7. Повні спектри флуоресценції НА ($0,15 \mu\text{M}$) (*a*), ОРН ($52,1 \mu\text{M}$) (*б*) та ОРН-D-M ($52,1 \mu\text{M}$) (*в*) у тривимірній (3D) системі координат

Вперше показано, що 3D-спектр флуоресценції НА, має два піки. Перший пік (I) флуоресценції з максимум збудження λ_{275} нм відповідає білковій основі, тоді як другий пік (II) з максимум збудження λ_{225} – ароматичним залишкам, які досягли вище збуджених електронних станів (рис.3.7. *a*). Інтенсивність і розташування I піку залежить від мікросередовища залишків тирозину та триптофану, і будь-які зміни у цьому мікросередовищі може індукувати певні конформаційні зміни у білку (201, 202).

Гасіння інтенсивності флуоресценції НА спостерігалось після титрування НА з ОРН та ОРН-D-M (рис. 3.8), однак у випадку ОРН-D-M гасіння флуоресценції було суттєвішим. Цей ефект вказує на взаємодію між НА і ОРН-D-M.

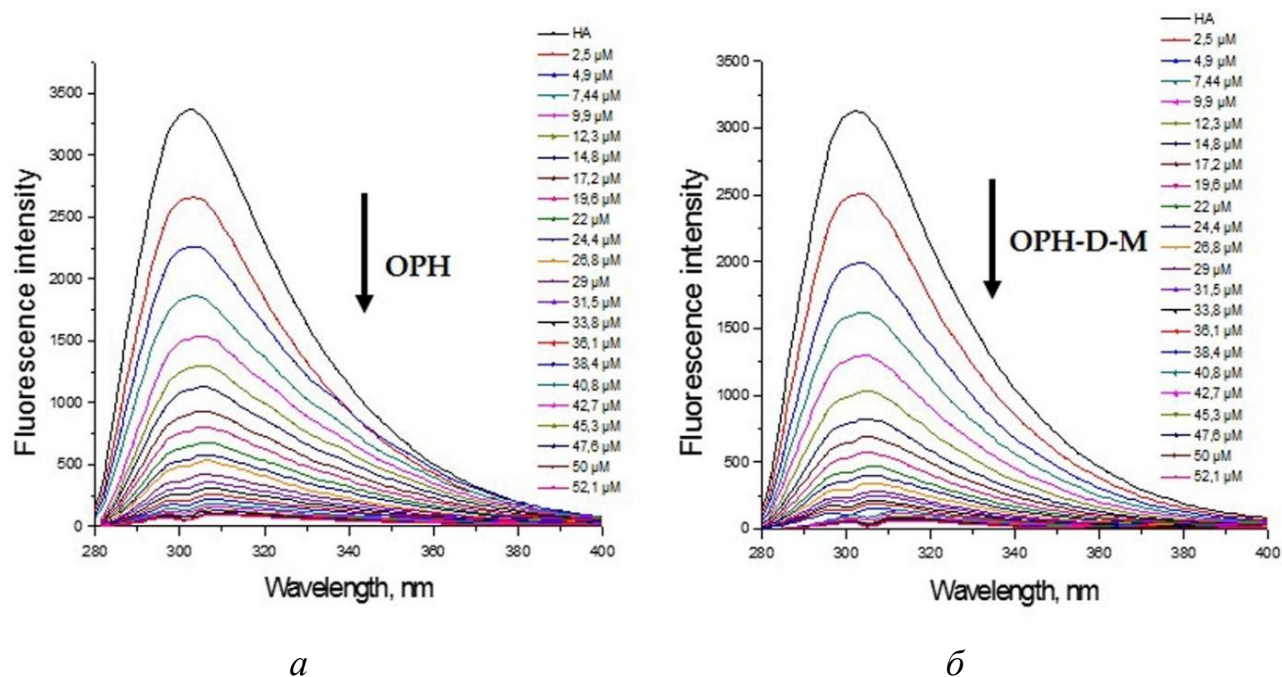


Рис. 3.8. Спектри флуоресценції НА у присутності ОРН (*a*) та ОРН-D-M(*б*)

3D-спектри флуоресценції НА-ОРН та НА-ОРН-D-M показали, гасіння флуоресценції обох піків НА, які при цьому не змінюють свого розташування у тривимірній системі координат (201). Проте після титрування НА з ОРН формується новий флуоресцентний компонент біля I піку НА (на рисунку 3.9. *б*, *в* вказаний пік III), який дозволяє припустити про зміни у конформації НА після взаємодії з препаратами ОРН та ОРН-D-M.

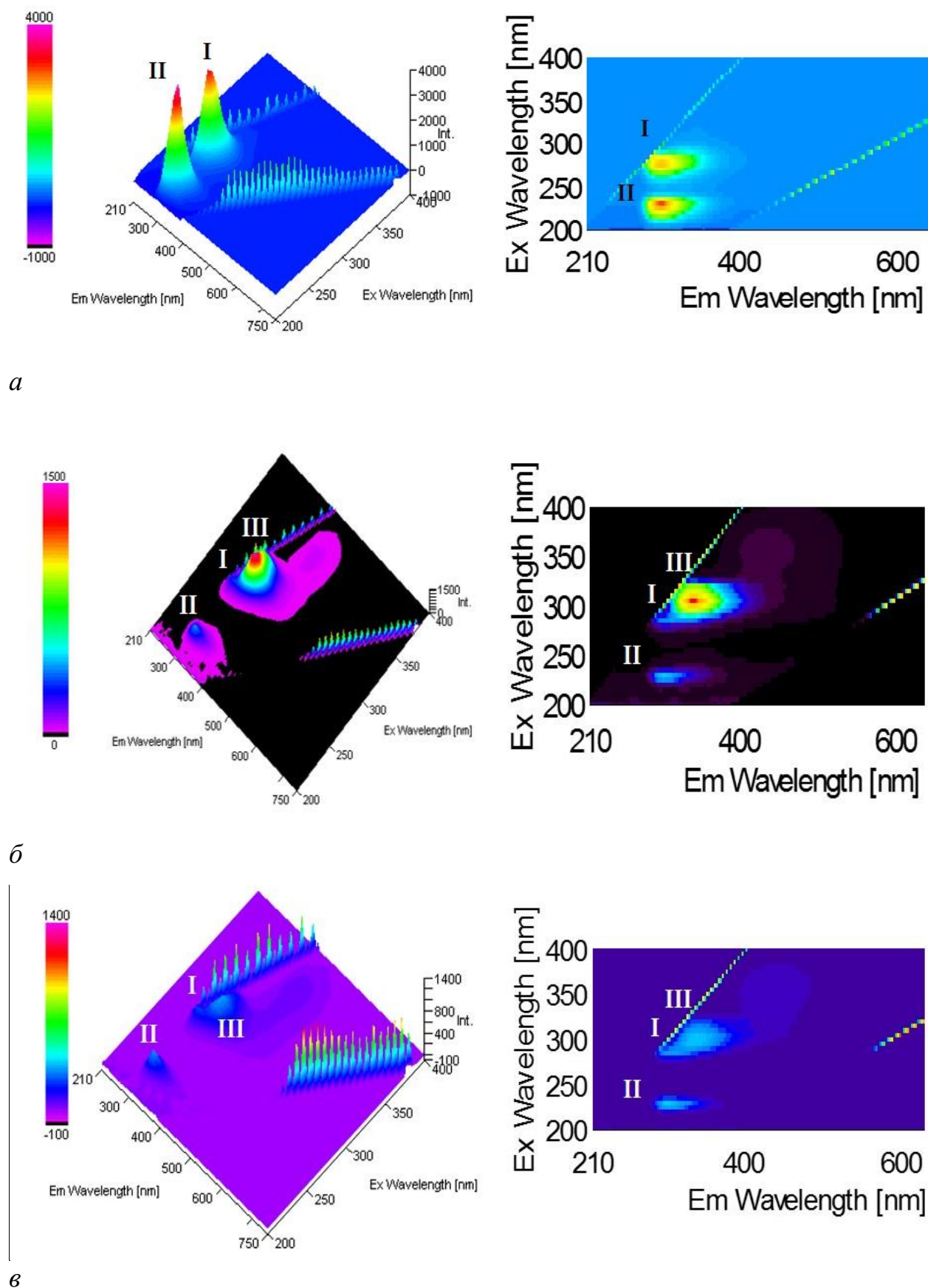


Рис. 3.9. Тотальні спектри флуоресценції НА (*a*) за дії ОРН (*б*) та ОРН-D-M (*в*) у тривимірній (3D) системі координат

Для подальшої перевірки припущення про взаємодію між НА та препаратами ОРН дані флуоресценції використали для розрахунку константи дисоціації. Константи дисоціації НА-ОРН та НА-ОРН-D-M виявилися відносно низькими у мікромолярних концентраціях (рис. 3.10). Таким чином, можна припустити, що взаємодія НА з ОРН та ОРН-D-M відбувається з доволі низькою афінністю.

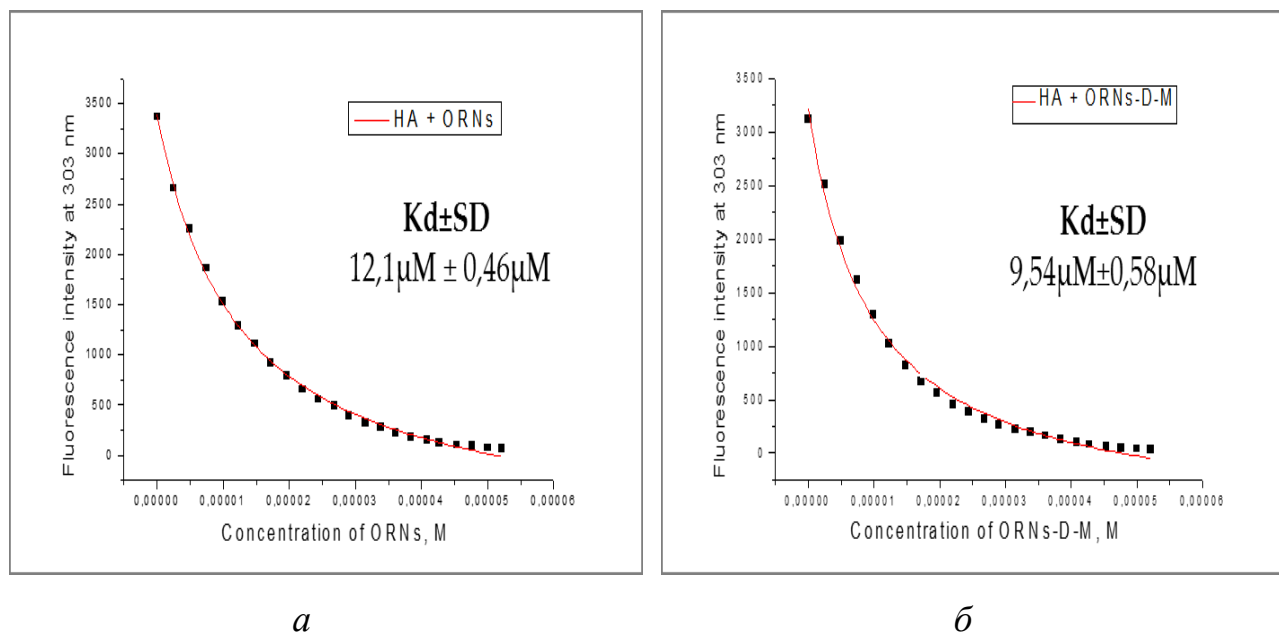


Рис. 3.10. Криві залежності інтенсивності флуоресценції НА від концентрації ОРН (а) та ОРН-D-M (б)

У дисертаційній роботі вперше показано низькоафінну взаємодію ОРН та їх комплексів ОРН-D-M з НА вірусу грипу. ОРН та ОРН-D-M взаємодіючи з НА перешкоджають проникненню вірусу у клітину хазяїна знижуючи таким чином інфекційність вірусу грипу. Також вперше показано, що ОРН-D-M суттєвіше взаємодіють з НА та проявлять суттєвішу пряму інактивуючу дію на вірус грипу.

3.1.4. Протівірусна дія комплексів ОРН-D-M проти вірусів грипу A/CA/7/09/H1N1 та A/MP/10218/84/H5N2. Здатність вірусу грипу постійно змінювати НА є вагомим фактором у безперервній еволюції нових штамів вірусу грипу та причиною чергових епідемій грипу (14). Тому доречним було

дослідити вплив комплексу ОРН-D-M на інші, більш небезпечніші за своїми наслідками штами вірусу грипу (3, 203, 204). Для того щоб перевірити протигрипозну ефективність ОРН-D-M проти різних штамів грипу, нами було обрано пандемічний вірус А грипу A/California/07/2009(H1N1)pdm09 та пташиний вірус А грипу A/mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2).

На клітинній лінії MDCK виявлено, що комплекси ОРН-D-M пригнічують інфекційність пандемічного та пташиного вірусу грипу (рис.3.11). Ефективна концентрація препарату відносно пандемічного вірусу становила 0,5 мг/мл при індексі селективності >10, а найбільша переносима концентрація становила 5,0 мг/мл. Комплекси ОРН-D-M у концентрації 5,0 мг/мл інгібували титр пандемічного вірусу грипу на 3 lg ТЦД₅₀ у порівнянні з контролем. Результати цього дослідження також показали, що ОРН-D-M в концентрації 5,0 мг/мл мають противірусну активність проти пташиного вірусу грипу, при індексі селективності > 3 (163).

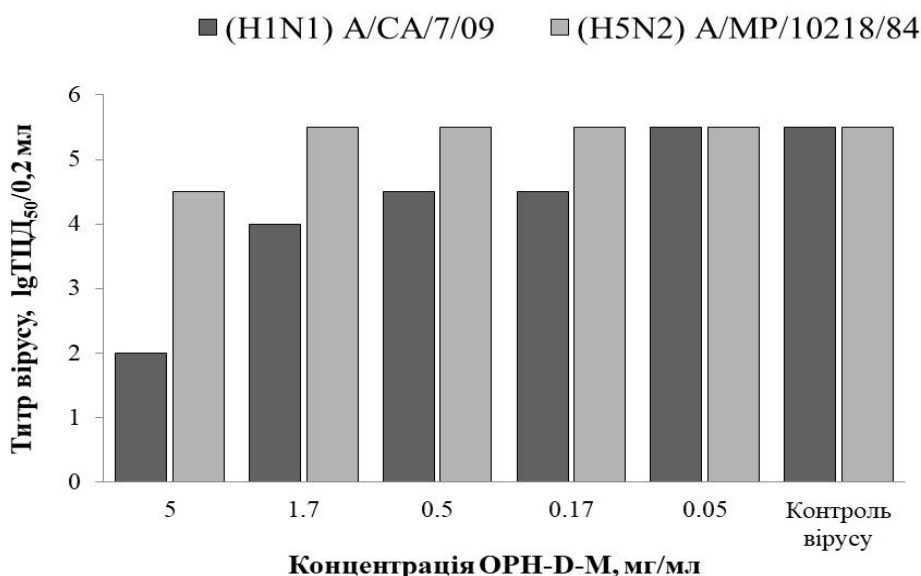


Рис 3.11. Інфекційний титр вірусів грипу A/CA/7/09/H1N1 та A/MP/10218/84/H5N2 за дії різних концентрацій ОРН-D-M Інфекційний титр вірусу грипу визначали методом Ріда – Менча (TCID₅₀)

Таким чином показано, що інфекційність пандемічного вірусу грипу знижується під дією комплексу ОРН-D-M у концентрації 0,17-5,0 мг/мл у порівнянні з контролем вірусу, тоді як інфекційність пташиного вірусу грипу знижувалась лише при 5,0 мг/мл препарату (рис. 3.11). Різниця ефективної дози ОРН-D-M при різних штаммах грипу дозволяє припустити, що ОРН взаємодіють з НА різних штамів з різною афінністю, що ймовірно пов'язано з амінокислотним складом рецептор зв'язуючого регіону НА.

Отже, протигрипозна дія ОРН-D-M проти різних штамів грипу дозволяє припустити, що олігорибонуклеотиди неспецифічно взаємодіють з амінокислотами НА вірусу грипу. Така взаємодія олігорибонуклеотидів з поверхневим антигеном вірусу грипу – НА може бути одним з механізмів протигрипозної дії ОРН-D-M.

Однак нещодавні клінічні дослідження препарату ОРН-D-M, які проводилися на кафедрі інфекційних хвороб з епідеміологією, шкірними та венеричними хворобами Тернопільського державного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, показали ерадикацію пандемічного вірусу грипу, парагрипу, респіраторно-синцитіального вірусу, аденовірусу та покращення клінічних результатів у пацієнтів з ГРВІ вірусної етіології після комплексного лікування з ОРН-D-M [163]. Співробітниками кафедри загальної хірургії з доглядом за хворими Луганського державного медичного університету МОЗ України встановлено, що застосування ОРН-D-M регулює цитокіновий профіль (TNF α , IL-1 β , L-2, IL-4) у хворих на діабет розкриваючи особливості механізму протизапальної дії препарату і його вплив на загальну систему вродженого захисту (170, 171). Результати цих досліджень та досліджень протизапальної дії (164, 169) дозволяють припустити, що олігорибонуклеотиди можуть також впливати на систему вродженого імунітету. Тому ми припустили про можливий вплив ОРН та їхніх комплексів ОРН-D-M на вроджений імунітет, як ще один механізм дії даних препаратів.

Результати досліджень, представлені у цьому підрозділі, опубліковані у наступних роботах:

1. **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.
2. **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.
3. **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.
4. **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.
5. **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.
6. **Мельнічук Н.**, Ткачук З. Інгібування гемаглютенін-гліканової взаємодії комплексами олігорибонуклеотидів з D-манітолом // Допов. Нац. Акад. Наук Укр. – 2018. – № 1. – С. 92-99.

7. **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.

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

Відомо, що вірус грипу проявляє високу тропність до епітелію легенів і дихальних шляхів мишей BALB/c (205). Інфікування останніх спричиняє активацію їх вродженої імунної відповіді, призводячи до запалення та оксидативно-нітрозативно-опосередкованих пошкоджень.

