

На правах рукописи

ПЛОТНИКОВА

Марина Александровна

**МУЛЬТИПЛЕКСНЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИРУС-
ИНДУЦИРОВАННОЙ ЭКСПРЕССИИ ЦИТОКИНОВ НА ОСНОВЕ
МИКРОЧИПОВ И ПЦР**

Специальность 03.02.02 – Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт гриппа» Министерства здравоохранения Российской Федерации в лаборатории структурной и функциональной протеомики

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, заведующий лабораторией структурной и функциональной протеомики ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России
Васин Андрей Владимирович

Официальные оппоненты:

Зверев Виталий Васильевич,
доктор биологических наук, профессор, академик РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» Российской академии медицинских наук, директор.

Кордюкова Лариса Валентиновна,
доктор биологических наук, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», ведущий научный сотрудник.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова» Российской академии медицинских наук.

Защита диссертации состоится «___» _____ 2014 г. в ___ час ___ мин на заседании Диссертационного совета Д.001.043.01 при ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России (197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России и на сайте <http://www.influenza.spb.ru/>.

Автореферат разослан «___» _____ 2014 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета,

кандидат медицинских наук _____

Суховецкая Вера Федотовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Грипп – это острая респираторная вирусная инфекция, вызывающая сезонные эпидемии и периодические пандемии с высокой летальностью (ВОЗ, 2014). Для вирусов гриппа характерен высокий уровень вариабельности генома. Вследствие отсутствия корректорской активности у вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы при репликации происходит постоянное накопление мутаций, которые обеспечивают приобретение устойчивости к противовирусным препаратам и ускользание от механизмов приобретённого иммунитета. Кроме того, в процессе реассортации геномных сегментов могут появляться новые не свойственные популяции вирусные штаммы, обладающие пандемическим потенциалом, такие как, например, вирус «испанки» H1N1₁₉₁₈ или пандемический вирус H1N1_{pdm09}.

Вирусы гриппа человека в зависимости от филогенетической принадлежности могут существенно отличаться по своим генетическим характеристикам, обладать разной степенью патогенности и, следовательно, вызывать штамм-специфический иммунный ответ организма, одной из важнейших характеристик которого является цитокиновый статус. Цитокины – это ведущие физиологические медиаторы, вырабатываемые клетками в ответ на внешние стимулы и образующие сложную сеть взаимодействий, которые играют ключевую роль в развитии иммунного ответа и восстановлении гомеостаза (Симбирцев, 2002; Tarrant, 2010). В настоящее время показано, что вирусы гриппа А вызывают продукцию хемокинов (RANTES, MIP-1 α , MCP-1, MCP-3 и IP-10), провоспалительных (IL-1 β , IL-6, IL-18 и TNF- α) и противовирусных (IFN- α , IFN- β) цитокинов (Julkunen et al., 2001). Существуют общие закономерности в паттерне экспрессии цитокинов при гриппе, однако для разных штаммов вируса уровень цитокинов может сильно отличаться. Наиболее ярким примером «нестандартного» проявления цитокинового профиля является гиперцитокинемия, или «цитокиновый шторм», – неконтролируемая и не несущая защитной функции избыточная продукция цитокинов (Chan et al., 2005; Lee, 2009). Данное явление было хорошо изучено для высокопатогенных вирусов гриппа А/H5N1 человека, высокая степень летальности от которых во многом вызвана именно гиперцитокинемией.

Современная диагностика цитокинов требует наличия точных и чувствительных методов их измерения. Несмотря на большое число методик, разработанных для определения уровня цитокинов в клетках, тканях и биологических жидкостях, не все они удовлетворяют требованиям точности, чувствительности, воспроизводимости, доступности, простоты исполнения и низкой стоимости проведения анализа. Кроме того, для характеристики цитокинового статуса наиболее целесообразным является одновременное измерение нескольких цитокинов в одном эксперименте. Это требование обусловлено присущими цитокинам плеiotропностью, избыточностью действия и эффектом формирования цитокиновых каскадов (Wang et al., 2002; Huang et al., 2007; Tam et al., 2002).

Таким образом, разработка новых современных методов, позволяющих проводить высокопроизводительное мультиплексное определение цитокинового статуса при гриппе, является чрезвычайно актуальной задачей современной молекулярной вирусологии и медицины.

Степень разработанности темы исследования. Цитокиновый профиль является одной из важнейших характеристик иммунного статуса пациента. Созданию тест-систем для количественного определения мРНК цитокинов методом ПЦР в режиме реального времени посвящены работы Бурменской О.В., Трофимова Д.Ю. Анализу цитокинового профиля с использованием ИФА уделено внимание в трудах исследователей из компании «Вектор-бест» (Новосибирск). Определённое влияние на решение проблемы оценки уровня цитокинов оказали Сенников С.В., Силков А.Н., Симбирцев А.С., Кетлинский С.А. Однако несмотря на чрезвычайную актуальность проблемы, в настоящее время в России практически нет коммерческих наборов для мультиплексной оценки уровня цитокинов. Вследствие этого данная работа может являться платформой для создания высокопроизводительных систем такого рода.

Цель исследования. Разработка мультиплексных методов оценки профиля цитокинов в клетках человека, инфицированных вирусами гриппа А, на основе микрочипов и ПЦР.

Задачи исследования:

1. На основе филогенетического анализа для оценки профиля цитокинов выбрать штаммы вирусов гриппа А, обладающие разными уровнями патогенности и адаптации к человеку, и сравнить последовательности ключевых структурных и функциональных сайтов белка NS1 этих вирусов.
2. Разработать системы для определения мРНК цитокинов IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 β , IL-18, IFN- γ и TNF- α человека на основе олигонуклеотидного микрочипа и мультиплексной ПЦР с детекцией в режиме реального времени.
3. Сравнить профили мРНК цитокинов в эпителиальных клетках A549 при заражении вирусами гриппа A/California/07/09 (H1N1_{pdm09}), A/Victoria/361/11 (H3N2) и A/chicken/Kurgan/5/05 (H5N1) и определить ключевые факторы цитокинового ответа, потенциально характеризующие степень патогенности вируса.
4. Разработать белковый микрочип для количественного определения цитокинов IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IFN- γ и TNF- α человека.
5. Охарактеризовать с помощью разработанных методов изменения профиля цитокинов (мРНК и секретлируемых белков) в клетках A549, индуцированные заражением пандемическим вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1_{pdm09}).

Научная новизна работы. В процессе выполнения исследования разработан не имеющий прямых аналогов количественный метод детекции мРНК цитокинов IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 β , IL-18, IFN- γ и TNF- α человека с использованием мультиплексной ПЦР в режиме реального времени.

Впервые в России были разработаны белковый микрочип для количественной детекции IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IFN- γ и TNF- α человека и олигонуклеотидный микрочип для оценки мРНК IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 β , IL-18, IFN- γ и TNF- α человека. Все разработанные системы были успешно апробированы на биологическом материале, полученном при заражении клеток человека различными штаммами вирусов гриппа А. Получен ряд интересных данных, дополняющих имеющиеся представления о штамм-специфическом вирус-индуцированном цитокиновом клеточном ответе.