Попередні дані дослідження в Інституті епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського АМН України, виявили високу протигрипозну активність препарату ОРН-D-M проти вірусу грипу A/FM/1/47/H1N1, при профілактиці та лікуванні грипу у дослідах на мишах при внутрішньочеревному та внутрішньовенному введенні у дозах від 15 до 150 мг/кг. В той же час при інтраназальному введенні ОРН-D-M його ефективна доза була в десять разів вища (181). Раніше колегами було показано, що ОРН-D-M можуть нормалізувати цитокіновий профіль, який відіграє ключову роль при вродженій імунній відповіді, у хворих на діабет (170, 171), ВІЛ-інфікованих осіб із токсоплазмозом (182), пацієнтів з хронічним гепатитом С (177) та тварин з гострим ураженням печінки (175). Припускали, що дослідження змін експресії генів вродженого імунітету за дії ОРН та інфекції вірусу грипу дозволять виявити гени-мішені ОРН, впливаючи на яких ОРН можуть проявляють свою противірусну та протизапальну дію. Тому, для того щоб, дослідити вплив препаратів олігорибонуклеотидів на експресію генів вродженого імунітету за умов інфекції грипу, мишам вводили внутрішньочеревно препарати у концентрації 15 мг/кг при профілактичній та лікувальній схемах застосування. За контроль служили інфіковані вірусом грипу миші, яким не вводили препарати. За допомогою ПЛР-РЧ визначали експресію генів у тканинах легенів мишей через 48 годин після інфікування вірусом грипу. Оскільки саме у такі терміни після інфікування проявляється максимальний рівень реплікації вірусу грипу A/FM/1/47/H1N1.

3.2.1. Вивчення реплікації вірусу грипу A/FM/1/47/H1N1 у тканинах легенів мишей за дії препаратів ОРН та ОРН-D-M. Використовуючи аналіз ТЦД₅₀ ми провели визначення вірусного навантаження у зразках тканин легенів мишей за дії ОРН та ОРН-D-M при профілактиці та лікувальні інфекції вірусу грипу. Було виявлено нижчий інфекційний титр вірусу грипу у тварин, яким вводили ОРН та ОРН-D-M при профілактичній і лікувальній схемах застосування, однак суттєвіше зниження інфекційного титру спостерігалось при профілактичній схемі введення ОРН та ОРН-D-M (Таблиця 3.1).

Таблиця 3.1.

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, lgТЦД₅₀
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

Першими очевидними симптомами захворювання грипу у тварин є пілоерекція, зменшення споживання їжі, втрата ваги та млявість (206). Додатково було виявлено, що при профілактичній та лікувальній схемах застосування ОРН та ОРН-D-M через 48 год після інфікування вірусом грипу у

мишей симптоми захворювання були менш вираженими у корівняні з контрольною групою інфікованих мишей.

Отримані дані узгоджуються з результатами проведеними у Інституті епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського АМН України (181) демонструючи зниження реплікації вірусу грипу при профілактиці та лікуванні ОРН та ОРН-D-M та є передумовою для наступного дослідження впливу препаратів РНК на експресію генів вродженого імунітету за умови грипу.

3.2.2. Вплив препаратів ОРН та ОРН-D-M на експресію ISG, яка індукована вірусом грипу A/FM/1/47/H1N1. 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) (93). Ми припустили, що препарати олігорибонуклеотидів можуть активувати систему OAS/RNase L, або інші інтерферон стимульовані протеїни шляхом індукції експресії ISG і таким чином мають ефективну противірусну активність проти широкого спектру вірусів.

Тому серед генів вродженого імунітету першими було досліджено зміни рівнів мРНК генів *Eif2ak2*, *Mx1*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oas3* та *Rnasel* за допомогою ПЛР-РЧ. Після 48-годинної інфекції грипу було виявлено підвищення рівня мРНК *Eif2ak2*, *Mx1*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oas3* у 14, 155, 76, 114, 178 разів відповідно порівняно з контролем ($p < 0.05$), у той час як рівень мРНК гена *Rnasel* залишався незмінним (рис. 3.12). За умов лікування інфікованих мишей препаратами ОРН, рівень мРНК генів *Eif2ak2*, *Mx1*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oas3* знижувався у 43 %; 3 рази; 44 %; 14,6; 7,8 разів відповідно, у той час коли препаратами ОРН-D-M на 2,7; 3,4; 5,5; 23; 17 разів відповідно порівняно з контрольною групою інфікованих мишей. Введення препаратів ОРН для профілактики грипу у мишей рівень мРНК *Eif2ak2*, *Mx1*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oas3* 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. Однак рівень мРНК цих генів не зазнавав суттєвих змін у тканинах легенів неінфікованих мишей, яким вводили препарати олігорибонуклеотидів (ОРН та ОРН-D-M) (207, 208).

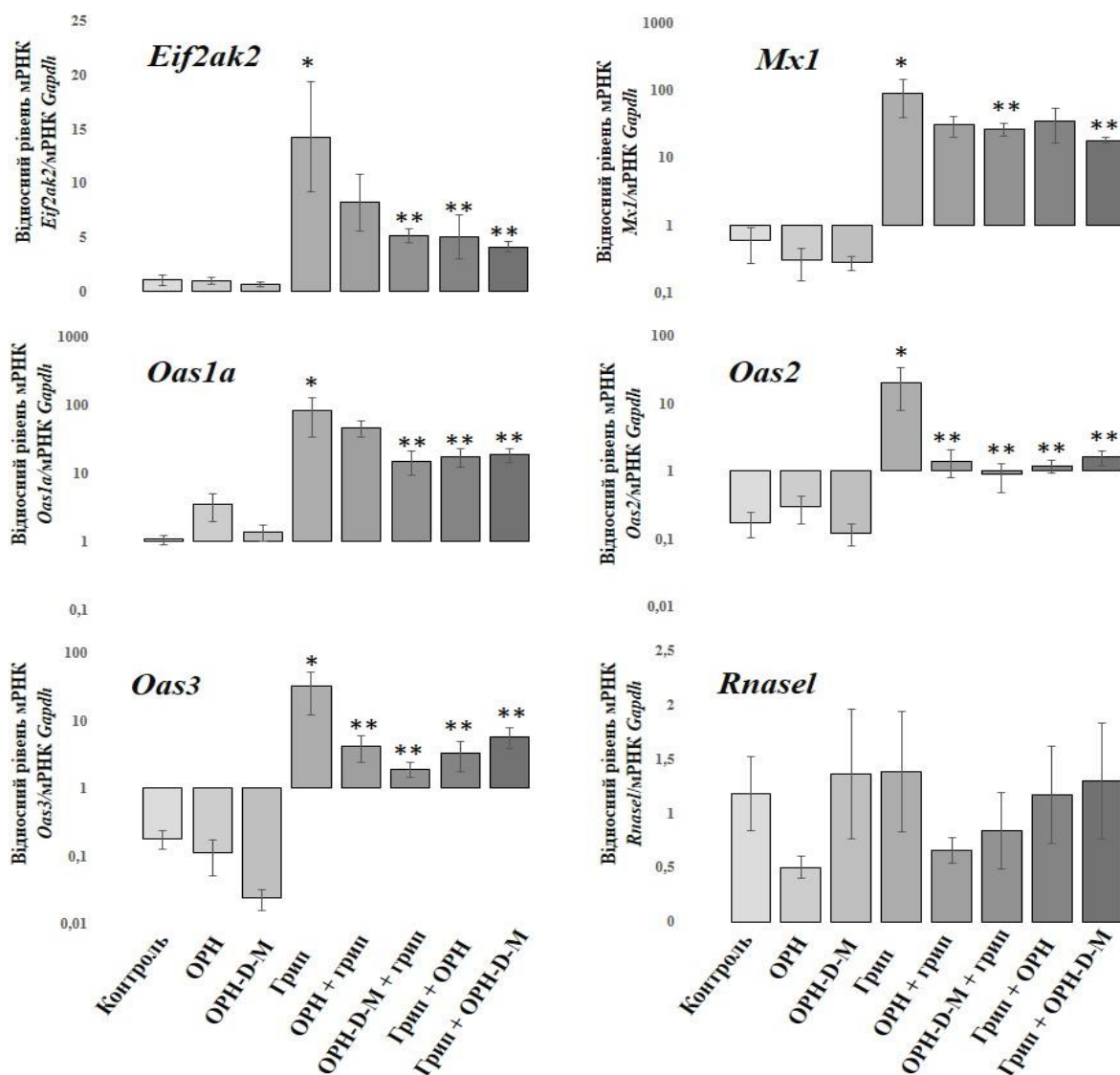


Рис. 3.12. Рівень мРНК генів системи ISG у тканинах легенів мишей BALB/c через 48 год після інфікування вірусом грипу A/FM/1/47/H1N1 та профілактичного (24 год до інфікування) або лікувального (24 год після інфікування) впливу ОРН або ОРН-D-M. Дані представлені як середнє значення \pm SD для трьох незалежних експериментів. * — відмінності статистично значущі щодо значень групи здорових тварин (Контроль), $p < 0,05$; ** — відмінності статистично значущі щодо значень контролю вірусу грипу (Грип), $p < 0,05$

Експресія гена *Rnasel* на рівні транскрипції в усіх дослідних групах залишалася статистично не зміною. Аналіз даних вказує на те що вірус грипу A/FM/1/47/H1N1 не індукує підвищення рівня мРНК гена *Rnasel*, а препарати ОРН та ОРН-D-M не впливають на мРНК гена *Rnasel* за номальних умов.

Отримані результати не підтвердили наші припущення щодо індукції експресії ISG препаратами ОРН та ОРН-D-M. Хоча аналіз цих даних дозволив нам припустити, що препарати олігорибонуклеотидів ймовірно знижують грип-індуковану надекспресію ISG шляхом впливу на IFN типу I.

3.2.3. Вивчення експресії прооксидантних генів під впливом ОРН та ОРН-D-M в умовах грипу. Патогенна роль АФК та АФН під час інфекції вірусу грипу реалізується через підвищення експресії прооксидантних генів *Nos2*, *Xdh* та ферментативної активності NOS, XO (61, 126, 127). Раніше було показано, що природні олігорибонуклеотиди (тотальна дріжджова РНК) володіють протизапальною дією та стабілізують активність NOS *in vivo* та *in vitro* при запальних процесах неінфекційної природи (164, 169, 175, 209).

Результати наших досліджень показали, що профілактичне введення ОРН та ОРН-D-M знижує рівні мРНК генів *Nos2* (у 3,6 та 3 рази відповідно) та *Xdh* (у 3,6 та 2,3 рази відповідно), надекспресія яких індукована вірусом грипу ($p < 0,05$) (рис. 3.13). Така сама ситуація спостерігалася за умов лікування препаратами ОРН та ОРН-D-M грип-інфікованих тварин. Зокрема, рівні мРНК генів *Nos2* та *Xdh* у інфікованих тварин знижувалися через 24 год після введення ОРН (у 2,4 та 2,6 разів відповідно) та ОРН-D-M (у 44 % та 2 рази відповідно) у порівнянні з групою контроль грипу. Проте незміні рівні мРНК генів *Nos2* та *Xdh* спостерігались у тварин, яким вводили ОРН та ОРН-D-M в якості контролю препаратів (207, 208).

Під час інфекції вірусу грипу А Н1N1 спостерігається надпродукція вільних радикалів у легенях, що викликає оксидативно-нітрозативний стрес, у результаті якого підвищується рівень продуктів ПОЛ у мембранах клітин (139). Внаслідок ПОЛ виникають продукти, які реагують з тіобарбітуратами

(ТБКАП), тому їх використовують як один із показників оксидативно-нітрозативного стресу (194).

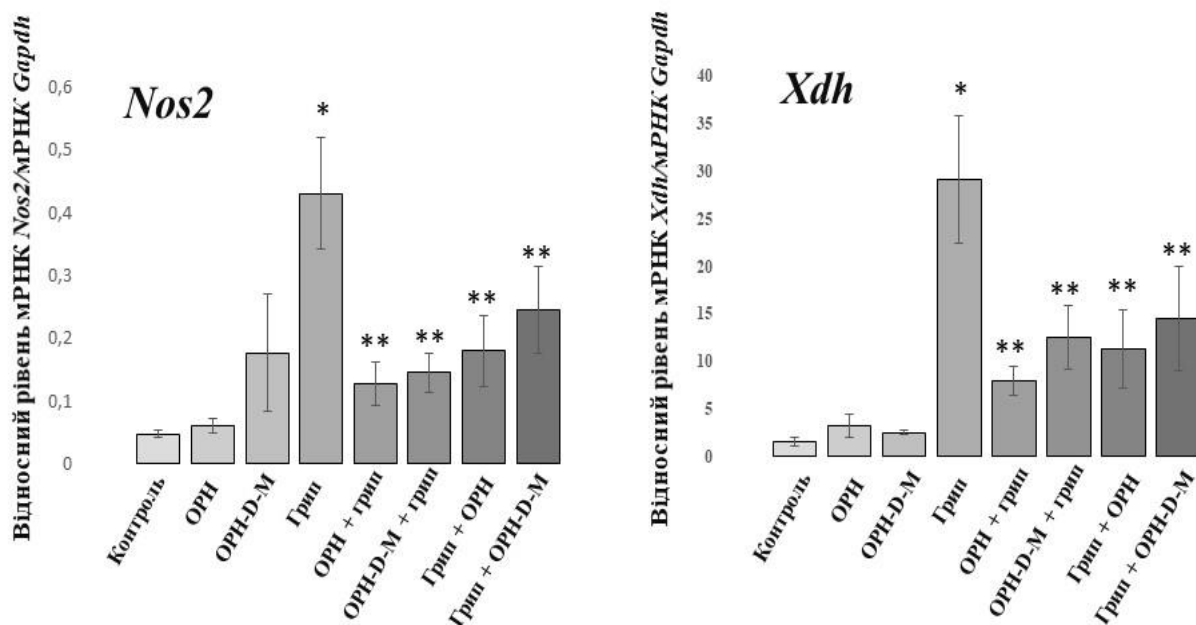


Рис. 3.13. Рівень мРНК генів *Nos2* та *Xdh* у легенях мишей BALB/c через 48 год після інфікування вірусом грипу A/FM/1/47/H1N1 та профілактичного (24 год до інфікування) або лікувального (24 год після інфікування) впливу ОРН або ОРН-D-M. Дані представлені як середнє значення \pm SD для трьох незалежних експериментів. * — відмінності статистично значущі щодо значень групи здорових тварин (Контроль), $p < 0,05$; ** — відмінності статистично значущі щодо значень контролю вірусу грипу (Грип), $p < 0,05$

У результаті було виявлено зниження вмісту ТБКАП у легенях інфікованих тварин, за профілактичного та лікувальних впливів препаратів ОРН та ОРН-D-M (грип+ОРН, грип+ОРН-D-M, ОРН+грип та ОРН-D-M+грип) у порівнянні з інфікованими тваринами без дії досліджуваних препаратів (рис. 3.14) (207, 208). Між рівнем продуктів ПОЛ та експресією білків NOS2, XO існує пряма залежність. Індукція надекспресії NOS2, XO індукує генерацію АФК та АФН, надпродукція яких збільшує утворення продуктів ПОЛ (61, 126, 127, 139). Незважаючи на те, що у даній серії дослідів ми не отримали

статистично достовірного зниження рівня ПОЛ, дані аналізу вмісту ТБКАП узгоджуються із результатами ПЛР-РЧ аналізу (Рис.3.13) і співпадають про зниження рівня ПОЛ за умов експерименту.

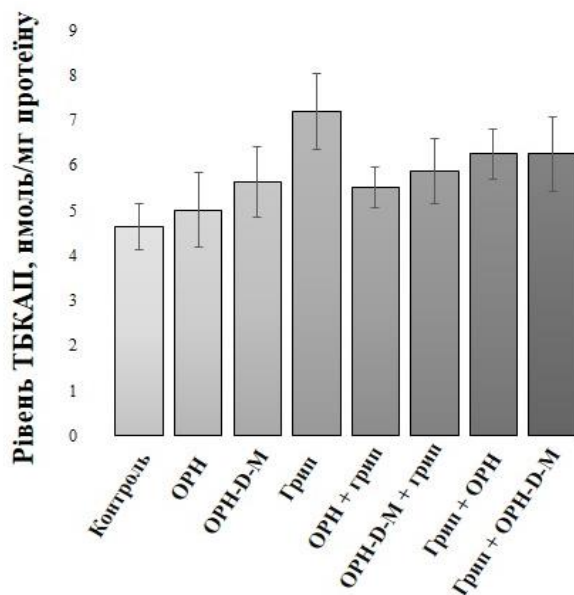


Рис. 3.14. Рівень ТБКАП у легенях мишей BALB/c через 48 год після інфікування вірусом грипу A/FM/1/47/H1N1 та профілактичного (24 год до інфікування) або лікувального (24 год після інфікування) впливу ОРН або ОРН-D-M. Дані представлені як середнє значення \pm SD для трьох незалежних експериментів

Експресія гену може змінюватися на рівні мРНК, проте не змінюватися на рівні білку (210, 211). Зниження вмісту продуктів ПОЛ у легенях грип-інфікованих мишей вказує на те, що препарати ОРН та їхні комплекси з ОРН-D-M знижують експресію генів *Nos2*, *Xdh* на рівні мРНК та їх протеїнів.

Активація гену *Arg* при респіраторних вірусних захворюваннях легень призводить до зниження експресії гена *Nos2*, пригнічуючи тим самим генерацію NO (134, 135). Припускалося, що ОРН та їхні комплекси з ОРН-D-M підвищують експресію гена *Arg2*, що призводить до зниження рівня мРНК *Nos2* за умов інфекції грипу. Проте профілактичне та лікувальне застосування ОРН та ОРН-D-M знижували індукцію мРНК *Arg2*, яка була викликана інфекцією вірусу грипу (рис. 3.15). Зокрема, рівень мРНК *Arg2* був нижчим у інфікованих

тварин після профілактики ОРН, ОРН-D-M на 34, 37 % відповідно та після лікування ОРН, ОРН-D-M у 2 рази; 28 % відповідно порівняно з контролем вірусу грипу. Було також виявлено, що при профілактичній схемі застосування ОРН-D-M зниження гіперекспресії мРНК *Arg2* відбувається суттєвіше (на 42 %) порівняно як при лікувальній схемі застосування ОРН-D-M ($p < 0,05$) (207, 208).

Досліджено, що препарати ОРН та ОРН-D-M нормалізують експресію генів *Nos2*, *Xdh* та *Arg2* під час інфекції грипу. Аналіз отриманих результатів вказує, на те, що ОРН та ОРН-D-M ймовірно опосередковано знижують експресію *Nos2*, *Xdh* та *Arg2* під час інфекції вірусу грипу, а саме впливаючи на імунні або про-запальні цитокіни, які регулюють експресію цих генів.