Теоретическая и практическая значимость работы. Выполненная работа представляет собой научное исследование, имеющее ярко выраженную прикладную направленность. Показана возможность применения разработанных методов для изучения экспрессии цитокинов, индуцированной вирусами гриппа. Измерение уровня цитокинов у пациентов при гриппе необходимо для своевременного прогнозирования течения и исхода заболевания, в том числе предупреждения развития потенциально летальной реакции гиперцитокинемии (*Julkunen et al., 2001; van Reeth, 2000*). Предложенные методы для определения цитокинового статуса могут быть также использованы при разработке и испытаниях противогриппозных вакцин с целью оценки их безопасности и эффективности при формировании специфического гуморального и клеточного иммунитета. Кроме того, разработанные системы применимы для анализа экспрессии цитокинов не только при гриппе, но и при проведении широкого круга биологических и медицинских исследований. Лабораторные образцы микрочипов и системы мультиплексной ПЦР для оценки цитокинового профиля могут быть в дальнейшем внедрены в производство.

Методология и методы исследования. В ходе проведения научной работы применялись стандартные биохимические, вирусологические, молекулярно-биологические и иммунологические методы. Кроме того, были разработаны собственные оригинальные методики при конструировании тест-систем на основе микрочипов. Более подробно этапы проведения экспериментов отражены в разделе «Материалы и методы».

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разработанный олигонуклеотидный микрочип позволяет одновременно качественно выявлять мРНК IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 β , IL-18, IFN- γ и TNF- α . Чувствительности предложенного метода и традиционного метода ОТ-ПЦР сопоставимы.
2. Разработанная система на основе мультиплексной ПЦР в режиме реального времени позволяет проводить одновременный количественный анализ мРНК IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 β , IL-18, IFN- γ и TNF- α человека с чувствительностью от 20 фМ.
3. Разработанный белковый микрочип позволяет проводить специфический мультиплексный количественный анализ IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IFN- γ и TNF- α человека в диапазоне концентраций от 5 до 3800 пг/мл.

4. Рекомбинантный вирус гриппа A/Kurgan/5/05 (H5N1) с удалённым геном NS1 по сравнению с вирусом, содержащим полноразмерный NS1, в клетках A549 вызывает повышение уровня экспрессии мРНК IL-1 β , IL-6 и TNF- α , активирует синтез мРНК IL-10 и ингибирует синтез мРНК IL-4.

5. Инфицирование клеток A549 вирусами гриппа А приводит к возрастанию экспрессии мРНК IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-12 β , IL-18 и TNF- α . В частности, вирусы A/California/07/09 (H1N1_{pdm09}), A/Victoria/361/11 (H3N2) и A/chicken/Kurgan/5/05 (H5N1) усиливают в клетках экспрессию мРНК IL-6, провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-18 и активируют TNF- α . Вирус A/California/07/09 (H1N1_{pdm09}) также индуцирует в клетках A549 синтез мРНК IL-4, а штамм A/Victoria/361/11 (H3N2) – IL-4 и IL-12 β .

6. В ответ на заражение клеток A549 вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1_{pdm09}) активируется продукция мРНК IL-4, IL-10 и TNF- α , при этом во внеклеточной среде выявляется только TNF- α .

Личный вклад автора состоит в самостоятельном планировании и проведении всех лабораторных исследований, в том числе адаптации ряда традиционных методов для применения в формате микрочипов, статистической обработке и анализе полученных результатов. Лабораторные образцы микрочипов и тест-системы на основе мультиплексной ПЦР разработаны, охарактеризованы и апробированы лично автором. Методическая помощь была оказана сотрудниками ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России: Романовской-Романько Е.А. и Шурыгиной А.-П.С. – при работе с реассортантными штаммами, Даниленко Д.М. – при культивировании используемых в работе штаммов вируса гриппа А, Смирновой Т.Д. – при инфицировании клеток.

Степень достоверности и апробация материалов диссертации. Достоверность результатов исследований, проведённых автором, подтверждена адекватным статистическим анализом данных, полученных в ходе независимых экспериментов. Материалы диссертационной работы доложены на 38-м Международном конгрессе FEBS (Federation of European Biochemical Societies) (Санкт-Петербург, 2013); на Ежегодной Международной конференции ESHG (European Society of Human Genetics) (Париж, 2013); на Юбилейной научно-практической конференции: «Грипп: вирусология, эпидемиология, профилактика, лечение» (Санкт-Петербург, 2012); на IV Ежегодном Всероссийском конгрессе инфекционистов (Москва, 2012); на 13-й Международной Пущинской школе-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2009); на Международной научной конференции «Противогриппозные вакцины нового поколения» (Санкт-Петербург, 2009).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 17 печатных работ, в том числе 1 глава в монографии, 6 статей, из них 5 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, и 10 тезисов докладов.

Объём и структура диссертации. Диссертация изложена на 117-ти страницах машинописного текста, включая 10 таблиц и 36 рисунков. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов

и методов, шести глав собственных исследований и обсуждения полученных результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы содержит 132 источника на русском и английском языках. Диссертация изложена в соответствии с общими требованиями к оформлению кандидатских и докторских диссертаций, утверждёнными в ГОСТ Р 7.0.11–2011.

Работа поддержана грантом РФФИ 08-04-13734-офи_ц; грантами для студентов, аспирантов, молодых учёных, молодых кандидатов наук вузов и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга; стипендией Президента Российской Федерации. Работа также проводилась в рамках Государственных тем НИР и Государственного задания, выполняемых в ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клетки и вирусы. В работе использовали перевиваемую клеточную линию человека A549 (карцинома лёгких), полученную из коллекции клеточных культур ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, а также первичную культуру человеческих лимфоцитов, выделенную из крови здоровых добровольцев. Для моделирования гриппозной инфекции использовали штаммы вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1_{pdm09}), A/Victoria/361/11 (H3N2), A/chicken/Kurgan/5/05 (H5N1), а также реассортантные штаммы A/Kurgan/5/05 (H5N1) с полноразмерным и делетированным геном NS1 (*Romanova et al.*, 2009).

Инфекционную активность вирусов определяли методом предельных разведений на клетках MDCK. Учёт результатов проводили визуально по наличию цитопатического эффекта и контролировали с помощью метода гемагглютинации. Расчёт 50 % тканевой инфекционной дозы (ТИД₅₀) для всех вирусных штаммов проводили по методу Рида и Менча (*Reed & Muench*, 1938) и выражали в lg ТИД₅₀/мл.

Стимуляция клеток вирусами гриппа А. Для анализа продукции цитокинов к полностью сформированному монослою клеток (10^5 – 10^6 клеток/мл) вносили исследуемые вирусы гриппа А с множественностью заражения (МОИ), равной 1. После инкубации в течение 1 часа при комнатной температуре вирус-содержащий материал удаляли, монослой клеток отмывали от неадсорбированных вирусных частиц и вносили свежую культуральную среду. Анализ экспрессии цитокинов в зависимости от целей эксперимента проводили через 2–48 часов после инкубации при 37 °С и 5 % CO₂.

Мультиплексный «сэндвич»-вариант ИФА в формате микрочипа. Для печати белковых микрочипов использовали слайды с поли-L-лизиновой подложкой. Антитела в концентрации 200 мкг/мл иммобилизовали на слайды методом контактной печати на споттере SpotBot 3 (“Arrayit Corporation”, США). Анализ проводили с использованием рамок для гибридизации на 16 субэреев FAST Frame (“Whatman”, США). Вначале поверхность микрочипа блокировали раствором 1 % бычьего сывороточного альбумина (БСА) на 1× PBS. Затем в

течение 2 часов проводили инкубацию биочипа с цельными пробами или стандартами, полученными серией разведений на блокирующем растворе. Далее для детекции специфического связывания слайд инкубировали в течение 1 часа со смесью биотинилированных антител, каждое в концентрации 0,5 мкг/мл в блокирующем буфере. Биотинилированные антитела визуализировали окрашиванием эрреев флуоресцентным реагентом Cy3-стрептавидин (“Invitrogen”, США), разведённым в соотношении 1:500 в растворе 1 % БСА на 1× PBS, в течение 15 мин. Результаты гибридизации регистрировали путём сканирования микрочипа на сканере ScanArray Express (“PerkinElmer”, США) с разрешением 5 мкм и значением PMT в пределах 70-90.