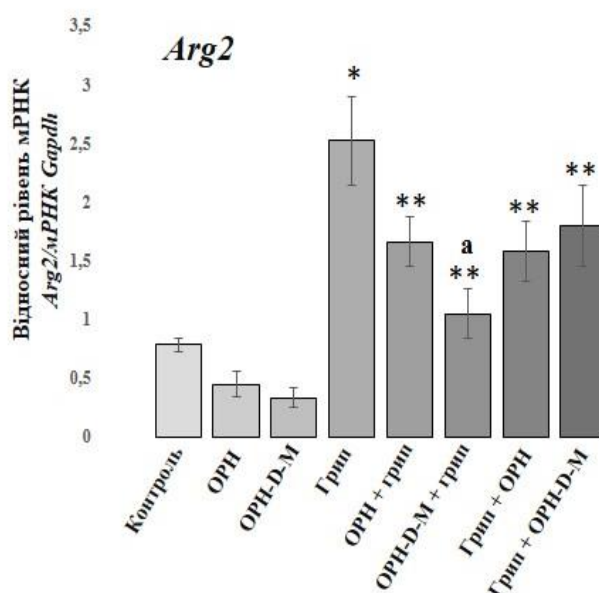


Рис. 3.15. Рівень мРНК *Arg2* у легенях мишей BALB/c через 48 год після інфікування вірусом грипу A/FM/1/47/H1N1 та профілактичного (24 год до інфікування) або лікувального (24 год після інфікування) впливу ОРН або ОРН-D-M. Дані представлені як середнє значення \pm SD для трьох незалежних експериментів. * — відмінності статистично значущі щодо значень групи здорових тварин (Контроль), $p < 0,05$; ** — відмінності статистично значущі щодо значень контролю вірусу грипу (Грип), $p < 0,05$; а — відмінності статистично значущі щодо значень групи лікувальна схема застосування ОРН-D-M (грип+ ОРН-D-M), $p < 0,05$

3.2.4. Вплив ОРН та ОРН-D-M на експресію цитокінів та хемокінів в умовах інфекції вірусу грипу. Отримані результати в ході наших експериментів вказують на те, що ОРН та ОРН-D-M знижують експресію ISG та прооксидантних генів шляхом впливу на імунні або про-запальні цитокіни. Для перевірки цієї гіпотези було вивчено експресію генів противірусних (*Ifna2*, *Ifnb1*, *Ifne*, *Ifnk*), імунних (*Ifny*), про-запальних цитокінів (*Il6*, *Il1b*, *Il12a*, *Tnfa*) та хемокінів (*Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*).

Як показано на рисунках 3.16-3.19 у тканинах легенів тварин через 48 год після інфікування вірусом грипу A/FM/1/47/H1N1 було виявлено гіперекспресію рівнів мРНК генів *Ifna2*, *Ifnb1*, *Ifny*, *Il6*, *Il1b*, *Il12a*, *Tnfa*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11* ($p < 0,05$). Наші дані узгоджуються з опублікованими даними, які свідчать про гіперпродукцію цитокінів у відповідь на вірус грипу (61,70). Крім того, вперше показано індуковану вірусом грипу надрегуляцію генів *Ifne* та *Ifnk* на рівні мРНК ($p < 0,05$). Зокрема, рівень мРНК *Ifne* та *Ifnk* у легенях мишей через 48 год після інфікування вірусом грипу підвищувався у 10 та 8,5 разів відповідно у порівнянні з групою контрольних тварин (рис. 3.16) (207).

Зниження надекспресії мРНК *Ifne*, *Ifnk*, *Ifna2*, *Ifnb1*, *Ifny* (рис. 3.16), *Il6*, *Il1b*, *Il12a*, *Tnfa* (рис. 3.17), *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5* (рис. 3.18), *Cxcl9*, *Cxcl10* та *Cxcl11* (рис. 3.19) спостерігалось у інфікованих тварин, яким вводили препарати ОРН та ОРН-D-M для профілактики та лікування грипу у порівнянні з групою контроль грипу. До того ж при профілактичній схемі застосування ОРН та ОРН-D-M рівень мРНК *Il12a* достовірно нижчий у 5,4 та 2,8 рази відповідно, а рівень мРНК *Ccl3* – у 4,6 та 2,4 відповідно у порівнянні як при лікувальній схемі застосування досліджуваних препаратів ($p < 0,05$) (рис. 3.17, 3.18). Відмінним був рівень мРНК *Ifna2* при профілактичній та лікувальній схемах введення ОРН та ОРН-D-M. Зокрема, у тканинах легенів інфікованих тварин після лікування ОРН та ОРН-D-M рівень мРНК *Ifna2* був достовірно нижчим у 3,3 та 4,2 рази відповідно ніж у тварин з профілактикою ОРН та ОРН-D-M (рис. 3.16) (207).

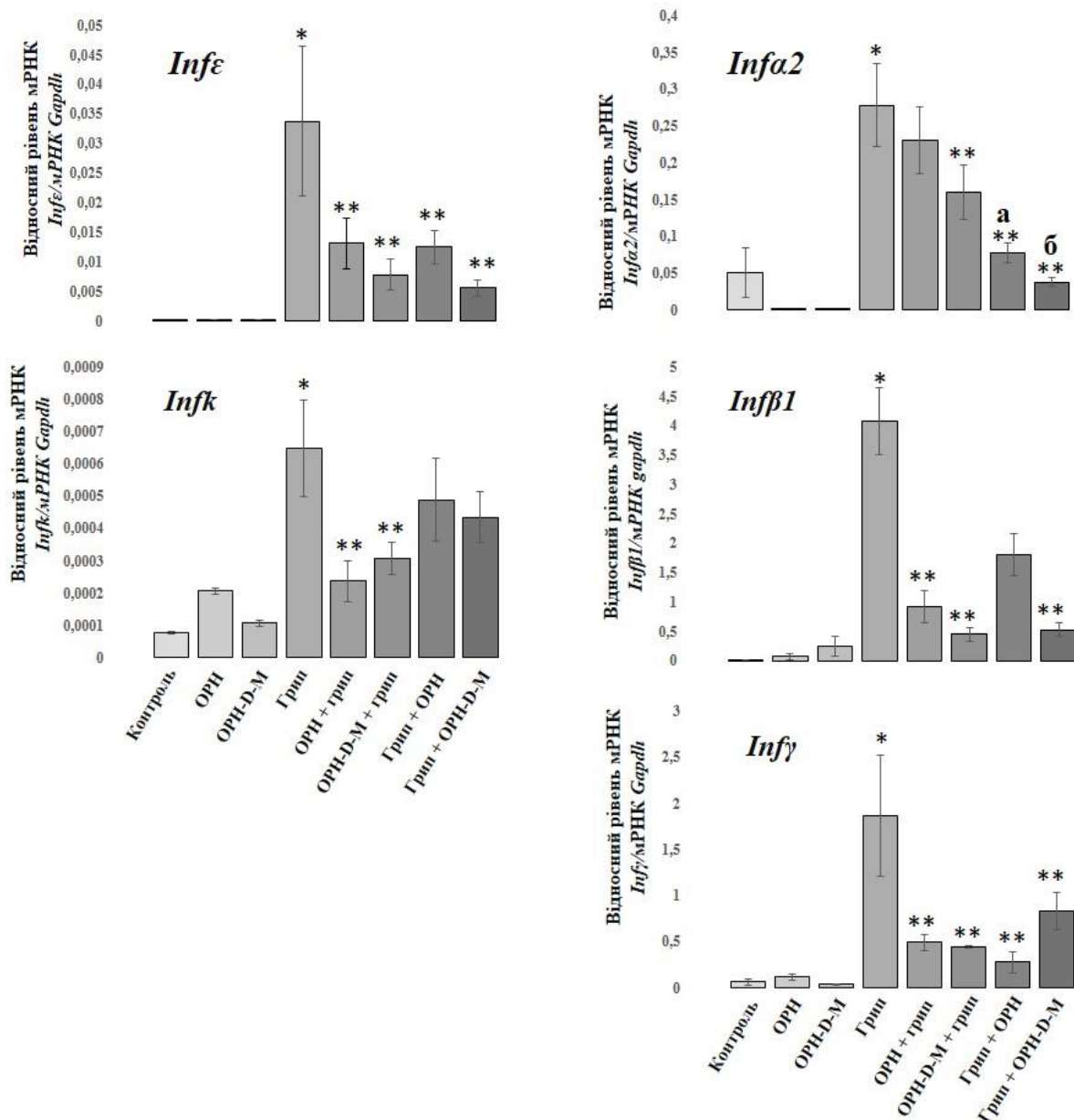


Рис. 3.16. Рівень мРНК IFN у легенях мишей BALB/c через 48 год після інфікування вірусом грипу A/FM/1/47/H1N1 та профілактичного (24 год до інфікування) або лікувального (24 год після інфікування) впливу ОРН або ОРН-D-M. Дані представлені як середнє значення \pm SD для трьох незалежних експериментів. * — відмінності статистично значущі щодо значень групи здорових тварин (Контроль), $p < 0,05$; ** — відмінності статистично значущі щодо значень контролю вірусу грипу (Грип), $p < 0,05$; а — відмінності статистично значущі щодо значень групи профілактичної схеми застосування ОРН (грип+ ОРН), $p < 0,05$; б — відмінності статистично значущі щодо значень групи профілактичної схеми застосування ОРН-D-M (грип+ ОРН-D-M), $p < 0,05$

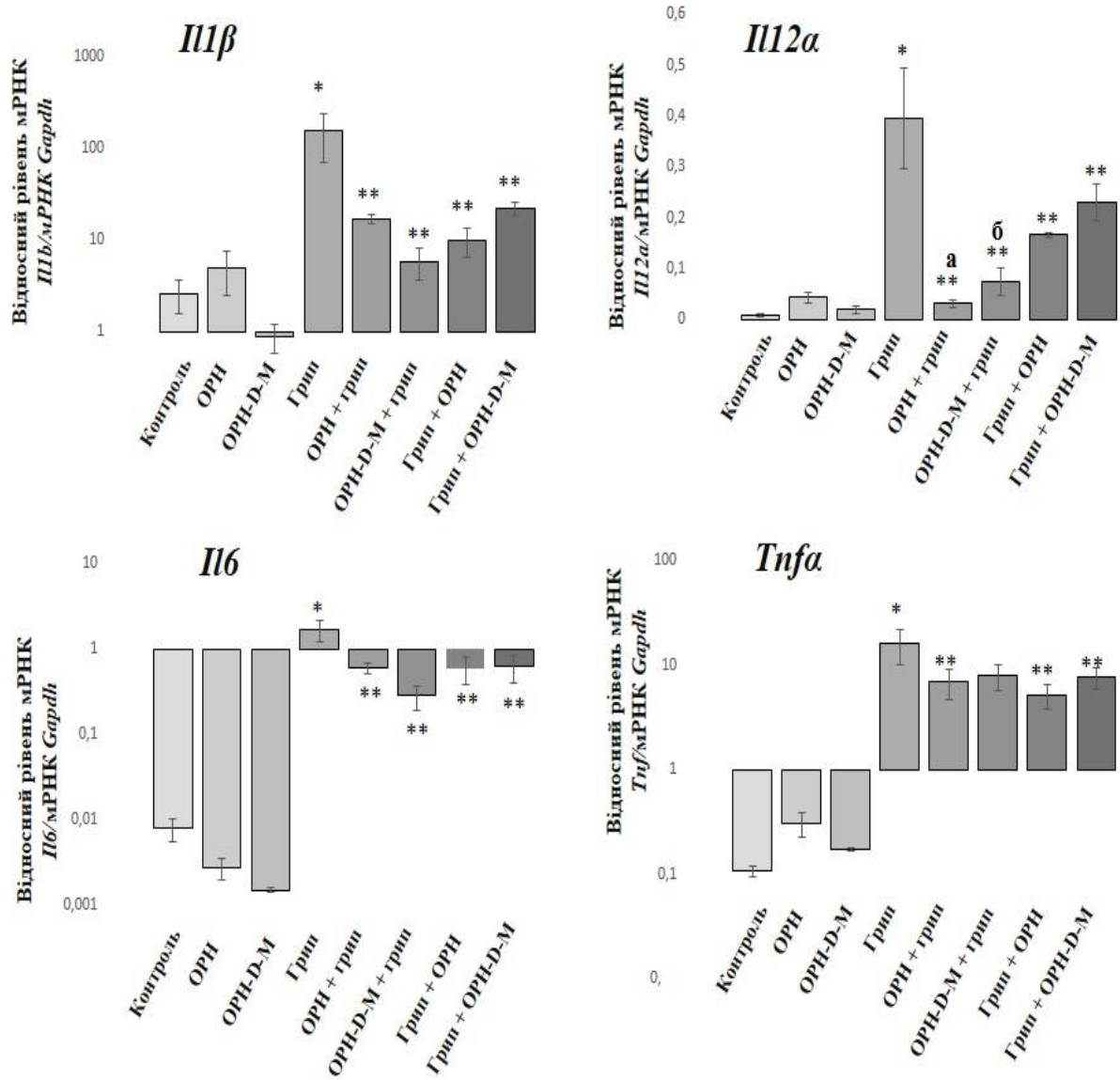


Рис. 3.17. Рівень мРНК про-запальних цитокінів у легенях мишей BALB/c через 48 год після інфікування вірусом грипу A/FM/1/47/H1N1 та профілактичного (24 год до інфікування) або лікувального (24 год після інфікування) впливу ОРН або ОРН-D-M. Дані представлені як середнє значення \pm SD для трьох незалежних експериментів. * — відмінності статистично значущі щодо значень групи здорових тварин (Контроль), $p < 0,05$; ** — відмінності статистично значущі щодо значень контролю вірусу грипу (Грип), $p < 0,05$; а — відмінності статистично значущі щодо значень групи лікувальної схеми застосування ОРН (грип+ ОРН), $p < 0,05$; б — відмінності статистично значущі щодо значень групи лікувальної схеми застосування ОРН-D-M (грип+ОРН-D-M), $p < 0,05$

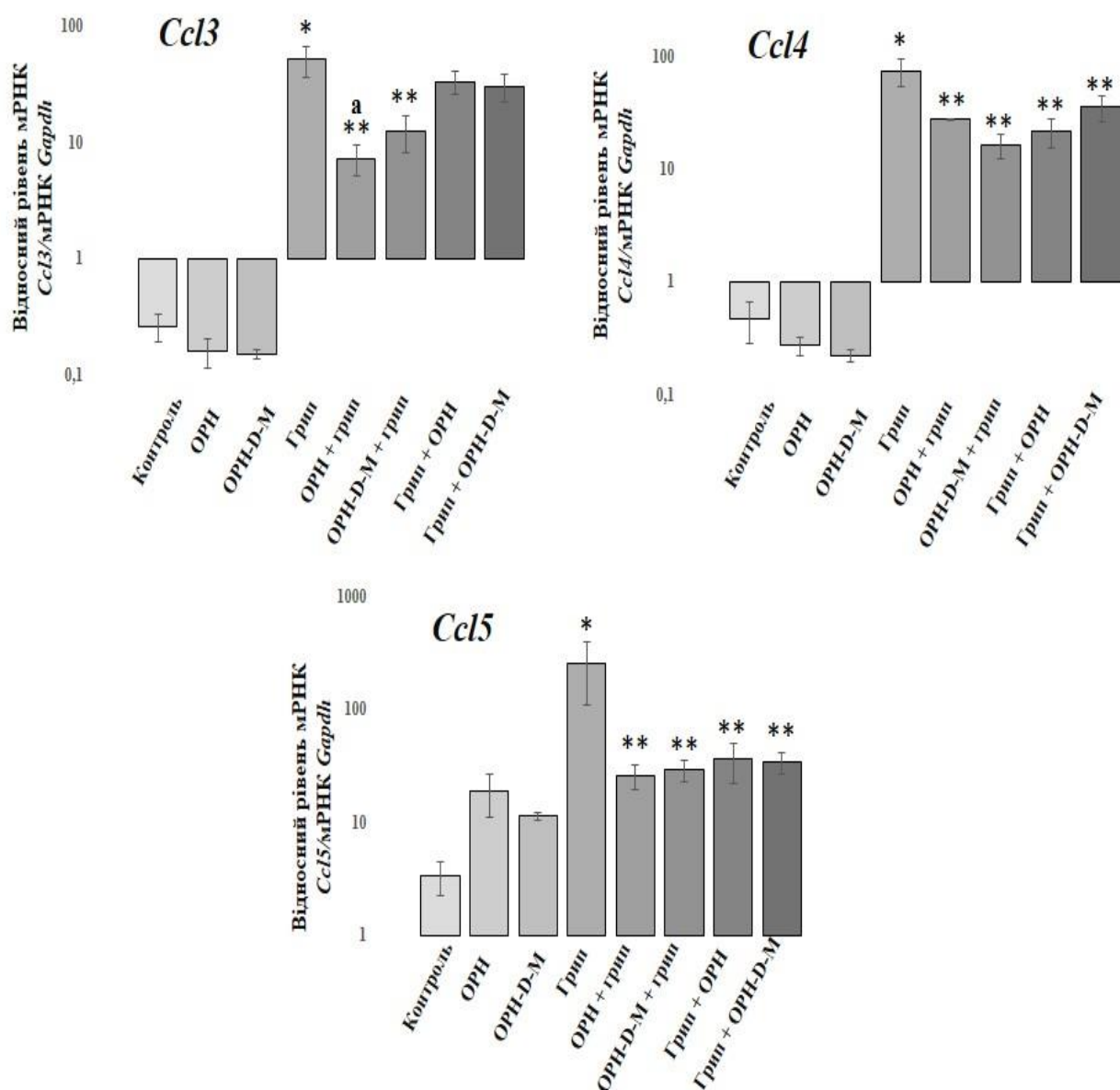


Рис. 3.18. Рівень мРНК СС хемокінів у легенях мишей BALB/c через 48 год після інфікування вірусом грипу A/FM/1/47/H1N1 та профілактичного (24 год до інфікування) або лікувального (24 год після інфікування) впливу ОРН або ОРН-D-M. Дані представлені як середнє значення \pm SD для трьох незалежних експериментів. * — відмінності статистично значущі щодо значень групи здорових тварин (Контроль), $p < 0,05$; ** — відмінності статистично значущі щодо значень контролю вірусу грипу (Грип), $p < 0,05$; а — відмінності статистично значущі щодо значень групи лікувальної схеми застосування ОРН (грип+ ОРН), $p < 0,05$