Выделение тотальной РНК проводили из 100–200 мкл суспензии изучаемых клеток (10^5 – 10^6 клеток/мл) с использованием реагента TRIzol (“Ambion”, США) в полном соответствии с инструкцией производителя.

Реакцию обратной транскрипции (ОТ) проводили с использованием 0,5–1 мкг тотальной РНК и универсального праймера олиго(dT)₁₆ («ДНК-Синтез», Россия) в объёме 25 мкл при 37 °С в течение 1 часа. Кроме праймеров и РНК смесь для ОТ содержала 500 мкМ dNTP, 200 единиц M-MLV ревертазы, 1× M-MLV реакционный буфер, 25 единиц ингибитора рибонуклеаз RNasin Plus (“Promega”, США).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в 30 мкл реакционной смеси, содержащей 1× Taq-буфер, 4 мМ MgCl₂, 2,5 ед. Taq-полимеразы («Медиген», Россия), эквимольную смесь четырёх dNTP по 250 мкМ каждого (“Promega”, США), по 0,3 мкМ прямого и обратного праймеров («ДНК-Синтез», Россия) и 2 мкл кДНК из ОТ-смеси. Реакцию проводили в амплификаторах CFX96 или MJ Mini (“Bio-Rad”, США).

Печать олигонуклеотидного микрочипа. Подобранные олигонуклеотидные зонды («ДНК-Синтез», Россия) растворяли для печати в 3× SSC-буфере до конечной концентрации 10 пмоль/мкл и наносили на альдегидные стёкла (“CEL Associates”, Эстония) методом контактной печати с использованием споттера SpotBot 3 (“Arrayit Corporation”, США). Через 1 час после завершения печати слайды облучали ультрафиолетом (0,09 Дж/см²) при длине волны 254 нм с помощью кросслинкера Biolink (“Biometra”, Германия).

Подготовку флуоресцентной пробы для гибридизации осуществляли методом ОТ-ПЦР аналогично вышеописанным протоколам за исключением того, что на стадии амплификации смесь для ПЦР вместо dNTP содержала по 250 мкМ dATP, dTTP и dGTP, 100 мкМ dCTP (“Promega”, США) и 17 мкМ Cy3(Cy5)-dCTP («ДНК-Синтез», Россия).

Гибридизация на олигонуклеотидном микрочипе. Флуоресцентно меченую пробу денатурировали при 99 °С в течение 2 мин, затем охлаждали 2 мин на льду, добавляли буфер для гибридизации (3× SSC, 0,1 % SDS, 1 % БСА, 20 % формамид) и наносили на микрочип. Олигонуклеотидные зонды на микрочипе предварительно денатурировали кипячением слайда в Milli-Q H₂O в течение 1 мин с последующей инкубацией в 96 % этаноле в течение 1 мин, после чего слайд высушивали центрифугированием. Гибридизацию проводили

в течение 2 часов при температуре 37 °С с перемешиванием при 250 об/мин на термошейкере для планшетов. После гибридизации микрочипы отмывали от несвязавшихся молекул пробы и гибридизационной смеси в растворе 1× SSC/0,1 % SDS. Сканирование биочипов проводили, как описано выше.

Мультиплексную ПЦР с детекцией в режиме реального времени проводили в 30 мкл реакционной смеси, содержащей 1× Taq-буфер, 4 mM MgCl₂, 5 ед. Taq-полимеразы («Медиген», Россия), эквимольную смесь четырёх dNTP по 330 мкМ каждого («Promega», США), 2–5 мкл кДНК, смесь специфических прямых и обратных праймеров и олигонуклеотидных TaqMan зондов, количественное соотношение которых в реакционных смесях было оптимизировано в процессе выполнения работы. ПЦР проводили в амплификаторе CFX96 («Bio-Rad», США) по следующей программе: 95 °С – 4 мин; затем 5 циклов: 95 °С – 30 с, 57 °С – 30 с, 72 °С – 60 с; затем 35 циклов: 95 °С – 30 с, 57 °С – 30 с, 72 °С – 60 с с детекцией по четырём каналам: FAM, HEX, ROX и Cy5.

Анализ изображений после гибридизации выполняли с использованием программы ScanArray Express v.3.0. Обработку результатов проводили с использованием Microsoft Office Excel 2003/2007. Для оценки статистической достоверности различий применяли программу GraphPad Prism 6 (непараметрические критерии Манна–Уитни и Краскела–Уоллиса).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Сравнение белка NS1 вирусов гриппа А, обладающих разной степенью патогенности и адаптации к человеку. Изучение гриппиндуцированной экспрессии цитокинов проводили с использованием штаммов вирусов гриппа A/California/07/09 (H1N1_{pdm09}), A/Victoria/361/11 (H3N2) и A/chicken/Kurgan/5/05 (H5N1), отличающихся по степени патогенности, филогенетической удалённости и происхождению гена NS. Известно, что многофункциональный белок NS1 является основным антагонистом системы интерферонов I и III типов, а также подавляет синтез клеточных мРНК, в том числе блокируя активацию факторов транскрипции генов цитокинов (рис. 1).

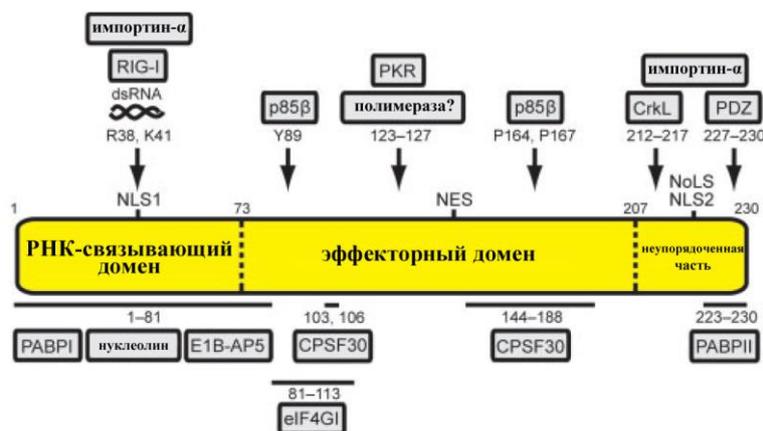


Рис. 1. Схематическое представление функциональных доменов белка NS1 вируса гриппа А (Hale et al., 2008). На схеме представлены основные домены взаимодействия NS1 с клеточными и вирусными факторами.

Сравнение аминокислотных последовательностей NS1 выбранных штаммов показало, что они различаются по наличию как точечных мутаций, так и делеций (табл. 1).

Таблица 1
Характеристика вирусов гриппа А, используемых в работе

штамм вируса гриппа А	подтип	происхождение и степень патогенности	лиганд для PDZ-домена ¹	делеция 80–84 а.о. ²	CPSF30 ³			P85β ⁴			дцРНК ⁵		PKR ⁶ 123-127 а.о.
					делеция 191–195 а.о. ⁷	103 а.о.	106 а.о.	89 а.о.	164 а.о.	167 а.о.	38 а.о.	41 а.о.	
A/Brevig Mission /1/1918	H1N1	пандемический штамм 1918 г. («испанка»)	KSEV	нет	нет	F	M	Y	P	P	R	K	IMDKN
A/Puerto Rico /8/34	H1N1	сезонный штамм, циркулировавший в человеческой популяции до 2009 г.	RSEV	нет	нет	S	I	Y	P	P	R	K	IMDKN
A/California /07/09	H1N1 pdm09	пандемический штамм 2009 г. («свиной грипп»)	нет	нет	нет	F	M	Y	P	P	R	K	IMEKN
A/Victoria /361/11	H3N2	сезонный штамм	RSKV	нет	нет	F	M	Y	P	P	R	R	IMDEN
A/chicken/Kurgan /5/05	H5N1	высокопатогенный вирус гриппа птиц	EPKV	есть	нет	F	M	Y	P	P	R	K	IMDKT

Исходя из вышеприведённых данных, а также данных литературы о цитокиновом ответе, индуцированном штаммами разных подтипов вируса гриппа А, следует ожидать, что профили экспрессии цитокинов в клетках, инфицированных вирусами A/California/07/09 (H1N1_{pdm09}), A/Victoria/361/11 (H3N2) и A/Kurgan/05/05 (H5N1), будут отличаться. Таким образом, данные вирусы могут быть использованы для отработки методов оценки особенностей грипп-индуцированной экспрессии цитокинов.

Разработка олигонуклеотидного микрочипа для выявления мРНК цитокинов и его применение для изучения роли белка NS1 вируса гриппа A/Kurgan/5/05 (H5N1) в индукции цитокинового ответа. На первом этапе работы по созданию олигонуклеотидного микрочипа для определения мРНК цитокинов IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12β, IL-18, IFN-γ и TNF-α подобрали и синтезировали специфические олигонуклеотидные зонды и праймеры так,

¹ PDZ-домен-содержащие белки играют важную роль в сигнальных путях, в том числе участвуя в регуляции активности и трафика мембранных белков.

² Делеция 80–84 а.о. уменьшает стабильность NS1, ослабляя его как антагониста системы IFN-α/β и приводя к аттенуации вируса.

³ CPSF30 – клеточный белок, специфический фактор расщепления и полиаденилирования. Связывание NS1 с CPSF30 селективно ингибирует ядерный экспорт клеточных мРНК.

⁴ P85β – фосфатидилинозитол-3-киназа. Предполагается, что активация P85β вирусным белком NS1 является одним из механизмов снижения клеточного апоптоза.

⁵ дцРНК – связывание NS1 дцРНК приводит к ингибированию 2',5'-олигоденилатсинтетазы, РНКазы L и RIG-I, участвующих в гидролизе вирусных РНК (ингибирование врождённого иммунного ответа).

⁶ PKR – IFN-индуцируемая дцРНК-зависимая протеинкиназа, участвующая в ингибировании синтеза белков.

⁷ Делеция 191–195 а.о. приводит к усилению вирулентности вируса гриппа.

чтобы разброс расчётных температур плавления нуклеотидных дуплексов, образующихся при гибридизации на микрочипе, не превышал 2–3 °С. Зонды наносили на биочип в виде массива дискретных точек, представленного в 12-ти повторах. Каждая точка содержала олигонуклеотидные зонды, комплементарные антисмысловой нити соответствующего ей гена цитокина человека (рис. 2). Кроме того, на микрочип иммобилизовали зонды, позволяющие выявить мРНК генов «домашнего хозяйства» АСТВ и GAPDH, и зонд QC с известной последовательностью, используемый в качестве положительного контроля прохождения гибридизации. Все точки наносили в пяти повторах, обеспечивающих статистическую достоверность получаемых при анализе данных. Чипы хранили при комнатной температуре не более года.

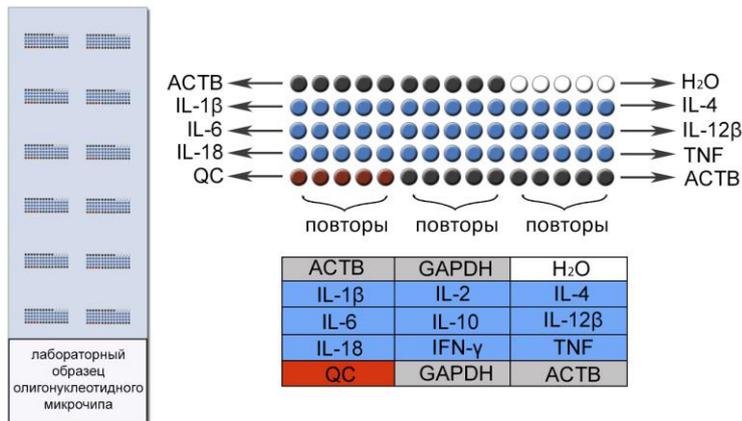


Рис. 2. Схема лабораторного образца олигонуклеотидного микрочипа для анализа уровня мРНК цитокинов IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12β, IL-18, IFN-γ и TNF-α человека. АСТВ и GAPDH – гены «домашнего хозяйства», QC – положительный контроль гибридизации.

Условия проведения гибридизации на микрочипе подбирали с использованием контрольного зонда СуЗ-QC*, представляющего собой флуоресцентно меченый олигонуклеотид, полностью комплементарный иммобилизованному на чипе зонду QC. Рассмотрели пять вариантов буферов для гибридизации (см. подписи к рис. 3). Зонд СуЗ-QC* в количестве 0,001 пмоль гибридизовали на микрочипе в каждом из буферов при 37 °С в течение 2 часов. Как видно из результатов, представленных на рис. 3 А, стабильный флуоресцентный сигнал, свидетельствующий о связывании контрольного образца СуЗ-QC* с комплементарным ему зондом QC, наблюдали только при использовании буферов (1), (2) и (4). Наибольшую интенсивность флуоресценции (ИФ) точек на микрочипе наблюдали при использовании буфера (2). ИФ, детектируемая при использовании буферов (1) и (4), была значительно меньше. Флуоресцентные сигналы, полученные при гибридизации пробы в буферах (3) и (5), были выше значений ИФ отрицательного контроля, но не превышали выбранного порогового значения ИФ. Основываясь на полученных данных, для гибридизации флуоресцентно меченых проб с зондами на микрочипе в дальнейшем использовали буфер (2).

Для определения верхнего и нижнего пределов детекции метода провели гибридизацию микрочипа с контрольной пробой СуЗ-QC* в количествах от 10⁻⁵ до 1 пмоль. Аналитический диапазон чувствительности составил от 10⁻⁴ до 10⁻² пмоль. Несмотря на то что аппаратно регистрировали и более низкое количество пробы СуЗ-QC* (10⁻⁵ пмоль), величина ИФ при этом не

преодолевала выбранное пороговое значение (1000 единиц). При количестве пробы свыше 10^{-1} пмоль регистрируемые значения ИФ выходили на плато.