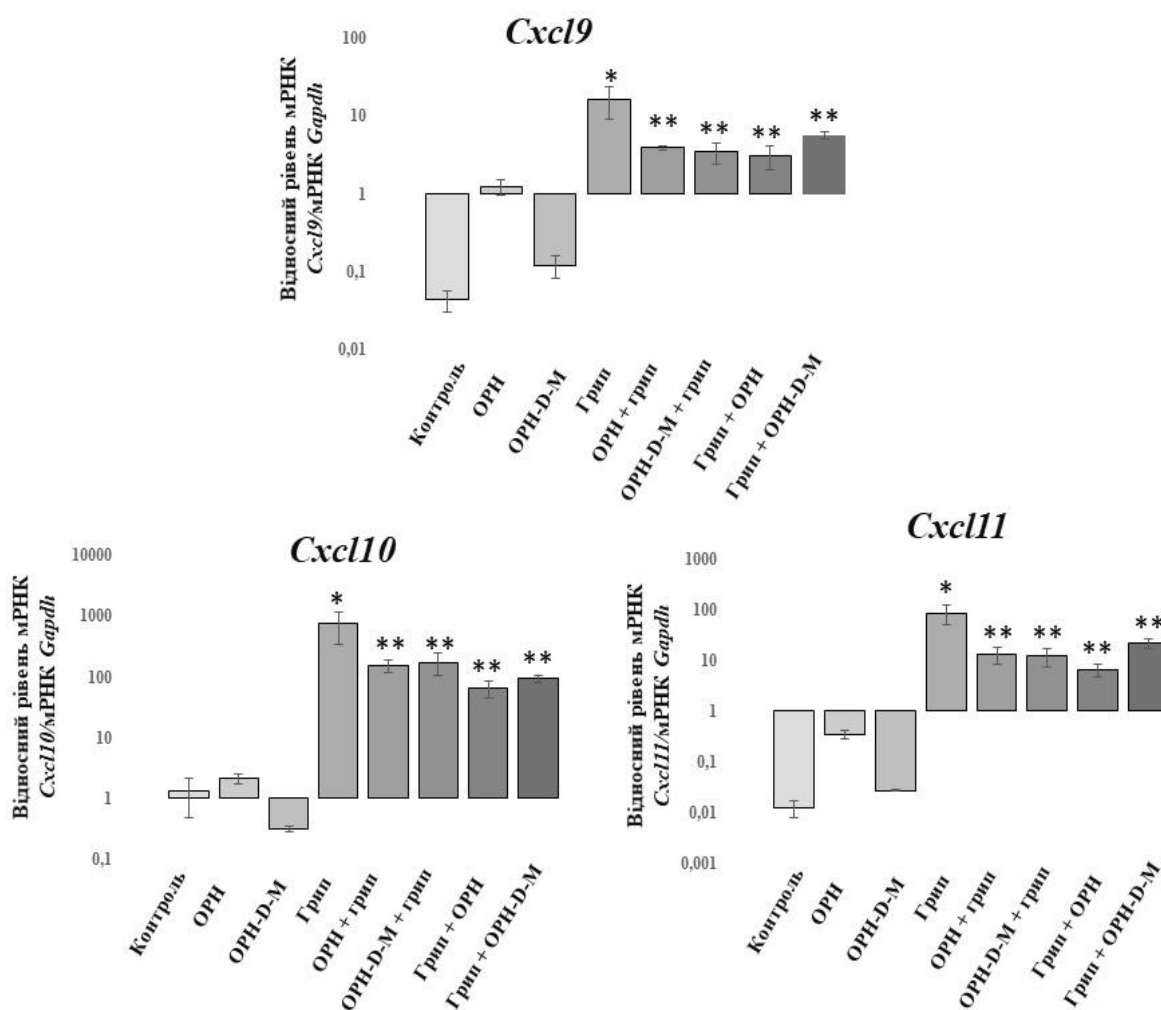


Рис. 3.19. Рівень мРНК СХС хемокінів у легенях мишей BALB/c через 48 год після інфікування вірусом грипу A/FM/1/47/H1N1 та профілактичного (24 год до інфікування) або лікувального (24 год після інфікування) впливу ОРН або ОРН-D-M. Дані представлені як середнє значення \pm SD для трьох незалежних експериментів. * — відмінності статистично значущі щодо значень групи здорових тварин (Контроль), $p < 0,05$; ** — відмінності статистично значущі щодо значень контролю вірусу грипу (Грип), $p < 0,05$

Варто зауважити, що у групах контроль ОРН та ОРН-D-M нами спостерігався незмінний рівень експресії мРНК *Ifnε*, *Ifnk*, *Ifnα2*, *Ifnβ1*, *Ifnγ*, *Il6*, *Il1β*, *Il12α*, *Tnfa*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10* та *Cxcl11* у легенях здорових мишей, на 24 годину після введення ОРН та ОРН-D-M порівняно з контролем (див. рисунки 3.16-3.19). Загалом дані змін експресії генів цитокінів та хемокінів

узгоджуються з даними змін експресії ISG та прооксидантних генів під впливом препаратів ОРН, ОРН-D-M та інфекції вірусу грипу.

Аналіз отриманих даних вказує на здатність препаратів олігорибонуклеотидів знижувати грип-індуковану гіперекспресію ISG та прооксидантних генів шляхом інгібування надекспресії генів цитокінів. Проте, одночасне пригнічення олігорибонуклеотидами гіперекспресії противірусних (*Ifn α 2*, *Ifn β 1*, *Ifn ϵ* , *Ifnk*), імунних (*Ifn γ*) і про-запальних цитокінів (*Il6*, *Il1b*, *Il12a*, *Tnf*) та хемокінів (*Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*) дозволяє припустити, що препарати ОРН та ОРН-D-M ймовірно впливають на транскрипційний фактор, який регулює експресію вище досліджуваних генів.

3.2.5. Вивчення експресії генів транскрипційного фактору NF- κ B за умов інфікування вірусом грипу за дії ОРН та ОРН-D-M. Відомо, що під час вірусної інфекції грипу спостерігається підвищена експресія ключового транскрипційного фактору NF- κ B (54, 60, 61) та відіграє подвійну роль, а саме бере участь у реплікації вірусу грипу (65) та індукції вродженої імунної відповіді на вірус грипу (62). Тому актуальним було дослідити вплив препаратів ОРН та ОРН-D-M на експресію генів NF- κ B під час інфекції вірусу грипу.

NF- κ B складається з димерів (NF- κ B1, NF- κ B2, RelA, RelB, c-Rel) та інгібітору (I κ B), тому доцільним було дослідити зміни експресії генів NF- κ B різної функціональної приналежності. Тому у нашій роботі для вивчення впливу препаратів олігорибонуклеотидів на експресію NF- κ B за умов інфекції вірусом грипу ми дослідили зміни експресії генів *Nfkb1* та *Nfkbia* (I κ B) (рис. 3.20, 3.21).

За допомогою кількісного ПЛР-РЧ було встановлено, що рівень мРНК генів *Nfkb1* та *Nfkbia* підвищується у 5 та 4,3 разів відповідно у тканинах легенів мишей під час вірусної інфекції грипу A/FM/1/47/H1N1 у порівнянні з групою контрольних тварин ($p < 0,05$) (рис. 3.20). 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) виявлено значне зниження рівнів

мРНК *Nfkb1* (у 3,1; 2,5; 3; 2 разів відповідно) та *Nfkbia* (у 3; 3,7; 3 разів; на 45 % відповідно) у порівнянні з контрольними інфікованими сіврусом грипу тваринами. У той же час значних змін у рівнях мРНК генів *Nfkb1* та *Nfkbia* після введення ОРН та ОРН-D-M неінфікованим тваринам не було виявлено (207).

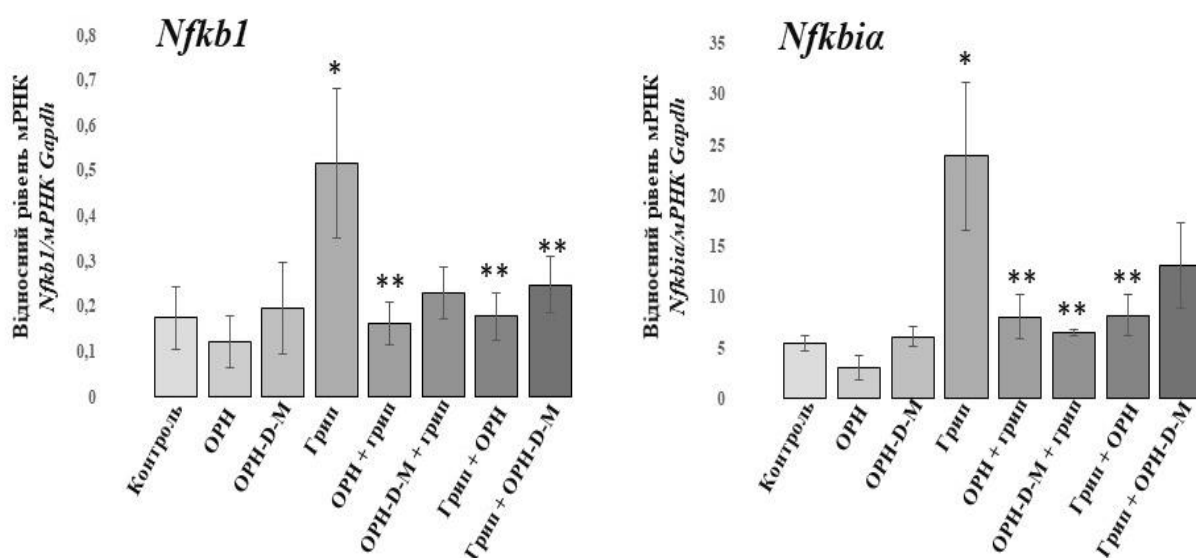


Рис. 3.20. Рівень мРНК транскрипційного фактору NF-κB (*Nfkb1* та *Nfkbia*) у легенях мишей BALB/c через 48 год після інфікування вірусом грипу A/FM/1/47/H1N1 та профілактичного (24 год до інфікування) або лікувального (24 год після інфікування) впливу ОРН або ОРН-D-M. Дані представлені як середнє значення ± SD для трьох незалежних експериментів. * — відмінності статистично значущі щодо значень групи здорових тварин (Контроль), $p < 0,05$; ** — відмінності статистично значущі щодо значень контролю вірусу грипу (Грип), $p < 0,05$

Оскільки препарати ОРН та ОРН-D-M знижують грип-індуковану гіперекспресію генів на рівні транскрипції, надзвичайно важливим залишається вивчення змін експресії цих генів на рівні трансляції. Тому наступним кроком було дослідити вплив олігорибонуклеотидів на рівень протеїнів *Nfkb1* та ІκB (*Nfkbia*) у мишей інфікованих вірусом грипу.

Із застосуванням Вестерн-блот аналізу було показано, що рівень експресії білків даних генів залишався без змін у легенях неінфікованої групи тварин – контроль препаратів. Через 48 год після інфікування вірусом грипу рівні протеїнів Nfkb1 та ІкВ у легенях мишей були підвищені, тоді як після профілактичної та лікувальної схем введення ОРН та ОРН-D-M рівні експресії білків Nfkb1 та ІкВ були нижчими у порівнянні з грип-інфікованими мишами (рис. 3.21).

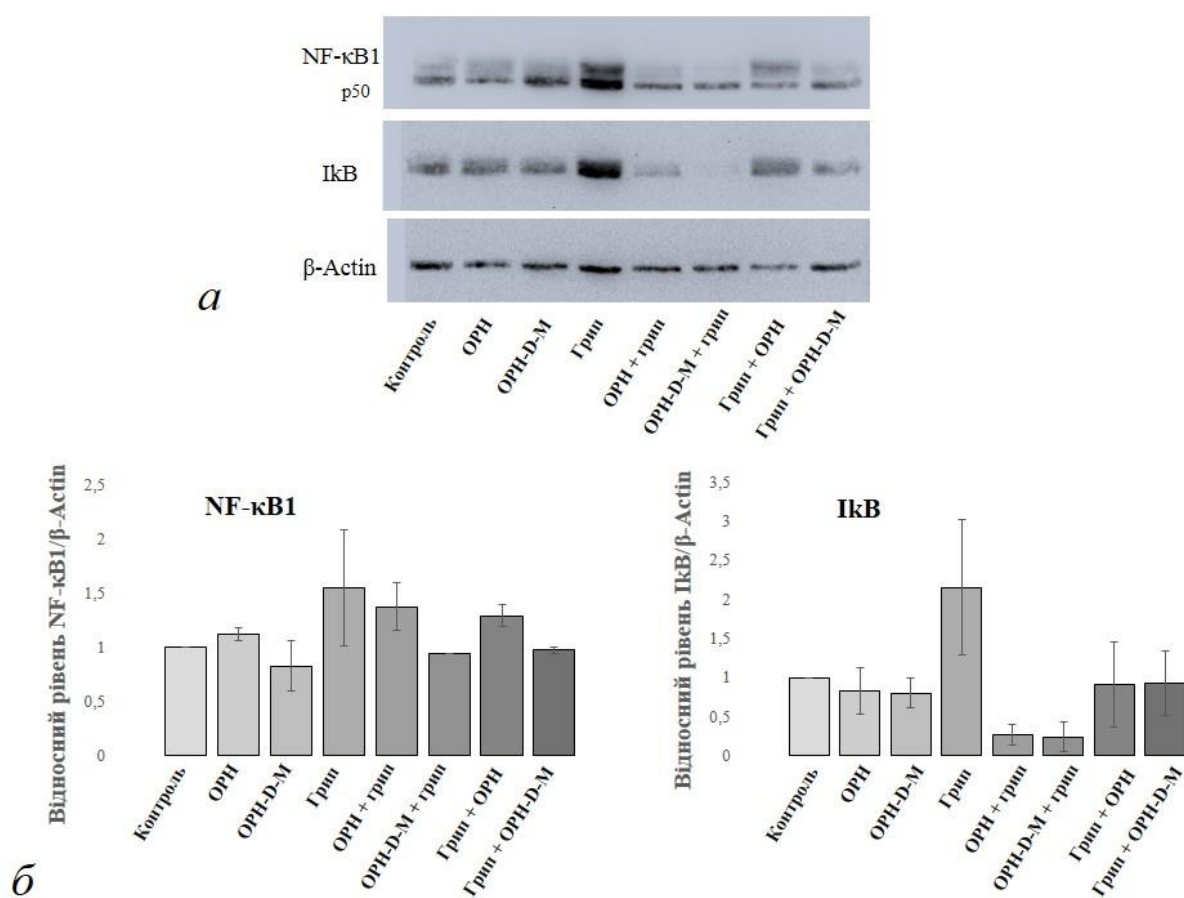


Рис. 3.21. Рівень протеїну транскрипційного фактору NF-κB (Nfkb1 і ІкВ) у легенях мишей BALB/c через 48 год після інфікування вірусом грипу A/FM/1/47/H1N1 та профілактичного (24 год до інфікування) або лікувального (24 год після інфікування) впливу ОРН або ОРН-D-M. Імуноблотограма результатів детекції (а) та її денситометрія (б)

Однак достовірної різниці на рівні білка в даному дослідженні не було виявлено, що ми пов'язуємо з часом інфікування тварин. Зокрема, у літературних джерелах показано, що віруленстність вірусу грипу спостерігається на 5 добу після інфікування, а також показано у мишей BALB/c, що рівні мРНК генів вродженого імунітету та продуктів ПОЛ були вищі на 5 добу інфікування порівняно як на 3 добу (206, 212). У зв'язку з 100 % летальністю тварин BALB/c на 5 добу після інфікування вірусом грипу A/FM/1/47/H1N1, ми проводили дослідження на 3 добу після інфікування (181), які дозволили нам отримати дані з достовірними різницями на рівні мРНК та не достовірними різницями на рівні білків.

Отримані дані експресії генів NF-κB вказують, що препарати олігорибонуклеотидів знижують їхню експресію на рівні транскрипції та трансляції. Олігорибонуклеотиди та їхні комплекси з D-манітолом пригнічують експресію генів NF-κB перешкоджаючи надекспресії генів цитокінів, хемокінів та прооксидантних генів під час інфекції грипу. Одночасне інгібування димеру та інгібітору NF-κB дозволяє припустити, що ОРН та ОРН-D-M можуть впливати на паттерн-розпізнаючі рецептори, які індукують експресію багатьох генів вродженого імунітету через активацію NF-κB.

3.2.6. Вивчення експресії генів паттерн-розпізнаючих рецепторів Tlr3, Tlr7 та Tlr8 за дії грипу та ОРН та ОРН-D-M. Вірусні нуклеїнові кислоти детектуються рецепторами TLR 3, 7, 8, які ініціюють вроджену імунну відповідь на інфекцію вірусу грипу активуючи фактор NF-κB (45-47). Тому дослідження впливу олігорибонуклеотидів на рецептори TLR 3, 7, 8 є важливою частиною вивчення можливого механізму протизапальної дії препаратів ОРН та ОРН-D-M.

Досліджуючи рівень мРНК генів *Tlr3*, *Tlr7*, *Tlr8* було виявлено таку саму тенденцію, як і при дослідженні рівнів мРНК генів *Xdh*, *Nos2*, *Arg2*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oas3*, *Mx1*, *Eif2ak2*, *Ifnε*, *Ifnκ*, *Ifnα2*, *Ifnβ1*, *Ifnγ*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Il6*, *Il1β*, *Il12α*, *Tnfa*, *Nfkb1* та *Nfkbia* (рис. 3.12-3.22).