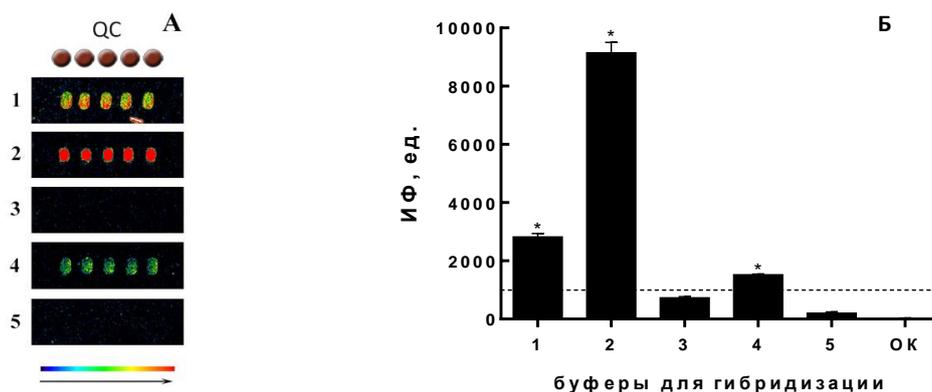


Рис. 3. Результаты гибридизации микрочипа с контрольной пробой СуЗ-QC* при использовании различных блокирующих реагентов. (1) $6\times$ SSPE, 20 % формамид; (2) $3\times$ SSC, 0,1 % SDS, 1 % БСА, 20 % формамид; (3) $6\times$ SSC, $1\times$ раствор Денхардта, 25 мкг/мл неспецифической дрожжевой тРНК, 20 % формамид; (4) коммерческий буфер ULTRANub (“Ambion”, США); (5) 0,5 % желатин, 20 % формамид. **А** – изображения эрреев, полученные после сканирования (представлены только споты, соответствующие зонду QC); **Б** – средние значения интенсивности флуоресценции (ИФ) спотов \pm О.С. ОК – отрицательный контроль ($3\times$ SSC-буфер, 20 % формамид). Звёздочками отмечены значимые отличия ИФ от ОК ($p < 0,05$, критерий Краскела–Уоллиса). Пунктирной линией обозначено пороговое значение, равное 1000 ед.

Далее рассмотрели три варианта подготовки флуоресцентно меченой пробы для гибридизации на микрочипе: 1) ОТ с последующей *in vitro* транскрипцией; 2) тотальный синтез ДНК с использованием набора реактивов Mint («Евроген», Россия), принцип работы которого основан на свойстве используемой в наборе ревертазы нематрично присоединять dC на 3'-конец растущей цепи; 3) мультиплексную ОТ-ПЦР со специфическими праймерами к мРНК IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 β , IL-18, IFN- γ и TNF- α . Для тестирования использовали тотальную РНК, выделенную из клеток A549, заражённых вирусом гриппа A/Kurgan/5/05 (H5N1). По результатам сравнительного анализа разных способов подготовки флуоресцентно меченой пробы для гибридизации на микрочипе выбрали метод ОТ-ПЦР. С использованием данного метода достоверно выявляли наибольшее число мРНК цитокинов в исследуемой пробе: IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-12 β , IL-18 и TNF- α . Недостатком выбранного метода ОТ-ПЦР является невозможность проведения точной количественной оценки анализируемых транскриптов.

На заключительном этапе данной части работы провели анализ роли белка NS1 вируса гриппа A/Kurgan/5/05 (H5N1) в индукции цитокинового ответа в клетках A549 с использованием олигонуклеотидного микрочипа и ОТ-ПЦР. Известно, что белок NS1 вируса гриппа является мощным антагонистом иммунного ответа хозяина, и отсутствие его экспрессии приводит к потере вирусом способности ингибировать противовирусный ответ (Ferko *et al.*, 2004). Для определения цитокинового профиля использовали три типа образцов: контрольные неинфицированные клетки; клетки, инфицированные вирусом A/Kurgan/5/05 (wtNS); и клетки, инфицированные вирусом A/Kurgan/5/05 с

делецией гена NS1 (deltaNS) (*Romanova et al., 2009*). Через 8 часов после заражения из клеток выделили тотальную РНК (рис. 4 А) и определили продукцию мРНК девяти цитокинов методами ОТ-ПЦР (рис. 4 Б) и микрочипов (рис. 5). Результаты, полученные с использованием обоих методов, совпали.

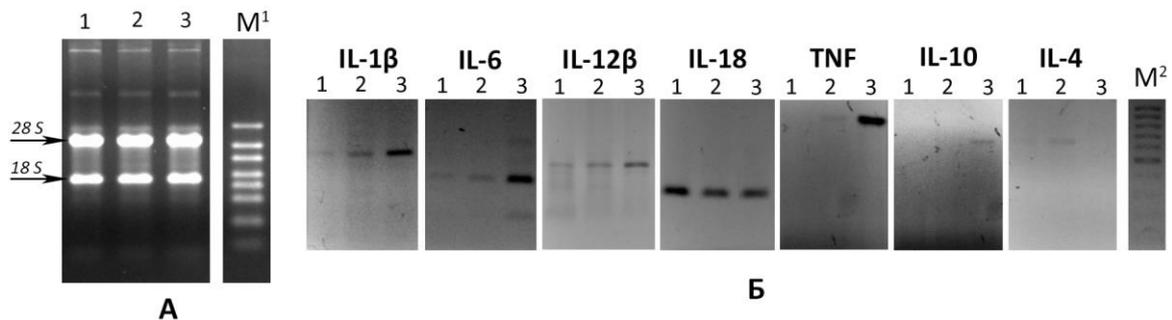


Рис. 4. Экспрессия цитокинов клетками A549, инфицированными рекомбинантными вирусами гриппа A/Kurgan/5/05 (H5N1). А – Препараты тотальной РНК. Б – Детекция результатов ОТ-ПЦР. 1 – контрольные клетки, 2 – клетки с wtNS вирусом, 3 – клетки с deltaNS вирусом, М¹ – РНК-маркер 200–6000 н. (“Fermentas”, #SM1821), М² – ДНК-маркер 100–1000 п.н. (“Fermentas”, #SM0241).

В клетках A549 выявили как мРНК провоспалительных (IL-1β, IL-12β, IL-18 и TNF-α), так и противовоспалительных (IL-4 и IL-10) цитокинов, а также IL-6, обладающего амбивалентными свойствами. Причём если стабильно высокий уровень экспрессии мРНК IL-18 регистрировали во всех клетках, включая неинфицированные контрольные, то продукция мРНК IL-1β, IL-6, IL-12β, а особенно TNF-α, IL-4 и IL-10, являлась вирус-индуцированной. Экспрессия цитокинов IL-1β, IL-6 и TNF-α значительно возростала при стимуляции клеток deltaNS вирусом, что согласуется с литературными данными (*Stasakova et al., 2005*).

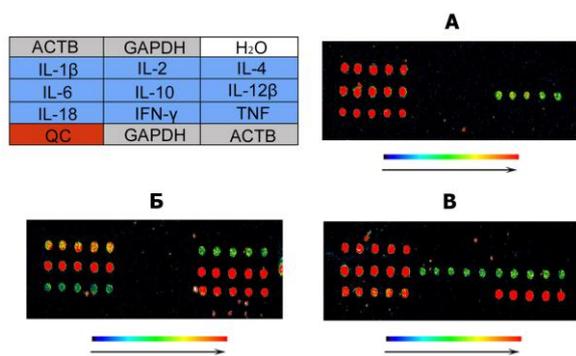


Рис. 5. Результаты гибридизации микрочипа с флуоресцентно мечеными кДНК цитокинов, полученными методом ОТ-ПЦР. А – контрольные клетки. Б – клетки, простимулированные wtNS вирусом. В – клетки, простимулированные deltaNS вирусом. Контрольный зонд Cy3-QC* не использовали.

Спектры мРНК цитокинов в инфицированных клетках существенно различались по присутствию IL-4 и IL-10. Так, мРНК IL-4 обнаружили только в клетках, заражённых wtNS вирусом, а мРНК IL-10 – только в случае инфицирования deltaNS вирусом. Можно предположить, что белок NS1 вируса гриппа A/Kurgan/5/05 влияет на экспрессию противовоспалительных цитокинов IL-4 и IL-10 в клетках A549. Продукция противовоспалительных цитокинов, особенно IL-10, является одним из механизмов регуляции воспаления, при этом IL-10, являясь противовоспалительным цитокином, может играть роль в фиброзе, индуцируя образование коллагена и пополнение фиброцитов в лёгких (*Tisoncik et al., 2012*). Системная продукция IL-10, следующая за началом «цитокинового

шторма», является маркером противовоспалительного ответа или фактором, ингибирующим активность НК-клеток.