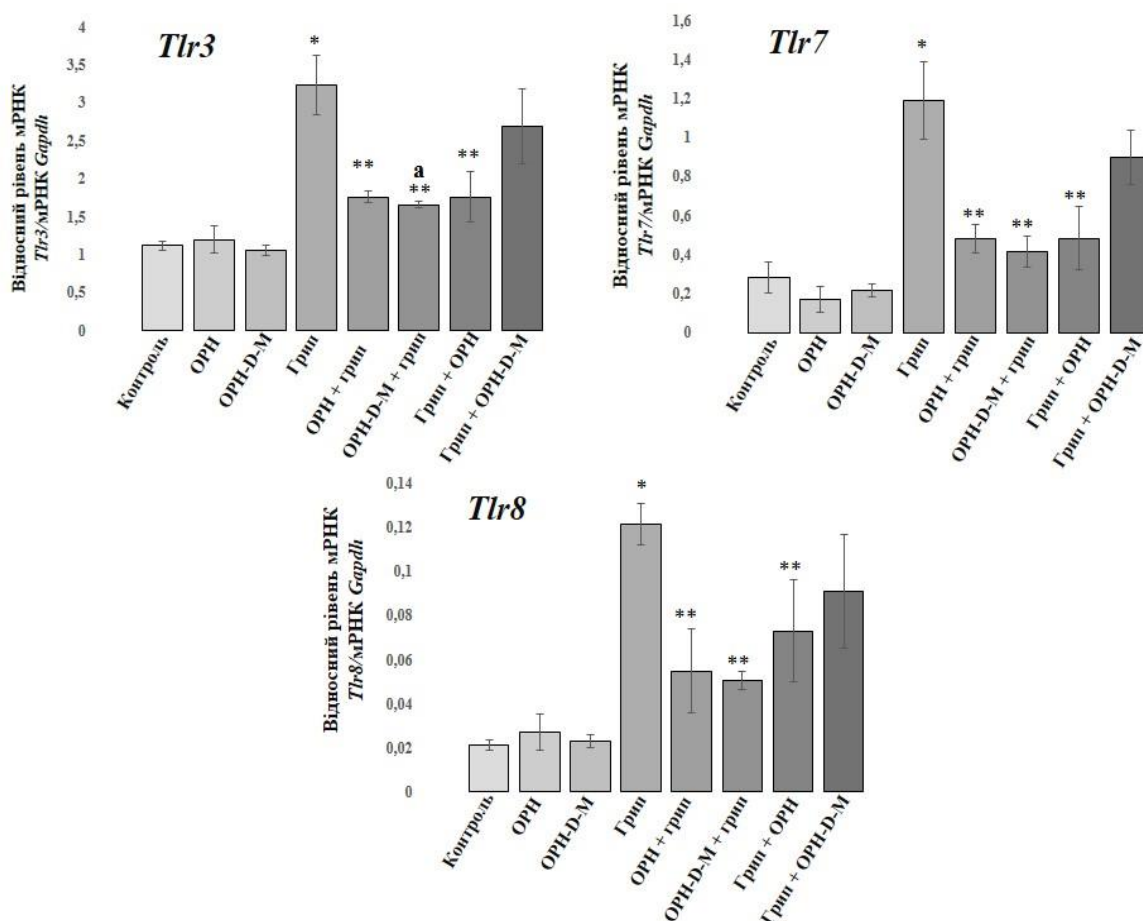


Рис. 3.22. Рівень мРНК генів паттерн-розпізнаючих рецепторів *Tlr3*, *Tlr7* та *Tlr8* у легенях мишей BALB/c через 48 год після інфікування вірусом грипу A/FM/1/47/H1N1 та профілактичного (24 год до інфікування) або лікувального (24 год після інфікування) впливу ОРН або ОРН-D-M. Дані представлені як середнє значення \pm SD для трьох незалежних експериментів. * — відмінності статистично значущі щодо значень групи здорових тварин (Контроль), $p < 0,05$; ** — відмінності статистично значущі щодо значень контролю вірусу грипу (Грип), $p < 0,05$; а — відмінності статистично значущі щодо значень групи лікувальної схеми застосування ОРН-D-M (грип+ ОРН-D-M), $p < 0,05$

Наприклад, було показано, що рівень експресії мРНК генів *Tlr3*, *Tlr7* та *Tlr8* зростає у 3, 4,3 та 6 разів відповідно у легенях мишей через 48 год після інфікування вірусом грипу у порівнянні з контролем ($p < 0,05$) (див. рис. 3.22). Рівні мРНК генів *Tlr3*, *Tlr7* та *Tlr8* достовірно знижувалися при профілактичній схемі введення 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 – контроль грипу ($p < 0,05$). При лікуванні грипу з препаратами також спостерігалось зниження рівня мРНК даних генів, однак лишень у випадку лікування ОРН було достовірне зниження мРНК *Tlr3*, *Tlr7* та *Tlr8* на 45,5 %, у 2,5 рази та на 42 % відповідно порівняно з контролем грипу ($p < 0,05$). Також виявлено, що при профілактичній схемі застосування ОРН-D-M експресія мРНК *Tlr3*, *Tlr7*, *Tlr8* нижча на 38 ($p < 0,05$), 46 та 44 % у порівнянні як при лікувальній схемі застосування (ОРН-D-M+грип). Незмінна експресія мРНК досліджених генів спостерігалась у тканинах легенів неінфікованих вірусом мишей після 24 год введення ОРН та ОРН-D-M (207). Отже, ми можемо припустити, що за умов інфекції грипу пригнічення надекспресії *Tlr3*, *Tlr7*, *Tlr8* препаратами ОРН та ОРН-D-M призводить до інгібування підвищення експресії TLR-стимульованих генів вродженого імунітету (*Nfkb1*, *Nfkbia*, *Ifnε*, *Ifnκ*, *Ifnα2*, *Ifnβ1*, *Ifnγ*, *Il6*, *Il1β*, *Il12α*, *Tnfa*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oas3*, *Mx1*, *Eif2ak2*, *Xdh*, *Nos2*, *Arg2*). Модуляція вродженої імунної відповідь на вірус грипу природними олігорибонуклеотидами ймовірно відбувається шляхом перешкоджання активації сигнальних шляхів TLR-3, TLR-7 та TLR-8.

Аналіз профілю експресії генів вродженого імунітету показав, що препарати ОРН та ОРН-D-M знижують гіперекспресію мРНК *Tlr3*, *Tlr7*, *Tlr8*, *Nfkb1*, *Nfkbia*, *Ifnε*, *Ifnκ*, *Ifnα2*, *Ifnβ1*, *Ifnγ*, *Il6*, *Il1β*, *Il12α*, *Tnfa*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oas3*, *Mx1*, *Eif2ak2*, *Xdh*, *Nos2*, *Arg2*, яка індукована вірусом грипу. Ослаблення гіперекспресії рівнів мРНК деяких генів вродженого імунітету у відповідь на вірус грипу було суттєвішим за умови профілактичної схеми введення ОРН та ОРН-D-M порівняно з лікувальною схемою застосування. Крім того дані відносної експресії генів вродженого імунітету узгоджуються з даними реплікації вірусу грипу у тканинах легенів. Отримані результати вказують, що олігорибонуклеотиди інгібують інфекцію вірусу грипу та нормалізують експресію TLR-асоційованих генів вродженого імунітету. Проте інфекційний титр вірусу у інфікованих тварин після профілактики та лікування ОРН та ОРН-D-M залишався високим, у той час як

експресія генів вродженого імунітету суттєво знижувалася вказуючи на ефективнішу протизапальну дію ОРН порівняно з противірусною. Під час даного дослідження *in vivo* не було виявлено достовірної різниці між впливом ОРН та ОРН-D-M на рівні мРНК досліджуваних генів вказуючи, що природні олігорибонуклеотиди не індують чи інгібують експресію генів вродженого імунітету за нормальних умов.

Результати досліджень, представлені у цьому підрозділі, опубліковані у наступних роботах:

1. **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.
2. **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*, *xdh*, *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.
3. **Melnichuk N.**, Kashuba V., Tkachuk Z. Oligoribonucleotide effects on expression of *nos2*, *arg2*, *xdh*, *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.
4. **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.

5. **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.
6. **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.
7. **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.
8. **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.
9. **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.
10. **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.
11. **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.

РОЗДІЛ 4.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Щорічні тривалентні або чотиривалентні вакцини є найефективнішим способом запобігання зараженню та важких наслідків, які спричинені вірусами грипу (who.int/influenza/vaccines). Однак з швидким антигенним дрейфом та шифтом вірусів грипу, підбір вакцини з відповідними штамми є досить важким завданням (cdc.gov/flu/about/season/vaccine-selection.htm) (213-215). Крім того, на теперішній час терапевтичний простір малих молекул проти вірусу грипу обмежений чотирма ліцензованими препаратами: озельтамівір (Tamiflu) та занамівір (Relenza), які перешкоджають виходу нових віріонів інгібуючи NA (21), та амантадин (Symmetrel) і римантадин (Flumadine), які є інгібіторами іонних каналів M2 (24, 25, 216). Проте, розвиток резистентності вірусу грипу до цих препаратів призвів до зниження їхньої ефективності (24, 25, 216). З постійною загрозою нових штамів вірусів грипу існує нагальна потреба у терапевтичних засобах з новими механізмами дії та проти нових мішеней. Більше того, ко-інфекції з вірусом грипу та іншими респіраторними вірусами знижують ефективність деяких вищезгаданих препаратів (217, 218). Тому пошук противірусних препаратів проти вірусу грипу з широким спектром противірусної дії є важливим та актуальним завданням для дослідників.

Інфекція вірусом грипу А часто характеризується значним запаленням (219). Пошкодження легеневої тканини, яке викликане вірусом грипу є наслідком гострого запалення у результаті вивільнення про-запальних хемокінів та рекрутингу нейтрофілів, лімфоцитів, мононуклеарних фагоцитів в альвеолярний простір для обмеження поширення вірусу (220). До того ж підвищений рівень вільних радикалів може безпосередньо сприяти загибелі клітин тканин інфікованих легенів та загострювати патологію спричинену

реплікацією вірусу грипу (124). Тому використання терапевтичного препарату для ослаблення вродженої імунної відповіді у поєднанні з противірусною дією може зменшити симптоми та пошкодження тканин спричинені інфекцією вірусу грипу (221). Тому існує вагома потреба у противірусному препараті, який також має імуномодулюючу активність.

Дослідження останніх років показують, що ОРН мають противірусну дію при одночасному та широкому діапазоні вірусів (162, 163, 177–180, 183), а також проявляють імуномодулюючу дію при різних захворюваннях (164, 172, 173, 175). У зв'язку з цим ОРН є перспективним противірусним препаратом з протизапальними властивостями. Проте механізм дії ОРН та ОРН-D-M залишається не зрозумілим та потребує дослідження.

Попередні дослідження у нашій лабораторії показали, що ОРН-D-M мають високу протигрипозну активність при профілактиці і лікуванні інфекції грипу та можуть впливати на поверхневі антигени вірусу грипу (181).

Метою представленої роботи було визначити вплив природних ОРН та їхніх комплексів з D-манітолом на інфекційність вірусу грипу *in vitro* та індуквану експресію генів вродженого імунітету у відповідь на інфекцію вірусу грипу *in vivo*.

Вірус грипу інфікує та пошкоджує переважно епітеліальні клітини дихальних шляхів *in vivo* (222). Однак вірус грипу також може викликати загибель клітин *in vitro*. Пошкодження клітин тканинної культури (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 (196, 197).

Наші експерименти показали, що життєздатність грип-інфікованих клітин MDCK не змінюється, якщо вірус грипу попередньо інкубувати з препаратами ОРН та ОРН-D-M. Було показано зниження ЦПД та підвищення життєздатності клітин на 38 та 43 % відповідно препаратами ОРН та ОРН-D-M під час інфекції вірусу грипу. Отримані результати свідчать про пряму інактивуючу дію ОРН та

ОРН-D-M на вірус грипу A/FM/1/47/H1N1. Аналіз ТЦД₅₀ на клітинах MDCK показав, що природні ОРН можуть знижувати інфекційність вірусу грипу A/FM/1/47/H1N1. Ми показали значне інгібування інфекційності вірусу грипу комплексами ОРН-D-M, що створює передумови для подальшого дослідження впливу ОРН та ОРН-D-M на активність НА вірусу грипу.

Процес інфікування клітини вірусом грипу спочатку потребує зв'язування поверхневого білка НА вірусу грипу до глікану поверхневого рецептора клітини з наступним злиттям з мембраною. Наші експерименти показали, що ОРН та ОРН-D-M інгібують зв'язування білків НА вірусу грипу до залишків сілової кислоти гліканів еритроцитів. ОРН та ОРН-D-M у концентрації 2,5 та 3,5 мг/мл знижують титр НА вірусу грипу у 2 та 4 рази відповідно. Суттєвіше інгібування активності НА комплексами ОРН-D-M ймовірно забезпечується D-манітолом шляхом стабілізації ОРН (166). Аналіз отриманих даних дозволив припустити, що природні ОРН можуть зв'язуватися до або навколо рецептор зв'язуючого регіону НА, який необхідний для проникнення вірусу грипу у клітину хазяїна (223).

Для вивчення здатності біологічних молекул ОРН та їхніх комплексів ОРН-D-M взаємодіяти з НА, ми провели РГА та флуоресцентну спектроскопію з використанням ізольованого НА. РГА показала, що активність НА після інкубації з ОРН та ОРН-D-M суттєво знижується, а саме у 32 рази. Висока інгібуюча дія препаратів РНК на утворення НА-гліканової взаємодії при інкубуванні з ізольованим НА у порівнянні з вірусом грипу пояснюється тим, що на одному віріоні близько 500 молекул НА (224). Віріон грипу зв'язується з гліканом за рахунок одного чи декількох молекул НА (29), у той час як препарати ОРН та ОРН-D-M можуть зв'язуватися з великою кількістю молекул НА на одному віріоні. Крім цього виявлено тривале пригнічення активності НА препаратами ОРН-D-M, що дозволяє припустити, про здатність природних олігорибонуклеотидів змінювати конформацію НА (156).

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 піків НА (I пік – білкова основа та II пік – ароматичні залишки, які досягли вище збуджених електронних станів), які при цьому не змінюють свого положення у тривимірній системі координат (202) та утворення нового флуоресцентного компоненту (пік III), що дозволяє припустити про зміни у конформації НА після взаємодії з препаратами ОРН та ОРН-D-M (201). 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 μM відповідно. Таким чином, олігорибонуклеотиди та їхні комплекси потенційно можуть зв'язуватися з амінокислотами на або біля глікан зв'язуючого регіону (11), змінюючи конформацію білка (156) та ефективно запобігаючи НА-глікановій взаємодії. Відомо, що аптамери специфічно націлені на гемаглютинін певного підтипу вірусу грипу володіють противірусною дією, а саме інгібують утворення гемаглютинін-гліканової взаємодії та злиття вірусу з мембраною клітини, шляхом високо специфічної та афінної взаємодії аптамеру з НА (11). Досліджувані нами природні ОРН характеризуються низькою специфічністю та афінністю зв'язування з НА, що вказує на їхню низьку ефективність інгібування активності НА у порівнянні з аптамерами.

Мінлива природа НА створює великі труднощі у розробленні ефективного протигрипозного препарату, пошуку відповідної вакцини чи аптамера у зв'язку з постійним антигенним дрейфом та шифтом вірусу грипу (14, 213-215). Нами було досліджено, що інфекційність пандемічного вірусу А грипу A/California/07/2009(H1N1)pdm09 та пташиного вірусу А грипу A/mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2) знижується під дією комплексу ОРН-D-M. Протигрипозна дія ОРН-D-M проти різних штамів грипу вказує, що неспецифічна взаємодія ОРН-D-M з НА вірусу грипу може забезпечити

ефективність ОРН-D-M у разі мутації НА вірусу грипу та є вагомою перевагою над аптамерами націлених на НА.

Активация вродженої імунної відповіді на вірус грипу супроводжується цитокіновим штормом, який призводить до запалення та оксидативно-нітрозативно-опосередкованих пошкоджень у тканинах легенів (226). ОРН-D-M нормалізує цитокіновий профіль, який відіграє ключову роль при вродженій імунній відповіді, у хворих на діабет (170, 171), ВІЛ-інфікованих осіб із токсоплазмозом (182), пацієнтів з хронічним гепатитом С (177) та тварин з гострим ураженням печінки (175). Припускається, 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 нами було відібрано велику кількість генів, експресія яких суттєво зростає у відповідь на вірус грипу. Пошук генів мішеней також базувався на попередніх результатах нашої лабораторії, які демонстрували зміни активності білків клітини за дії препаратів ОРН та ОРН-D-M (164, 169-171).

При запальних процесах неінфекційної природи, ОРН та їхні комплекси з D-M мають мембраностабілізуючі властивості та стабілізують активність NOS (164, 169, 209). Досліджено суттєве підвищення експресії генів *Nos2*, *Xdh* та *Arg2*, які беруть участь у оксидативно-нітрозативному стресі у мишей за умов інфекції вірусом грипу А Н1N1 (А/FM/1/47). Введення ОРН та ОРН-D-M при профілактичній та лікувальній схемах застосування знижувало підвищений рівень мРНК генів *Nos2*, *Xdh* та *Arg2*, який був індукований вірусом грипу. Наступним ми оцінили здатність ОРН та ОРН-D-M впливати на рівень продуктів ПОЛ у легенях мишей під час зараження вірусом грипу та виявили, що досліджувані препарати при профілактичній та лікувальній схемах застосування знижують рівень ПОЛ у тканинах легенів інфікованих мишей. Отримані дані дозволяють припустити, що ОРН та ОРН-D-M ймовірно знижують рівень білка *Nos2* та *Xdh* під час інфекції грипу. Результати, отримані в ході наших експериментів виявили, що під час інфекції вірусом грипу ОРН та

ОРН-D-M можуть перешкоджати підвищенню експресії генів *Nos2*, *Xdh* та *Arg2* та збільшенню продуктів ПОЛ і як результат пригнічувати активність NOS та стабілізувати мембрану (169, 209). Нормалізація експресії одночасно генів *Nos2*, *Xdh* та *Arg2* вказує на опосередковану дію препаратів ОРН.

OAS/RNase L система, MX1 білок та PKR є компонентами інтерферон стимульованого противірусного захисту клітини хазяїна у відповідь на інфікування вірусом грипу (227, 228). В даній роботі ми припускали, що препарати ОРН проявлять противірусну дію за рахунок індукції експресії ISG. Однак введення ОРН та ОРН-D-M здоровим тваринам не викликало підвищення експресії генів *Eif2ak2*, *Mx1*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oas3* та *Rnase1*. Тоді як навпаки індуковані вірусом грипу рівні мРНК *Eif2ak2*, *Mx1*, *Oas1a*, *Oas2*, *Oas3* знижувалися у тварин, яким вводили препарати ОРН та ОРН-D-M за профілактичною та лікувальною схемами. Результати експресії ISG вказують, що ОРН та ОРН-D-M не стимулюють імунний противірусний захист клітини хазяїна. Тоді як пригнічення препаратами ОРН експресії ISG, індукованої вірусом грипу вказує на можливий вплив на IFN типу I.

Вивчення експресії 15 ключових генів цитокінів та хемокінів, після профілактичного та лікувального застосувань ОРН та ОРН-D-M при інфекції грипу, проведене у даній роботі, показало, зниження гіперекспресії *Ifnε*, *Ifnk*, *Ifna2*, *Ifnb1*, *Ifnγ*, *Il6*, *Il1b*, *Il12a*, *Tnf*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10* та *Cxcl11*. Ці результати демонструють, що ОРН та ОРН-D-M нормалізують рівні цитокінів та хемокінів у тканинах легень під час інфекції грипу. Раніше клінічні дослідження показали, що ОРН-D-M нормалізують рівні цитокінів у пацієнтів з гепатитом С (IL-1β, TNF, IL-10, IL-4) (177), діабеті (TNF, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10) (170, 171) та ВІЛ-інфікованих осіб (TNF, IL-10) (182). Нормалізація рівнів цитокінів ОРН-D-M при різних захворюваннях свідчить про існування механізму дії препарату, завдяки якому він має широкий спектр біологічної дії. Цікаво, що подібні властивості мають короткі інтерферуючі РНК (siRNA, мікроРНК, антисенсусні олігонуклеотиди), які можуть інгібувати експресію

декількох генів клітини або вірусу (152, 153). Однак інгібування грип-індукованої надекспресії генів цитокінів та хемокінів природними ОРН та ОРН-D-M ймовірно не пов'язане з процесом РНК інтерференція, оскільки ОРН та ОРН-D-M не змінювали експресію генів у легенях не інфікованих тварин.

Високо експресований транскрипційний фактор NF-κB за умов інфекції вірусу грипу підвищено регулює експресію генів вродженого імунітету та бере участь у реплікації вірусу (54, 60-62, 65, 67). Дослідження експресії генів NF-κB (*Nfkb1* та *Nfkbia* (IkB)) на рівні транскрипції та трансляції показало зниження грип-індукованої надрегуляції *Nfkb1* та *Nfkbia* препаратами ОРН введених за лікувальною та профілактичною схемами застосування. Інгібуючи грип-індуковану експресію генів NF-κB, ОРН та ОРН-D-M можуть перешкоджати підвищенню експресії генів цитокінів, хемокінів та прооксидантних генів під час інфекції грипу. Отримані дані дозволили припустити, що ОРН та ОРН-D-M перешкоджають підвищенню експресії NF-κB шляхом впливу на його шляхи активації, а саме зв'язуючись з НА та Toll-подібними рецепторами.

Екзогенні олігонуклеотиди проникають у живі клітини за допомогою ендоцитозних шляхів (161). Одно чи дволанцюгові олігонуклеотиди здатні зв'язуватися з TLR 3, 7, 8, які знаходяться у ендосомах клітин. Проблема доставки терапевтичних олігонуклеотидів полягає у їх зв'язуванні з TLR 3, 7, 8, яке може призводити до індукції вродженої імунної відповіді та як результат порушення доставки олігонуклеотидів до молекул мішеней. Модифікація олігонуклеотидів підвищує ефективність їх проникнення та перешкоджає взаємодії з TLR. 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 (45-46). Вивчення рівня мРНК *Tlr3*, *Tlr7*, *Tlr8* у тканинах легенів інфікованих тварин за дії препаратів ОРН та їхніх комплексів ОРН-D-M, проведене в даній роботі, показало, що введення препаратів ОРН та ОРН-D-M інфікованим тваринам призводило до нормалізації експресії генів Toll-подібних рецепторів. Отримані результати дозволяють припустити, що

ОРН та ОРН-D-M інгібують гіперекспресію *Tlr3*, *Tlr7*, *Tlr8*, яка індукується вірусом грипу, перешкоджаючи надрегуляції генів NF-κB, цитокінів, хемокинів, ISG та прооксидантів шляхом інгібування активації сигнальних шляхів TLR-3, TLR-7 та TLR-8.

Зниження реплікації вірусу грипу при профілактиці та лікуванні ОРН та ОРН-D-M у тканинах легенів мишей узгоджуються з раніше отриманими даними (181). Було виявлено, що результати відносної експресії генів вродженого імунітету узгоджуються з даними реплікації вірусу грипу у тканинах легенів. 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. Таким чином, складається враження, що олігорибонуклеотиди мають ефективнішу протизапальну дію порівняно з противірусною.

Пригнічення гіперекспресії рівнів мРНК деяких генів вродженого імунітету у відповідь на вірус грипу було суттєвішим за умови профілактики ОРН та ОРН-D-M інфекції вірусу грипу порівняно до лікування. Така сама тенденція спостерігалася при дослідженні титру вірусу грипу, таким чином показано, що профілактичне введення досліджуваних препаратів призводить до кращої ерадикації вірусу грипу та нормалізує вроджений імунітет хазяїна. Однак не було виявлено збільшення експресії мРНК *Tlr3*, *Tlr7*, *Tlr8* на більш високому рівні при зниженні вірусного навантаження (229), вказуючи на інгібуючий вплив ОРН та ОРН-D-M на TLR-3, TLR-7 та TLR-8. Також не було виявлено достовірної різниці між інгібуючим впливом ОРН та ОРН-D-M на профілі експресії генів вродженого імунітету за умов грипу. Отримані дані дозволяють нам припустити, що природні ОРН зв'язуються до TLR-3, TLR-7 та TLR-8 і таким чином модулюють вроджену імунну відповідь на вірус грипу.

Підсумком дисертаційної роботи є запропонована гіпотетична модель впливу олігорибонуклеотидів (ОРН та ОРН-D-M) на інфекційність вірусу грипу та TLR-асоційовану імунну відповідь на вірус грипу (рис. 4.1). Ми вважаємо, що серед природних олігорибонуклеотидів є послідовності, які зв'язуються з

НА і змінюють його конформацію та активність, що призводить до зниження інфекційності вірусу грипу, а також послідовності, які зв'язуються з Toll-подібними рецепторами ослаблюючи надмірну вроджену імунну відповідь. Ми також припускаємо, що різні послідовності забезпечують ОРН широким спектром біологічних дій (172-176).

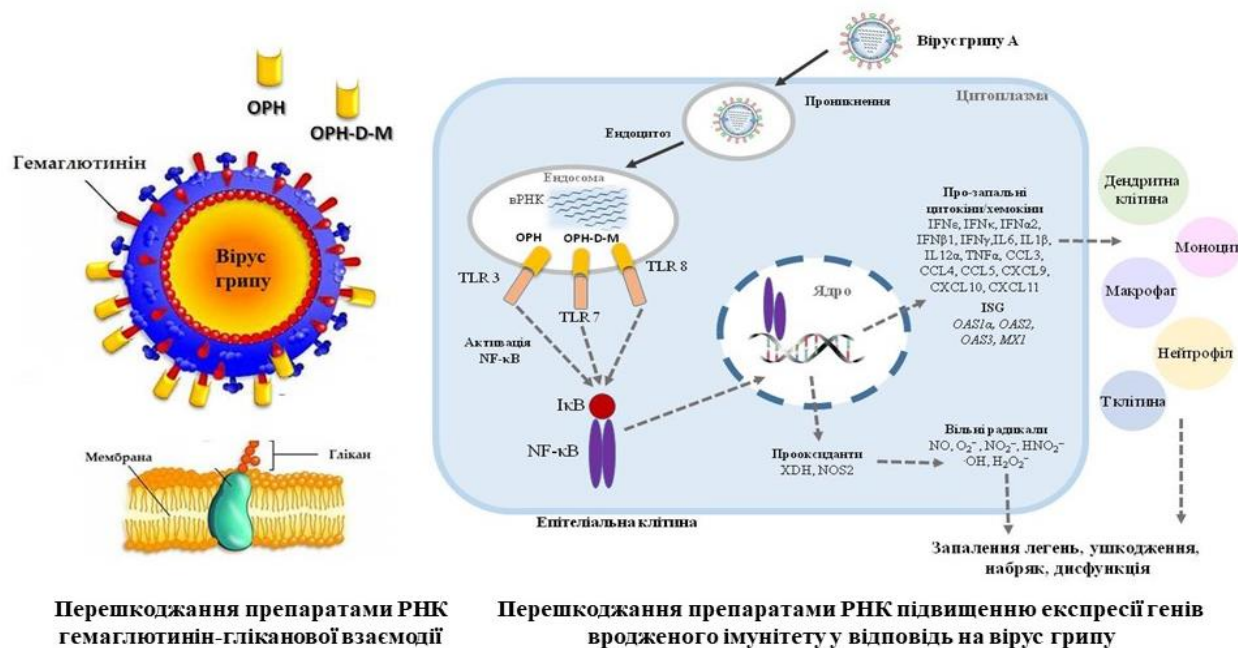


Рис.4.1. Гіпотетична модель модуляції вродженої імунної відповіді на вірус грипу та інгібування інфекційності вірусу грипу препаратами РНК

Результати досліджень представлених у даній роботі значно розширюють уявлення про механізми дії природних ОРН проти вірусу грипу. Взаємодія терапевтичних ОРН з Toll-подібними рецепторами та модуляція вродженої імунної відповіді розкриває також розуміння нормалізації компонентів вродженого імунітету (наприклад цитокіновий профіль) при гострому токсичному ураженні печінки, цукровому діабеті II типу, ВІЛ інфекції, гострому інфаркті міокарда. Крім того наші дослідження вказують, що природні ОРН являються ефективним протигрипозним препаратом виступаючи інгібітором НА та одночасно нормалізують імуннопатологічні наслідки грипу володіючи протизапальною дією.

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 Іг ТЦД₅₀ 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*, *Nfkbia*, *Ifn ϵ* , *Ifnk*, *Ifna2*, *Ifnb1*, *Ifn γ* , *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*, *Nfkbia*, *Ifn ϵ* , *Ifnk*, *Ifna2*, *Ifnb1*, *Ifn γ* , *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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Nakatsu S, Murakami S, Shindo K, Horimoto T, Sagara H, Noda T, Kawaoka Y. Influenza C and D Viruses Package Eight Organized Ribonucleoprotein Complexes. *J Virology*. 2018 March, 92 (6): e02084–17.
2. МОЗ України. Оперативна інформація щодо грипу та ГРВІ. [Електронний ресурс]. 2019. Режим доступу: <http://moz.gov.ua/article/news/pokazniki-zahvorjuvanosti-na-grip-ta-grvi-v-ukraini-zmeshilisja>.
3. Shrestha SS, Swerdlow DL, Borse RH, et al. Estimating the burden of 2009 pandemic influenza A (H1N1) in the United States (April 2009–April 2010). *Clin Infect Dis*. 2011; 52(1):75–82.
4. WHO: Flu news Europe. [Electronic Resource]. 2019. Accessmode: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/communicable-diseases/influenza/influenza>.
5. Taubenberger JK, Morens DM. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerging Infectious Diseases*. January 2006; 12(1):15–22.
6. Rossman JS, Lamb RA. Influenza virus assembly and budding. *Virology*. 2011; 411: 229–236.
7. Maines TR, Jayaraman A, Belser JA, et al. Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses in ferrets and mice. *Science*. 2009; 325:484–487.
8. Kobasa D, Takada A, Shinya K, et al. Enhanced virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus. *Nature*. 2004; 431:703–707.
9. Uhlenhorff J, Matrosovich T, Klenk HD, et al. Functional significance of the hemadsorption activity of influenza virus neuraminidase and its alteration in pandemic viruses. *Arch Virol*. 2009; 154: 945–957.

10. Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*. 2009; 325:197–201.
11. Gopinath SCB, Kumar PKR. Aptamers that bind to the hemagglutinin of the recent pandemic influenza virus H1N1 and efficiently inhibit agglutination. *Acta Biomater*. 2013;9:8932–8941.
12. Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathogens*. October 2013; 9(10): e1003657.
13. Shen X, Zhang X, Liu S. Novel hemagglutinin-based influenza virus inhibitors. *J Thoracic Disease*. 2013 August; 5 (2). 149–159.
14. Brooks GF, Butel JS, Morse SA, J Melnick & Adelberg's Medical Microbiology, 22nd ed. The McGraw-Hill Companies New York, NY, USA. 2004; Available from:PMID:3074881.
15. Москалюк ВД, Сидорчук АС. Діагностика та лікування грипу:сучасні клініко-патогенетичні аспекти. *Інфекційні хвороби*. 2016; 2(84): 1–14.
16. Shinya K, Ebina M, Yamada S, et al. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature*. 2006; 440:435–436.
17. van Riel D, den Bakker MA, Leijten LM, et al. Seasonal and pandemic human influenza viruses attach better to human upper respiratory tract epithelium than avian influenza viruses. *Am J Pathol*. 2010; 176:1614–1618.
18. Herold S, Becker C, Ridge KM, Scott Budinger GR. Influenza virus-induced lung injury: pathogenesis and implications for treatment. *European Respiratory Journal*. 2015; 45:1463–1478.
19. Rust MJ, Lakadamyali M, Zhang F, et al. Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nat Struct Mol Biol*. 2004; 11: 567–573.
20. Pinto LH, Lamb RA. The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *J Biol Chem*. 2006; 281: 8997–9000.

21. De Clercq E. Antiviral agents active against influenza A viruses. *Nat Rev Drug Discov.* 2006; 5:1015–1025.
22. Beigel J, Bray M. Current and future antiviral therapy of severe seasonal and avian influenza. *Antivir Res.* 2008; 78:91–102.
23. Bright RA, Shay DK, Shu B, Cox NJ, Klimov AI. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005–2006 influenza season in the United States. *JAMA.* 2006; 295:891–894.
24. Moscona A. Global transmission of oseltamivir-resistant influenza. *N Engl J Med.* 2009; 360:953–956.
25. Sheu TG. Dual resistance to adamantanes and oseltamivir among seasonal influenza A (H1N1) viruses: 2008–2010. *J Infect Dis.* 2011; 203:13–17.
26. Russell RJ, Kerry PS, Stevens DJ, Steinhauer DA, Martin SR, Gamblin SJ, Skehel JJ. Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2008 November; 105(46): 17736–41.
27. Stevens J, Blixt O, Tumpey TM, Taubenberger JK, Paulson JC, Wilson IA. Structure and Receptor Specificity of the Hemagglutinin from an H5N1 Influenza Virus. *Science.* 2006 Apr 21; 312 (5772):404–410.
28. Beigel JH, Farrar J, Han AM, Hayden FG, Hyer R, de Jong MD, Lochindarat S, Nguyen TK, Nguyen TH, Tran TH, Nicoll A, Touch S, Yuen KY. Avian influenza A (H5N1) infection in humans. *N Eng J Med.* 2005; 353:1374.
29. Mammen M, Choi SK, Whitesides GM. Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors. *Angew Chem Int Ed Engl.* 1998 Nov 2; 37(20):2754–2794.
30. Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem.* 2000; 69:531–69.
31. Peper RL, van Campen H. Tumor necrosis factor as a mediator of inflammation in influenza A viral pneumonia. *Microb Pathog.* 1995; 19:175–183.
32. Biron CA. Initial and innate responses to viral infections –pattern setting in immunity or disease. *Curr Opin Microbiol.* 1999; 2:374–381.

33. Jones SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol*. 2005; 175:3463–3468.
34. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124:783–801.
35. Schoggins JW. Interferon-stimulated genes: roles in viral pathogenesis. *Curr Opin Virol*. 2014;6:40–46.
36. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol*. 2014; 32:513–545.
37. Wang J, Nikrad MP, Travanty EA, et al. Innate immune response of human alveolar macrophages during influenza A infection. *PLoS One*. 2012; 7: e29879.
38. Kumagai Y, Takeuchi O, Kato H, et al. Alveolar macrophages are the primary interferon-alpha producer in pulmonary infection with RNA viruses. *Immunity*. 2007; 27:240–252.
39. Hillaire ML, Haagsman HP, Osterhaus AD, et al. Pulmonary surfactant protein D in first-line innate defence against influenza A virus infections. *J Innate Immun*. 2013; 5:197–208.
40. Hashimoto Y, Moki T, Takizawa T, et al. Evidence for phagocytosis of influenza virus-infected, apoptotic cells by neutrophils and macrophages in mice. *J Immunol*. 2007; 178:2448–2457.
41. GeurtsvanKessel CH, Willart MA, van Rijt LS, et al. Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin+CD11b- but not plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med*. 2008; 205: 1621–1634.
42. Kim TS, Braciale TJ. Respiratory dendritic cell subsets differ in their capacity to support the induction of virus-specific cytotoxic CD8+ T cell responses. *PLoS One*. 2009; 4: e4204.
43. Herold S, Becker C, Ridge KM, Budinger GR. Influenza virus-induced lung injury: pathogenesis and implications for treatment. *Eur Respir J*. 2015 May;45(5):1463–78.

44. Gazit R, Gruda R, Elboim M, Arnon TI, Katz G, Achdout H, Hanna J, Qimron U, Landau G, Greenbaum E, Zakay-Rones Z, Porgador A, Mandelboim O. Lethal influenza infection in the absence of the natural killer cell receptor gene *Ncr1*. *Nat Immunol*. 2006 May; 7(5):517–523.
45. O’Neill LA. TLRs: Professor Mechnikov, sit on your hat. *Trends Immunol*. 2004; 25:687–693.
46. Kawai T, Akira S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity*. 2011; 34:637–650.
47. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001; 413:732–738.
48. Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, Hirai R, Kawai T, Matsushita, K, Hiiragi A, Dermody TS, Fujita T, Akira S. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J. Exp. Med*. 2008; 205:1601–1610.
49. Le Goffic R, Balloy V, Lagranderie M, Alexopoulou L, Escriou N, Flavell R, Chignard M, Si-Tahar M. Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR)3 to influenza A virus-induced acute pneumonia. *PLoS Pathog*. 2006; 2:e53. Available from: doi:10.1371/journal.ppat.0020053.
50. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*. 2004; 303:1529–1531.
51. Pang IK, Iwasaki A. Control of antiviral immunity by pattern recognition and the microbiome. *Immunol. Rev*. 2012, 245, 209–226.
52. Lee NLS, Wong CK, Hui DSC, Chan PKS. Role of toll-like receptors in naturally occurring influenza virus infection. *Hong Kong Med J*. 2014; 20(6):11-15.