Разработка метода определения уровня цитокинов с использованием мультиплексной ПЦР в режиме реального времени. С целью создания количественного метода для определения уровней мРНК цитокинов предложили альтернативный микрочипу подход, основанный на проведении мультиплексной ПЦР в режиме реального времени (мПЦР). Оригинальные последовательности праймеров и TaqMan зондов, подобранных к белок-кодирующим областям генов цитокинов, разбили на группы для использования в трёх наборах мультиплексных реакций (SET1, SET2 и SET3), каждый из которых позволяет количественно выявлять три цитокина-мишени и эндогенный контроль (АСТВ или GAPDH). Для определения оптимального термального профиля рассчитали пороговые значения C_q при трёх температурах отжига праймеров: 55, 57 и 60 °С. В качестве кДНК-матриц использовали смеси очищенных ампликонов в концентрациях по 0,1 нг/мкл. Для всех мишеней наибольший сигнал флуоресценции получали при 57 °С, в дальнейшем это значение температуры отжига использовали во всех мПЦР. Для нормализации выбрали ген GAPDH, широко используемый в качестве эндогенного контроля (*Thellin et al., 1999*). Для унификации разрабатываемой тест-системы в каждой реакции использовали одинаковый состав ПЦР-смеси, идентичный по содержанию dNTP, концентрации ионов магния и количеству единиц активности Taq-полимеразы, а также одинаковую программу амплификации.

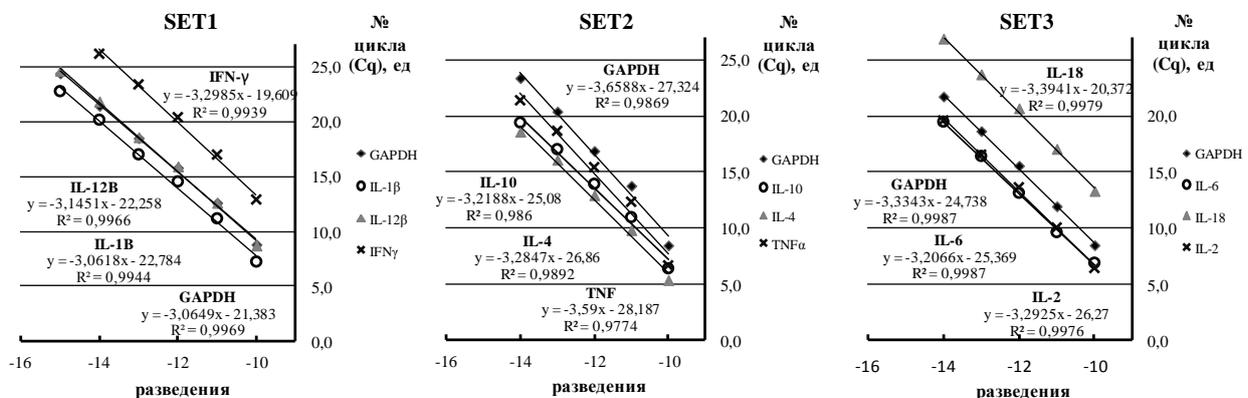


Рис. 6. Кривые накопления целевых продуктов в мПЦР для определения цитокинов.

Оценку валидности разработанной тест-системы на основе мПЦР для анализа уровня экспрессии цитокинов проводили по следующим критериям: эффективность амплификации специфических мишеней в мПЦР, чувствительность, динамический диапазон и воспроизводимость получаемых результатов. Данные, представленные на рис. 6, свидетельствуют о том, что эффективности амплификации находятся в пределах 90–100 % и отличаются друг от друга в каждой из мПЦР не более чем на 10 %. Это значение является допустимой погрешностью при расчёте уровня экспрессии с использованием $\Delta\Delta C_t$ метода (*Nolan et al., 2006*). Динамический диапазон используемых наборов мПЦР составил 5–6 порядков. Нижний предел чувствительности метода в среднем равен 20 фМ для очищенных ПЦР-фрагментов.

Коэффициенты вариации значений C_q , определяющие воспроизводимость системы, составили не более 1,5 %. Таким образом, было показано, что разработанная тест-система на основе мПЦР позволяет получать стабильные хорошо воспроизводимые результаты и удовлетворяет всем необходимым требованиям для проведения анализа уровня экспрессии с использованием $\Delta\Delta C_t$ метода.

Сравнение паттернов экспрессии мРНК цитокинов в клетках A549, инфицированных вирусами гриппа A/H1N1_{pdm09}, A/H3N2 и A/H5N1, методом мПЦР. Отдельный интерес представляет изучение спектров мРНК цитокинов при инфекциях, вызванных вирусами гриппа А разных подтипов. В качестве модельных вирусов для определения профиля цитокинов методом мПЦР использовали высокопатогенный вирус гриппа птиц A/chicken/Kurgan/5/05 (H5N1), умеренно патогенный вирус A/California/07/09 (H1N1_{pdm09}) и сезонный вирус A/Victoria/361/11 (H3N2). Оценку динамики уровня мРНК цитокинов проводили на клетках A549, которые инфицировали вирусами в низкой, средней и высокой дозах заражения (0,01, 0,1 и 1 MOI). Профили экспрессии мРНК цитокинов определяли через 0,5, 4, 8, 12 и 24 часа после инфицирования, основываясь на том, что полный цикл репродукции вируса гриппа в среднем занимает 6–8 часов.

Методом ПЦР с использованием рекомендованных CDC праймеров было показано, что все три вируса реплицировались в клетках A549. При этом репликация геномной РНК штамма A/chicken/Kurgan/5/05 была в 10 раз снижена по сравнению с остальными штаммами (рис. 7). Этот факт может быть связан с различиями в рецепторной специфичности поверхностных гликопротеинов, а также в видовых отличиях клеточных факторов, используемых вирусом в процессе репликации.

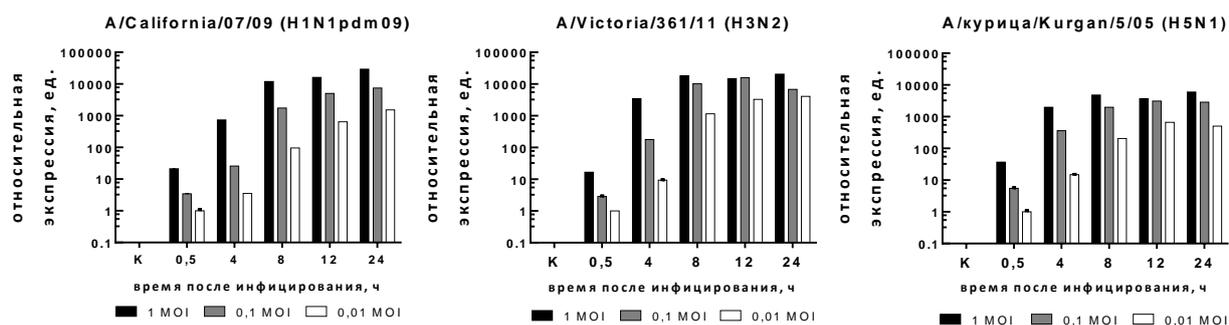


Рис. 7. Репликация геномной РНК вирусов гриппа A/California/07/09 (H1N1_{pdm09}), A/Victoria/361/11 (H3N2) и A/chicken/Kurgan/5/05 (H5N1) в эпителиальных клетках A549.