53. Arankalle VA, Lole KS, Arya RP, et al. Role of host immune response and viral load in the differential outcome of pandemic H1N1 (2009) influenza virus infection in Indian patients. *PLoS One*. 2010;5:e13099.
54. Julkunen I, Sareneva T, Pirhonen J, Ronni T, Melén K, Matikainen S. Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2001; 12:171–180.
55. Bonizzi G, Karin M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*. 2004; 25:280–288.
56. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF- κ B. *Genes Dev*. 2004;18:2195–2224.
57. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:621–663.
58. Kumar N, Xin Z, Liang Y, Ly H, Liang Y. NF- κ B Signaling Differentially Regulates Influenza Virus RNA Synthesis. *Journal of virology*. 2008 Oct; 82(20): 9880–9889.
59. Julkunen I, Mele'n K, Nyqvist M, Pirhonen J, Sareneva T, Matikainen S. Inflammatory responses in influenza A virus infection. *Vaccine*. 2000; 19:32–37.
60. Garoufalidis E, Kwan I, Lin R, Mustafa A, Pepin N, Roulston A, Lacoste J, Hiscott J. Viral induction of the human beta interferon promoter: modulation of transcription by NF- κ B/rel proteins and interferon regulatory factors. *J Virol*. 1994; 68:4707–4715.
61. Zou W, Chen D, Xiong M, Zhu J, Lin X, Wang L, Zhang J, Chen L, Zhang H, Chen H, et al. Insights into the increasing virulence of the swine-origin pandemic H1N1/2009 influenza virus. *Sci Rep*. 2013; 3:1601.
62. Hayden MS, West AP, Ghosh S. NF- κ B and the immuneresponse. *Oncogene*. 2006; 25:6758–6780.
63. Maniatis T, Falvo JV., Kim TH, Kim TK, Lin CH, Parekh BS, Wathelet MG. Structure and function of the interferon-beta enhanceosome. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*. 1998; 63:609–620.

64. Hiscott J, Nguyen TL, Arguello M, Nakhaei P, Paz S. Manipulation of the nuclear factor- κ B pathway and the innate immune response by viruses. *Oncogene*. 2006; 25:6844–6867.
65. Nimmerjahn F, Dudziak D, Dirmeier U, Hobom G, Riedel A, Schlee M, Staudt LM, Rosenwald A, Behrends U, Bornkamm GW, Mautner J. Active NF- κ B signalling is a prerequisite for influenza virus infection. *J Gen Virol*. 2004; 85:2347–2356.
66. Garcia-Sastre A, Egorov A, Matassov D, Brandt S, Levy DE, Durbin JE, Palese P, Muster T. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology*. 1998; 252:324–330.
67. Flory E, et al. Influenza virus-induced NF- κ B-dependent gene expression is mediated by overexpression of viral proteins and involves oxidative radicals and activation of I κ B kinase. *J Biol Chem*. 2000; 275:8307–8314.
68. Pahl HL, Baeuerle PA. Expression of influenza virus hemagglutinin activates transcription factor NF- κ B. *J Virol*. 1995;69:1480–1484.
69. Baskin CR, Bielefeldt-Ohmann H, Tumpey TM, Sabourin PJ, Long JP, Garcia-Sastre A, Tolnay AE, Albrecht R, Pyles JA, Olson PH, Aicher LD, Rosenzweig ER, Murali-Krishna K, Clark EA, Kotur MS, Fornek JL, Proll S, Palermo RE, Sabourin CL, Katze MG. Early and sustained innate immune response defines pathology and death in nonhuman primates infected by highly pathogenic influenza virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106(9):3455–3460.
70. Betáková T, Kostrábová A, Lachová V, Turianová L. Cytokines Induced During Influenza Virus Infection. *Current Pharmaceutical Design*. 2017; 23:1–7.
71. Diaz MO, Bohlander S, Allen G. Nomenclature of the human interferon genes. *J Interferon Cytokine Res*. 1996;16:179–180.
72. Young HA. Regulation of interferon- γ gene expression. *J Interferon Cytokine Res*. 1996; 16:563–568.
73. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*. 1998; 67:227–264.

74. Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE. Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem.* 1987; 56:317–332.
75. Samuel CE. Mechanisms of the Antiviral Actions of IFN. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1988; 35:27–72.
76. Hertzog PJ, Hwang SY, Kola I. Role of interferons in the regulation of cell proliferation, differentiation, and development. *Mol Reprod Dev.* 1994; 39:226–232.
77. Ioannidis I, Ye F, McNally B, Willette M, Flano E. Toll-like receptor expression and induction of type I and type III interferons in primary airway epithelial cells. *J. Virol.* 2013; 87(6):3261–3270.
78. Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev.* 2004; 202:8–32.
79. Reis LF, Ho LT, Vilcek J: Tumor necrosis factor acts synergistically with autocrine interferon-beta and increases interferon-beta mRNA levels in human fibroblasts. *J Biol Chem.* 1989; 264:16351–16354.
80. Cheung CY, Poon LL, Lau AS, Luk W, Lau YL, Shortridge KF, Gordon S, Guan Y, Peiris JS. Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease. *Lancet.* 2002; 360(9348):1831–1837.
81. Barchet W, Cella M, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells-virus experts of innate immunity. *Semin Immunol.* 2005;17:253–261.
82. Pesch V, Lanaya H, Renauld JC, Michiels T. Characterization of the murine alpha interferon gene family. *J Virol.* 2004; 78:8219–8228.
83. Erlandsson L, Blumenthal R, Eloranta ML, Engel H, Alm G, Weiss S, Leanderson T. Interferon-beta is required for interferon-alpha production in mouse fibroblasts. *Curr Biol.* 1998; 8:223–226.
84. Marie I, Durbin JE, Levy DE. Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J.* 1998;17:6660–6669.

85. Xing Z, Harper R, Anunciacion J, Yang Z, Gao W, Qu B, Guan Y, Cardona C.J. Host immune and apoptotic responses to avian influenza virus H9N2 in human tracheobronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011; 44:24–33.
86. Chan MC, Cheung CY, Chui WH, Tsao SW, Nicholls JM, Chan YO, Chan RW, Long HT, Poon LL, Guan Y, et al. Proinflammatory cytokine responses induced by influenza A (H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells. *Respir Res.* 2005; 6:135.
87. Patel RC, Sen GC. PACT, a protein activator of the interferon-induced protein kinase, PKR. *EMBO J.* 1998; 17:4379–4390.
88. Kumar A, Haque J, Lacoste J, Hiscott J, Williams BR. Double-stranded RNA-dependent protein kinase activates transcription factor NF-kappa B by phosphorylating I kappa B. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91:6288–6292.
89. Schulz O, Pichlmair A, Rehwinkel J, Rogers NC, Scheuner D, Kato H, Takeuchi O, Akira S, Kaufman RJ, Reis e Sousa C. Protein kinase R contributes to immunity against specific viruses by regulating interferon mRNA integrity. *Cell Host Microbe.* 2010; 7:354–361.
90. Staeheli P, Haller O, Boll W, Lindenmann J, Weissmann C. Mx protein: Constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus. *Cell.* 1986; 44:147–158.
91. Krug RM, Shaw M, Broni B, Shapiro G, Haller O. Inhibition of influenza viral mRNA synthesis in cells expressing the interferon-induced Mx gene product. *J Virol.* 1985; 56:201–206.
92. Haller O, Arnheiter H, Pavlovic J, Staeheli P. The Discovery of the Antiviral Resistance Gene Mx: A Story of Great Ideas, Great Failures, and Some Success. *Annu. Rev. Virol.* 2018; 5:33–51.
93. Villalon-Letelier F, Brooks AG, Saunders PM, Londrigan SL, Reading PC. Host cell restriction factors that limit influenza A infection. *Viruses.* 2017; 9:376.

94. Pavlovic J, Haller O, Staeheli P. Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle. *J Virol.* 1992; 66: 2564–2569.
95. Zimmermann P, Manz B, Haller O, Schwemmle M, Kochs G. The viral nucleoprotein determines Mx sensitivity of influenza A viruses. *J Virol.* 2011; 85:8133–8140.
96. Silverman RH. Viral Encounters with 2',5'-Oligoadenylate Synthetase and RNase L during the Interferon Antiviral Response. *J Virology.* 2007 Dec; 81(23):12720–12729.
97. Hovanessian AG, Justesen J. The human 2–5oligoadenylate synthetase family: unique interferon-inducible enzymes catalyzing 2–5 instead of 3–5 phosphodiester bond formation. *Biochimie.* 2007; 89:779–788.
98. Kakuta S, Shibata S, Iwakura Y. Genomic structure of the mouse 2,5-oligoadenylate synthetase gene family. *J Interferon Cytokine Res.* 2002; 22:981–993.
99. Rebouillat D, Marie I, Hovanessian AG. Molecular cloning and characterization of two related and interferon-induced 56-kDa and 30-kDa proteins highly similar to 29-59 oligoadenylate synthetase. *Eur J Biochem.* 2002; 257:319–330.
100. Zhou A, Hassel BA, Silverman RH. Expression cloning of 2-5A-dependent RNAase: a uniquely regulated mediator of interferon action. *Cell.* 1993; 72:753–765.
101. Malathi K, Dong B, Gale M, Silverman RH. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature.* 2007; 448:816–819.
102. DeCarlo CA, Severini A, Edler L, Escott NG, Lambert PF, Ulanova M, Zehbe I. IFN-kappa, a novel type I IFN, is undetectable in HPV-positive human cervical keratinocytes. *Lab Invest.* 2010; 90:1482–1491.
103. La Fleur DW, Nardelli B, Tsareva T, Mather D, Feng P, Semenuk M, Taylor K, Buergin M, Chincilla D, Roschke V, et al. Interferon- κ , a novel type I IFN expressed in human keratinocytes. *J Biol Chem.* 2001;276:39765.

104. Guo Y, Gao M, Bao J, Luo X, Liu Y, An D, Zhang H, Ma B, Wang J: Molecular cloning and characterization of a novel bovine IFN-epsilon. *Gene*. 2015;558:25–30
105. Yang L, Xu L, Li Y, Li J, Bi Y, Liu W: Molecular and functional characterization of canine interferon-epsilon. *J Interferon Cytokine Res*. 2013;33:760–768.
106. Peng FW, Duan ZJ, Zheng LS, Xie ZP, Gao HC, Zhang H, Li WP, Hou YD. Purification of recombinant human interferon-epsilon and oligonucleotide microarray analysis of interferon-epsilon-regulated genes. *Protein Expr Purif*. 2007;53:356–362.
107. Tasker C, Subbian S, Gao P, Couret J, Levine C, Ghanny S, Soteropoulos P, Zhao X, Landau N, Lu W, Chang TL. IFN-epsilon protects primary macrophages against HIV infection. *JCI Insight*. 2016;1:e88255.
108. Nardelli B, Zaritskaya L, Semenuk M, Cho YH, LaFleur DW, Shah D, Ullrich S, Girolomoni G, Albanesi C, Moore PA. Regulatory effect of IFN-kappa, a novel type I IFN, on cytokine production by cells of the innate immune system. *J Immunol*. 2002 Nov 1;169(9):4822–30.
109. Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:571–611.
110. Roff SR, Noon-Song EN, Yamamoto JK. The Significance of Interferon- γ in HIV-1 Pathogenesis, Therapy, and Prophylaxis. *Front Immunol*. 2014; 4: 498.
111. Gentile D, Doyle W, Whiteside T, Fireman P, Hyden FG, Skoner D. Increased Interleukin-6 Levels in Nasal Lavage Samples following Experimental Influenza A Virus Infection. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1998; 5:604–608.
112. Han SN, Meydani SN. Antioxidants, Cytokines, and Influenza Infection in Aged Mice and Elderly Humans. *J Infect Dis*. 2000; 182:74–80.
113. Strieter RM, Balperio JA, Keane MP. Cytokines in innate host defense in the lung. *J Clin Investig*. 2002;109:699–705.

114. Schmitz N, Kurrer M, Bachmann MF, Kopf M. Interleukin-1 is responsible for acute lung immunopathology but increases survival of respiratory influenza virus infection. *J Virol.* 2005; 79:6441–6448.
115. Seo SH, Webster RG. Tumor Necrosis Factor Alpha Exerts Powerful Anti-Influenza Virus Effects in Lung Epithelial Cells. *J Virol.* 2002; 76:1071–1076.
116. Neuzil KM, Graham BS. Cytokine release and innate immunity in respiratory viral infection. *Sem Virol.* 1996; 7:255–264.
117. Reeth K. Cytokines in the pathogenesis of influenza. *Vet Microbiol.* 2000; 74:109–116.
118. Kaiser L, Fritz RS, Straus SE, Gubareva L, Hayden FG. Symptom Pathogenesis During Acute Influenza: Interleukin-6 and Other Cytokine Responses. *J Med Virol.* 2001; 64:262–268.
119. Kaufmann A, Salentin R, Meyer RG, Bussfeld D, Pauligk C, Fesq H, Hofmann, P, Nain M, Gemsa D, Sprenger H. Defense against influenza A virus infection: essential role of the chemokine system. *Immunobiology.* 2001; 204:603–613.
120. Sprenger H, Meyer RG, Kaufmann A, Bussfeld D, Rischkowsky E, Gemsa D. Selective induction of monocyte and not neutrophil attracting chemokines after influenza A virus infection. *J Exp Med.* 1996; 184:1191–1196.
121. Matikainen S, Pirhonen J, Miettinen M, Lehtonen A, Govenius Vintola C, Sareneva T, Julkunen I. Influenza A and sendai viruses induce differential chemokine gene expression and transcription factor activation in human macrophages. *Virology.* 2000; 276:138–147.
122. Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, Rose-John S, et al. IL-6 and Its Soluble Receptor Orchestrate a Temporal Switch in the Pattern of Leukocyte Recruitment Seen during Acute Inflammation. *Immunity.* 2001; 14:705–714.
123. Akaike T. Role of free radicals in viral pathogenesis and mutation. *Rev Med Virol.* 2001; 11:87–101.

124. Perrone LA, Belser JA, Wadford DA, Katz JM, Tumpey TM. Inducible Nitric Oxide Contributes to Viral Pathogenesis Following Highly Pathogenic Influenza Virus Infection in Mice. *Infect Diseases*. 2013; 207:1576–1584.
125. Akaike T, Noguchi Y, Ijiri S, Setoguchi K, Suga M, Zheng YM, Dietzschold B, Maeda H. Pathogenesis of influenza virus-induced pneumonia: involvement of both nitric oxide and oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93:2448–2453.
126. Dawson TC, Beck MA, Kuziel WA, Henderson F, Maeda M. Contrasting effects of CCR5 and CCR2 deficiency in the pulmonary inflammatory response to influenza A virus. *Am J Pathol*. 2000; 156:1951–1959.
127. Akaike T, Ando M, Oda T, Doi T, Ijiri S, Araki S, Maeda H. Dependence on O₂ Generation by Xanthine Oxidase of Pathogenesis of Influenza Virus Infection in Mice. *J Clin Investig*. 1990; 85:739–745.
128. Kinnula VL, Adler KB, Ackley NJ, Crapo JD. Release of reactive oxygen species by guinea pig tracheal epithelial cells in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 1992; 262:708–712.
129. Ischiropoulos H, Zhu L, Beckman JS. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*. 1992; 298: 446–451.
130. Carreras MC, Pargament GA, Catz SD, Poderoso JJ, and Boveris A. Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils. *FEBS Lett*. 1994; 341:65–68.
131. Kobzik DS, Bredt DS, Lowenstein CJ, Drazin J, Gaston B, Sugarbaker D, Stamler JS. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1993; 9:371–377.
132. Cox GW, Melillo G, Chattopadhyay U, Mullet D, Fertel RH, Varesio L. Tumor necrosis factor- α -dependent production of reactive nitrogen intermediates mediates IFN- γ plus IL-2-induced murine macrophage tumoricidal activity. *J Immunol*. 1992 Nov 15;149(10):3290–3296.

133. Morris SM. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu Rev Nutr.* 2000; 22:87–105.
134. Moraes TJ. Arginase and Respiratory Viral Infections. *The Open Nitric Oxide Journal.* 2010; 2: 64–68.
135. Lucas R, Czikora I, Sridhar S, Zemskov EA, Oseghale A, Circo S. Arginase 1: An unexpected mediator of pulmonary capillary barrier dysfunction in models of acute lung injury. *Front Immunol.* 2013; 4:228.
136. Xu W, Kaneko FT, Zheng S, Comhair SA, Janocha AJ, Goggans T, Thunnissen FB, Farver C, Hazen SL, Jennings C, Dweik RA, Arroliga AC, Erzurum SC. Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension. *Faseb J.* 2004; 18: 1746–1748.
137. Zimmermann N, Mishra A, King NE, Fulkerson PC, Doepker MP, Nikolaidis NM, Kindinger LE, Moulton EA, Aronow BJ, Rothenberg M E. Transcript signatures in experimental asthma: identification of STAT6-dependent and -independent pathways. *J Immunol.* 2004; 172:1815–1824.
138. Zimmermann N, Rothenberg ME. The arginine-arginase balance in asthma and lung inflammation. *Eur. J Pharmacol.* 2006; 533:253–262.
139. Nikam SV, Nikam PS, Chandrashekar MR, Kalsad ST, Jnaneshwara KB. Role of lipid peroxidation, glutathione and antioxidant enzymes in H1N1 Influenza. *Biomed Res.* 2010; 21:457–560.
140. Wang C, Salahudeen AK. Lipid peroxidation accompanies cyclosporine nephrotoxicity: effects of vitamin E. *Kidney Int.* 1995 Mar; 47(3):927–34.
141. Petrone WF, English DK, Wong K, McCord JM. Free radicals and inflammation: superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1980 Feb; 77(2):1159–63.
142. Hortelano S, Alvarez AM, Bosca L. Nitric oxide induces tyrosine nitration and release of cytochrome c preceding an increase of mitochondrial transmembrane potential in macrophages. *FASEB J.* 1999; 13:2311-7.

143. Okamoto T, Akaike T, Nagano T, Miyajima S, Suga M, Ando M, Ichimori K, Maeda H. Activation of human neutrophil procollagenase by nitrogen dioxide and peroxyxynitrite: a novel mechanism of procollagenase activation involving nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*. 1997; 342:261–74.
144. Akaike T, Suga M, Maeda H. Free radicals in viral pathogenesis: molecular mechanisms involving superoxide and NO. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1998 Jan; 217(1):64–73.
145. Zhou R, Rana TM. RNA-based mechanisms regulating host-virus interactions. *Immunol Rev*. 2013 May; 253(1):97–111.
146. Shirota H, Tross D, Klinman D. CpG Oligonucleotides as Cancer Vaccine Adjuvants. *Vaccines*. 2015; 3:390–407.
147. Verma A. Recent Advances in Antisense Oligonucleotide Therapy in Genetic Neuromuscular Diseases. *Ann Indian Acad Neurol*. 2018 Jan-Mar; 21(1): 3–8.
148. Chang YC, Kao WC, Wang WY, Wang WY, Yang RB, Peck K. Identification and characterization of oligonucleotides that inhibit Toll-like receptor 2-associated immune responses. *FASEB*. 2009; 23:3078–3088.
149. Wang L, Liu X, Zhang Q, Zhang C, Liu Y, Tu K; Tu J. Selection of DNA aptamers that bind to four organophosphorus pesticides. *Biotechnol Lett*. 2012; 34:869–874.
150. Zhang C. Novel functions for small RNA molecules. *Curr Opin Mol Ther*. 2009 Dec; 11(6): 641–651.
151. Farazi TA, Juranek SA, Tuschl T. The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members. *Development*. 2008;135(7):1201–1214.
152. Brantl S. Antisense-RNA regulation and RNA interference. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1575; 15–25.
153. Sharp PA. RNA interference. *Genes Dev*. 2001; 200115:485–490.
154. Wang R, Zhao J, Jiang T, Kwon YM, Lu H, Jiao P, Liao M, Li Y. Selection and characterization of DNA aptamers for use in detection of avian influenza virus H5N1. *J Virol Methods*. 2013; 189: 362–369.

155. Levchenko SM, Rebriev AV, Tkachuk VV, Dubey LV, Dubey IY, Tkachuk ZY. Studies on the interaction of oligoadenylates with proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biopolym Cell*. 2013; 29:42–48.
156. Skorobogatov OY, Lozhko DN, Zhukov IY, Kozlov O, Tkachuk ZY. Study of dephosphorylated 2'-5'-linked oligoadenylates impact on apo-S100A1 protein conformation by heteronuclear NMR and circular dichroism. *Biopolym. Cell*. 2014; 30:279–285.
157. Skorobogatov OY, Kukharenko AP, Kozlov OV, Dubey IY, Tkachuk ZY. 2'-5'-Linked Triadenylates Act as Protein Kinase Activity Modulators. *J Proteom Bioinform*. 2017; 10(12):320–323.
158. Zhou J, Swiderski P, Li H, Zhang J, Neff CP, Akkina R, Rossi JJ. Selection, characterization and application of new RNA HIV gp 120 aptamers for facile delivery of Dicer substrate siRNAs into HIV infected cells. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37:3094–3109.
159. Feng H, Beck J, Nassal M, Hu KH. A SELEXscreened aptamer of human hepatitis B virus RNA encapsidation signal suppresses viral replication. *PLoS ONE*. 2011; 6:e27862.
160. Asami Y, Yoshioka K, Nishina K, Nagata T, Yokota T. Drug delivery system of therapeutic oligonucleotides. *Drug Discov Ther*. 2016;10(5):256-262.
161. Juliano RL, Ming X, Nakagawa O. Cellular uptake and intracellular trafficking of antisense and siRNA oligonucleotides. *Bioconjug Chem*. 2012; 23:147–157.
162. Tkachuk Z. Multiantivirus Compound, Composition and Method for Treatment of Virus Diseases. U.S. Patent 20,120,232,129, 16 April 2013.
163. 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; 10(2):59.
164. Tkachuk Z. Compound, composition and method for the treatment of inflammatory and inflammatory-related disorders. Patent PCT/US01/09590, 24.03.2000.

165. Вівчарик ММ, Ільченко ОО, Левченко СМ, Ткачук ЗЮ. Комплексоутворення РНК з манітолом, його спектральні характеристики та біологічна активність. Доп НАН України. 2016; 10:78–83.
166. Qian J, Chandler L, Bergles E. Characterization and Transformation Monitoring of Polymorphs of D-Mannitol with Raman Spectroscopy. Process monitoring with 1064nm Raman/ Copyright BaySpec, Inc. — San Jose. 2013.
167. Щодрий ВБ, Козлов ОВ, Рибенчук АО, Бойко ВВ, Бортницький ВІ, Рябов СВ, Ткачук ЗЮ. Дослідження продуктів взаємодії РНК з манітолом методом піролітичної мас-спектрометрії. Допов Нац акад наук Укр. 2017; 2:79–87.
168. Vivcharyk MM, Iakhnenko MS, Levchenko SM, Chernykh SI, Tkachuk ZY. Conformational changes of Interferon under the influence of oligoribonucleotides and their derivative. Materials of X Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine 26-27 May 2015. 2016; 32(5) :405.
169. Tkachuk ZYu, Tkachuk VV, Tkachuk LV. The study on membrane-stabilizing and anti-inflammatory actions of yeast RNA in vivo and in vitro. Biopolymers and cell. 2006; 22(3):109-116.
170. Хунов ЮА, Зельоний ІІ, Павлов СВ, Мелещенко АВ. Вплив комбінації Нуклексу та Атоксілу на показники цитокінового профілю крові у хворих з гнійно-запальними захворюваннями на тлі цукрового діабету. Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічна імунологія. 2014; 3(123):75–82.
171. Зельоний ІІ, Ткачук ЗЮ, Афонін ДМ, Тютюнник ОА. Вплив препарату Нуклекс на цитокіновий профіль хворих на цукровий діабет 2 типу з нейропатичною формою синдрому діабетичної стопи. Журнал НАМН України. 2014; 20(2):240–245.
172. Нещерет ОП, Ткачук ЗЮ, Мойбенко ОО. Вплив рибонуклеїнової кислоти на кровообіг та його адренергічну і холінергічну регуляцію. Фізіол журн, 2009; 55(6) 20–29.

173. Ткачук ЗЮ, Чайка ЛА, Либина ВВ. Экспериментальное исследование кардиопротективной активности рибонуклеиновой кислоты при катехоламиновом инфаркте миокарда. Вісн фармації та фармакології. 2009; 3:14–18.
174. Shmarakov IO, Marchyshak TV, Borschovetska VL, Marchenko MM, Tkachuk ZYu. Hepatoprotective activity of exogenous RNA. Ukr Biochem J. 2015; 87(4):37–44.
175. Marchyshak T, Yakovenko T, Shmarakov I, Tkachuk Z. The Potential Protective Effect of Oligoribonucleotides-d-Mannitol Complexes against Thioacetamide-Induced Hepatotoxicity in Mice. Pharmaceuticals. 2018; 11(3): 77.
176. Ткачук ЗЮ, Яковенко ТГ. Вплив препаратів дріжджової РНК на проліферацію стовбурових клітин кісткового мозку мишей при сингенній трансплантації. Доп НАН України. 2006; 12:161–166.
177. Frolov VM, Sotskaya YA, Kruglova OV, Tkachuk ZY. Estimation of Nuclex Effectivity at the Treatment of the Patients with Chronic Viral Hepatitis C. Ukr Med Alm. 2012; 15:157–164.
178. Tkachuk Z. Antiherpetic drug Nuclex effect. Rep Natl Acad Sci Ukr. 2011; 4:182–188.
179. Naumenko K, Melnichuk N, Golovan A. The impact of the drug based on ribonucleic acid relative to Epstein-barr virus. Abstracts of 8th International conference bioresources and viruses, 12-14 th September 2016, Kyiv, Ukraine. 2016; 47–48.
180. Dykyi BM, Hryzhak IH, Tkachuk ZY, Ostiak RS, Vaskul NV. Viral-immunological and haematological effects of nuclex in patients with HIV-infection. Infection Disease. 2011; 66:31–34.
181. Ткачук ЗЮ, Рибалко СЛ, Жаркова ЛД, Старосила ДБ, Семернікова ЛІ. Антигрипозна активність препарату нуклекс. Допов Нац акад наук Укр. 2010; 9:191–196.

182. Грижак ІГ, Дикий БМ, Пришляк ОЯ, Остяк РС, Ткачук ЗЮ. Покращення показників імунітету у віл-інфікованих осіб з хронічною токсоплазмозною інвазією та недостатньою імунореконституцією на тлі антиретровірусної терапії за допомогою препарату рибонуклеїнової кислоти. *Scientific Journal «ScienceRise: Medical Science»*. 2017; 3(11) 4–9.
183. Андрейчин МА, Ткачук ЗЮ, Йосик ЯІ. Ефективність Нуклексу при гострих респіраторних вірусних інфекціях. “Журнал НАМН України”. 2013; 19(1):100–103.
184. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg*. 1938; 27:493–497.
185. Favicchio R, Dragan AI, Kneale GG, Read CM. Fluorescence spectroscopy and anisotropy in the analysis of DNA-protein interactions. *DNA-Protein Interactions*. Springer. 2009; 543:589–611.
186. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації. – Київ, 2001. – С. 371–396.
187. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997 Sep 1;25(17):3389–402.
188. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods*. 2001; 25:402–408.
189. Kozera B, Rapacz M. Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet*. 2013 Nov; 54(4):391–406.
190. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248–54.
191. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 5259:680–5.
192. Schmidt G, Amiraian K, Frey H, Stevens RW, Berns DS. Densitometric analysis of Western blot (immunoblot) assays for human immunodeficiency

- virus antibodies and correlation with clinical status. *J Clin Microbiol.* 1987; 25: 1993–1998.
193. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265–275.
194. Asakawa T, Matsushita S. Thiobarbituric acid test for detecting lipid peroxides. *Lipids.* 1980; 14:401–406.
195. Goni1 R, García1 P, Foissac1 S. The qPCR data statistical analysis. *Integromics White Paper.* 2009; 1–9.
196. Takizawa T, Matsukawa S, Higuchi Y, Nakamura S, Nakanishi Y, Fukuda R. Induction of programmed cell death (apoptosis) by influenza virus infection in tissue culture cells. *J Gen Virol.* 1993; 74: 2347–2355.
197. Tran AT, Cortens JP, Du Q, Wilkins JA, Coombs KM. Influenza virus induces apoptosis via BAD-mediated mitochondrial dysregulation. *J Virol.* 2013; 87:1049–1060.
198. 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.
199. Мельнічук Н., Ткачук З. Інгібування гемаглютенін-гліканової взаємодії комплексами олігорибонуклеотидів з D-манітолом // *Допов. Нац. Акад. Наук Укр.* – 2018. – № 1. – С. 92-99.
200. Killian ML. Hemagglutination assay for the avian influenza virus. *Methods Mol Biol.* 2008; 436: 47–52.
201. Wani TA, Bakheit AH, Ansari MN, Al-Majed ARA, Al-Qahtani BM, Zargar S. Spectroscopic and molecular modeling studies of binding interaction between bovine serum albumin and roflumilast. *Drug Design, Development and Therapy.* 2018; 12:2627–2634.
202. Bortolotti A, Wong YH, Korsholm SS, Bahring NHB, Bobone S, Tayyab S, Weert M, Stella L. On the purported “backbone fluorescence” in protein three-dimensional fluorescence spectra. *RSC Adv.* 2016; 6:112870–112876.

203. Anhlan D, Grundmann N, Makalowski W, Ludwig S, Scholtissek C. Origin of the 1918 pandemic H1N1 influenza A virus as studied by codon usage patterns and phylogenetic analysis. *RNA*. 2011;17(1):64–73.
204. Lai S, Qin Y, Cowling BJ, et al. Global epidemiology of avian influenza A H5N1 virus infection in humans, 1997-2015: a systematic review of individual case data. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(7):e108–18.
205. Bouvier NM, Lowen AC. Animal Models for Influenza Virus Pathogenesis and Transmission. *Viruses*. 2010 Aug; 2(8): 1530–1563.
206. Kumar P, Sharma S, Khanna M, Raj HG. Effect of Quercetin on lipid peroxidation and changes in lung morphology in experimental influenza virus infection. *Int J Exp Pathol*. 2003; 84(3):127-133.
207. 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.
208. 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.
209. Tkachuk Z. Method of Protecting Erythricytes, in Particular for Improvement of Blood Cytopenia. U.S. Patent 6,737,271, 26 April 2001.
210. de Sousa Abreu, R., Penalva, L. O., Marcotte, E. M. & Vogel, C. Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol. Biosyst.* 2009; 5, 1512–1526.
211. Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet*. 2012;13(4):227-232.
212. Turianová L, Lachová V, Svetlíkova D, Kostrábová A, Betáková T. Comparison of cytokine profiles induced by nonlethal and lethal doses of influenza A virus in mice. *Exp Ther Med*. 2019;18(6):4397-4405.
213. Salzberg S. The contents of the syringe. *Nature*. 2008; 454:160–161.

214. Davlin SL. Influenza activity—United States, 2015–2016 season and composition of the 2016–2017 influenza vaccine. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2016; 65: 567–575.
215. Hensley SE. Challenges of selecting seasonal influenza vaccine strains for humans with diverse pre-exposure histories. *Curr Opin Virol.* 2014; 8:85–89.
216. Houser K, Subbarao K. Influenza vaccines: Challenges and solutions. *Cell Host Microbe.* 2015; 17:295–300.
217. Bright RA, Shay DK, Shu B, Cox NJ, Klimov AI. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005–2006 influenza season in the United States. *JAMA.* 2006; 295:891–894.
218. Matthew P, Hall RJ, Sonnberg S. Pandemic (H1N1) 2009 and Seasonal Influenza A (H1N1) Co-infection, New Zealand, 2009. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16:1618–1620.
219. Chertow DS, Memoli MJ. Bacterial coinfection in Influenza A. *JAMA.* 2013; 309:275–282.
220. Chen J, Duan M, Zhao Y, Ling F, Xiao K, Li Q, Li B, Lu C, Qi W, Zeng Z. Saikosaponin a inhibits influenza a virus replication and lung immunopathology. *Oncotarget.* 2015; 6:42541–42556.
221. Herold S, Steinmueller M, vonWulffen W, Cakarova L, Pinto R, Pleschka S, Mack M, Kuziel WA, Corazza N, Brunner T, et al. Lung epithelial apoptosis in influenza virus pneumonia: The role of macrophage-expressed tnf-related apoptosis-inducing ligand. *J Exp Med.* 2008; 205:3065–3077.
222. Ramos I, Fernandez-Sesma A. Modulating the innate immune response to influenza a virus: Potential therapeutic use of anti-inflammatory drugs. *Front Immunol.* 2015; 6:361.
223. Sweet C, Smith H. Pathogenicity of influenza virus. *Microbiological Reviews.* 1980; 44, 303–330.
224. Wongphatcharachai M, Wang P, Enomoto S, Webby RJ, Gramer MR. Neutralizing DNA aptamers against swine influenza H3N2 viruses. *J Clin Microbiol.* 2013; 51:46–54.

225. Lamb RA. The influenza virus RNA segments and their encoded proteins. In “Genetics of Influenza Viruses” (P. Palese and D. W. Kingsbury, eds.) Springer-Verlag. 1983. 21–69.
226. Walsh JJ, Dietlein LF, Low FN, Burch GE, Mogabgab WJ. Bronchotracheal Response in Human Influenza. *Arch Intern Med.* 1961;108(3):376–388.
227. Haller O, Staeheli P, Kochs G. Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie.* 2007 Jun-Jul; 89(6-7):812–8.
228. Verhelst J, Parthoens E, Schepens B, Fiers W, Saelens X. Interferon-Inducible Protein Mx1 Inhibits Influenza Virus by Interfering with Functional Viral Ribonucleoprotein Complex Assembly. *Journal of Virology.* 2012; 86(24):13445–13455.
229. Lee N, Wong C, Hui D, Chan P. Role of toll-like receptors in naturally occurring influenza virus infection. *Hong Kong Med J.* 2014; 20:11–15.

ДОДАТОК А

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ ОПУБЛІКОВАНИХ 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.
2. **Мельнічук Н., Ткачук З.** Інгібування гемаглютенін-гліканової взаємодії комплексами олігорибонуклеотидів з D-манітолом // *Допов. Нац. Акад. Наук Укр.* – 2018. – № 1. – С. 92-99.
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.
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.
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.
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, xdh, nfkb1a, nfkb1 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, xdh, nfkb1a, nfkb1 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.

ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ

1. Міжнародна конференція молодих вчених «CYS Conference for young scientists», Київ, 2015;
2. Міжнародна конференція «The 8th International conference bioresources and viruses», Київ, 2016;

3. Електронна конференція «The 2nd International Electronic Conference on Medicinal Chemistry» Online, 2016;
4. Міжнародна конференція молодих вчених «X Parnas Conference Young Scientist Forum „Molecules in the Living Cell and Innovative Medicine”», Вроцлав, Польща, 2016;
5. Наукова конференція молодих вчених «V Науково-практична конференція школи молодих науковців ПАТ «Фармак»», Київ, 2017;
6. Міжнародна конференція «The 7th International Weigl Conference», Львів, 2017;
7. Електронна конференція «The 3rd International Electronic Conference on Medicinal Chemistry» Online, 2017;
8. Міжнародна конференція молодих вчених «XI Parnas Conference», Київ, 2018;
9. Наукова конференція молодих вчених «VI науково-практична конференції школи молодих науковців ПАТ «Фармак»». Київ, 2018;
10. Наукова конференція «XII український біохімічний конгрес». Тернопіль, 2019.

ДОДАТОК Б

ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНЕ РОЗДІЛЕННЯ НА У
ПОЛІАКРИЛАМІДНОМУ ГЕЛІ

Для того щоб перевірити молекулярну вагу та чистоту НА було проведено аналіз НА з використанням електрофорезу в 10 % поліакриламідному гелі у денатуруючих умовах з додаванням SDS за стандартним методом Лемлі.

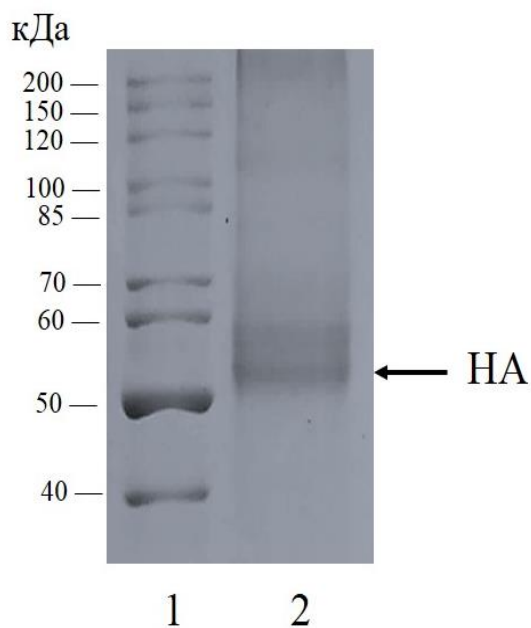


Рис. 1Б. Зображення гелю після електрофоретичного розділення білка НА: 1– суміш маркерних білків «PageRuler Unstained Protein Ladder»; 2 – білок НА «Ваксигрип»