Динамика и спектр цитокинов при заражении разными подтипами вирусов гриппа А отличались. Вирусы всех трёх подтипов индуцировали в клетках A549 экспрессию мРНК цитокинов острой фазы воспаления: IL-1 β , TNF- α и IL-18, а также IL-6 (табл. 2). мРНК IL-1 β , IL-6 и IL-18, но не TNF- α , обнаруживали также в контрольных клетках A549. Уровень мРНК IL-1 β в клетках, инфицированных вирусом гриппа A/California/07/09, оставался

неизменным по сравнению с контрольными клетками вплоть до 24 часов после заражения. При заражении вирусами гриппа A/Victoria/361/11 и A/chicken/Kurgan/5/05 увеличение экспрессии IL-1 β наблюдали уже через 12 часов после инфицирования, причём по сравнению с вирусом гриппа A/California/07/09 относительный уровень экспрессии IL-1 β был заметно выше, особенно для вируса гриппа A/chicken/Kurgan/5/05. Интересно, что через 24 часа после заражения вирусом A/chicken/Kurgan/5/05 в дозе 1 MOI мРНК IL-1 β не обнаружили.

Уровни мРНК IL-18 при заражении всеми тремя вирусами значимо возрастали через 12 часов, однако через 24 часа в клетках, инфицированных штаммами A/Victoria/361/11 и A/chicken/Kurgan/5/05 в высокой и средней дозах, транскрипты IL-18 отсутствовали. Изменение уровня мРНК TNF- α в клетках при заражении этими штаммами в целом коррелирует с данными по IL-18.

Важно отметить, что при заражении клеток вирусами гриппа A/California/07/09 и A/chicken/Kurgan/5/05 разница в уровнях мРНК TNF- α на разных сроках была значительно ниже по сравнению с A/Victoria/361/11, в случае которого экспрессия TNF- α возрастала на порядок. Возможно, это связано с большей патогенностью вирусов гриппа H1N1_{pdm09} и H5N1 и с усиленным подавлением иммунного ответа посредством ингибирования синтеза мРНК TNF- α . В пользу этого предположения свидетельствует и то, что экспрессию мРНК провоспалительного цитокина IL-12 β , ключевого цитокина, усиливающего клеточно-опосредованный иммунный ответ, наблюдали только в клетках A549, инфицированных сезонным штаммом A/Victoria/361/11 (H3N2).

Таблица 2

Уровень мРНК цитокинов в клетках A549 при заражении вирусами гриппа A/California/07/09 (H1N1_{pdm09}), A/Victoria/361/11 (H3N2) и A/chicken/Kurgan/5/05 (H5N1)

цитокин	уровень мРНК цитокинов в интактных клетках A549	индукция цитокинов при инфицировании A/California/07/09 (H1N1 _{pdm09})	индукция цитокинов при инфицировании A/Victoria/361/11 (H3N2)	индукция цитокинов при инфицировании A/chicken/Kurgan/5/05 (H5N1)
IL-1 β	+	++	++	+++
IL-2	-	-	-	-
IL-4	-	+	+	-
IL-6	+	++	++	+++
IL-10	-	-	-	-
IL-12 β	-	-	+	-
IL-18	+	+	++	++
IFN- γ	-	-	-	-
TNF- α	-	+	++	+

В клетках A549, инфицированных всеми тремя типами вирусов, через 30 мин после заражения резко увеличивался уровень мРНК IL-6, который далее плавно возрастал на сроках от 4 до 24 часов после инфицирования. Динамика возрастания уровня мРНК IL-6 для вируса гриппа A/chicken/Kurgan/5/05 была значительно выше по сравнению с другими вирусами, однако через 24 часа

после инфицирования клеток этим штаммом в высокой и средней дозах уровень мРНК IL-6 начал снижаться. Экспрессию провоспалительных цитокинов IL-2 и IFN- γ в анализируемых контрольных и вирус-инфицированных клетках A549 не обнаружили, что было ожидаемо, поскольку продукция этих цитокинов характерна в основном для Т-лимфоцитов и NK-клеток.

В представленном эксперименте обнаружили мРНК противовоспалительного цитокина IL-4. В клетках, инфицированных вирусом гриппа A/California/07/09, мРНК IL-4 обнаруживали через 12 и 24 часа после инфицирования и только при высокой заражающей дозе. Штамм вируса гриппа A/Victoria/361/11 вызывал экспрессию IL-4 в клетках A549 только через 8 и 12 часов после заражения. Вирус гриппа A/chicken/Kurgan/5/05 не индуцировал экспрессию IL-4 в клетках A549. мРНК противовоспалительного цитокина IL-10 в исследуемых клетках не обнаружили.

Разработка белкового микрочипа для количественного выявления цитокинов. Для создания белкового микрочипа использовали коммерческие пары неконкурирующих моноклональных антител (МКА), обладающих разной эпитопной специфичностью, и соответствующие им рекомбинантные цитокины IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IFN- γ и TNF- α . Лабораторный образец белкового микрочипа, работающего в «сэндвич»-формате, состоял из 16-ти идентичных массивов точек, каждый из которых содержал МКА к IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IFN- γ и TNF- α человека, отрицательный и положительный контроли (рис. 8).

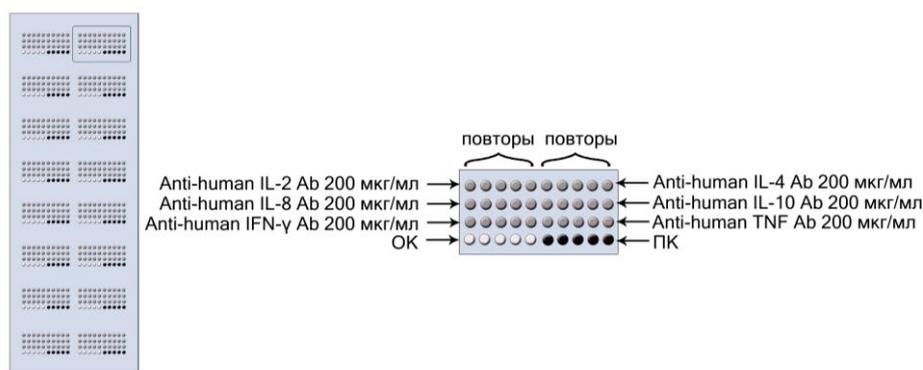


Рис. 8. Схема лабораторного образца белкового микрочипа для определения IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IFN- γ и TNF- α человека. Первые антитела к цитокинам разбавлены в 1× PBS до концентрации 200 мкг/мл и нанесены в пяти повторах. Расстояние между спотами 300 мкм, средний диаметр спота – 200 мкм. Иммуобилизацию антител на поли-L-лизиновую подложку осуществляли пассивным способом.

Измерение уровня цитокинов в формате биочипа предполагает мультиплексность, реализуемую путём использования смеси вторых биотинилированных детектирующих антител. Показали, что каждая пара МКА имеет строгую специфичность к своему антигену. Далее определили пределы детекции антигенов и построили калибровочные кривые. В качестве стандартов использовали серию 2,5-кратных последовательных разведений каждого рекомбинантного цитокина индивидуально в диапазоне от 4000 до 6,55 пг/мл.

Полученные калибровочные кривые представлены на рис. 9. Наибольшую определяемую концентрацию каждого цитокина рассчитывали экстраполяцией

стандартной кривой до максимального измеряемого прибором значения ИФ (65536 ед.). Чувствительность микрочипа, то есть наименьшую детектируемую концентрацию (Moran&Brown, 1997), определяли в пг/мл как величину, полученную при экстраполяции на стандартную кривую нижнего порогового значения ИФ (900 ед.). Как и следовало ожидать, динамические диапазоны тест-системы варьировали для каждого цитокина. Для IL-2, IL-4 и IL-8 нижний предел детекции не превышал 6,5 пг/мл. IFN- γ определяли с точностью от 5 пг/мл. Максимальные измеряемые величины концентраций варьировали от 3500 пг/мл для TNF- α до 4000 пг/мл для IL-2.

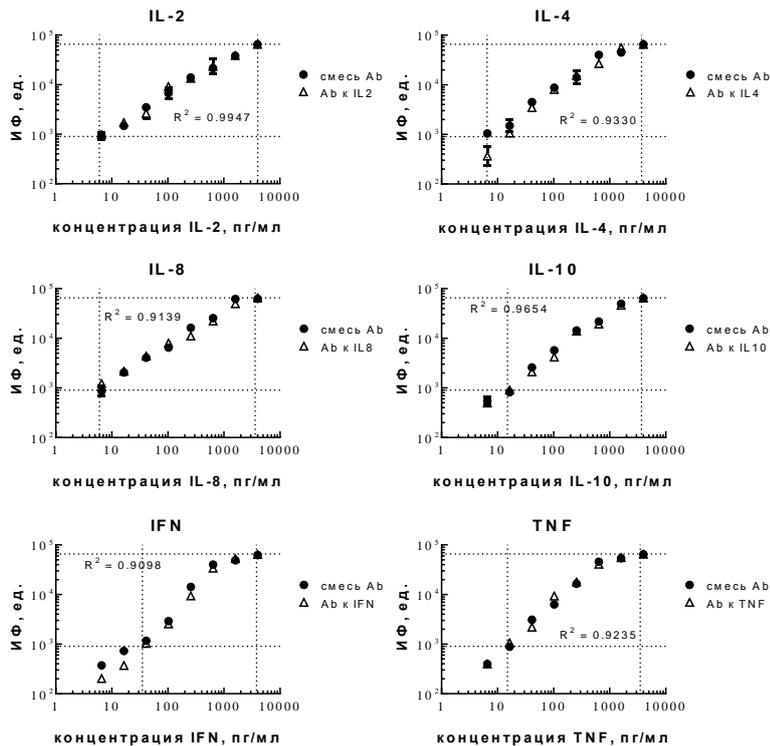


Рис. 9. Стандартные кривые для IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IFN- γ и TNF- α , полученные в процессе «сэндвич»-иммуноанализа на микрочипе. Инкубацию с микрочипом проводили в двух и более (для некоторых цитокинов) повторях. ИФ – средние медианные значения флуоресценции спота за вычетом фона (в относительных единицах), вертикальными отрезками показаны величины О.С. Для удобства отображения график построен в логарифмической системе координат.

С использованием разработанного белкового микрочипа измерили уровень цитокинов, секретируемых интактными мононуклеарными клетками периферической крови (МКПК) и МКПК через 9, 24 и 48 часов после заражения вирусами гриппа A/Kurgan/5/05 (H5N1) wtNS и deltaNS. Результаты, полученные с помощью биочипа, были полностью подтверждены методом ИФА (рис. 10).

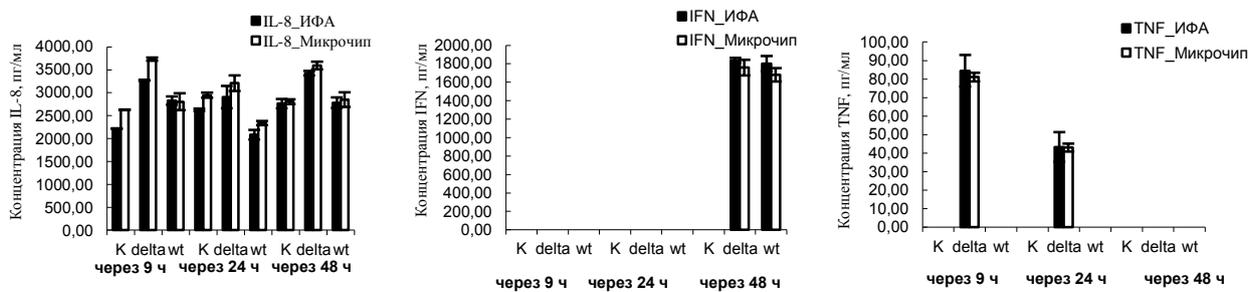


Рис. 10. Продукция цитокинов МКПК, инфицированными вирусами гриппа A/Kurgan/5/05 (H5N1) wtNS и deltaNS через 9, 24 и 48 часов после заражения. Каждая точка представляет собой среднее по трём биологическим репликам значение концентрации \pm О.С.

Во всех анализируемых образцах отметили стабильную продукцию IL-8. Через 9 и 24 часа после заражения вирусом deltaNS в пробах наблюдали появление TNF- α , продукцию которого не обнаружили в клетках, инфицированных вирусом «дикого» типа. Через 48 часов после инфицирования все заражённые клетки также начали секретировать IFN- γ . Концентрации IL-8, измеренные с помощью метода ИФА, были ниже примерно на 10 % по сравнению с результатами, полученными на микрочипе. Возможно, это обусловлено вариациями в подготовке стандартов для калибровочных кривых. Однако общая динамика уровней цитокинов сохранялась вне зависимости от способа измерения.

Анализ особенностей экспрессии цитокинов клетками A549 на уровне транскрипции и на уровне трансляции при заражении вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1_{pdm09}). Разработанные тест-системы применили для анализа экспрессии цитокинов в клетках A549, инфицированных вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1_{pdm09}). мРНК цитокинов IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 β , IL-18, IFN- γ и TNF- α измеряли методами мПЦР и с использованием олигонуклеотидного микрочипа. Количество секретируемых белков IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IFN- γ и TNF- α оценивали во внеклеточной среде с помощью белкового микрочипа. Паттерны экспрессии цитокинов определяли через 8, 24 и 48 часов после заражения. Репликация вируса A/California/07/09 в клетках A549 была подтверждена методом ПЦР (результаты не представлены).

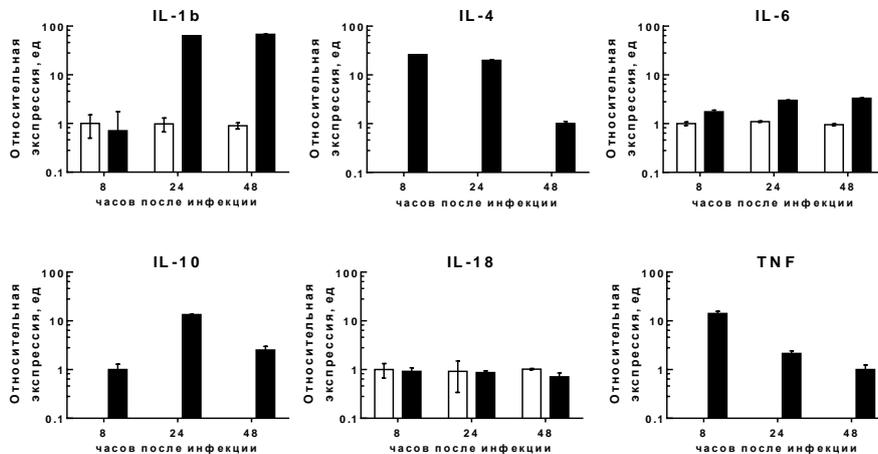


Рис. 11. Уровни мРНК цитокинов в контрольных клетках A549 (□) и клетках, инфицированных вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1_{pdm09}) (■), через 8, 24 и 48 часов после заражения. На диаграмме представлены средние относительные уровни экспрессии, измеренные в процессе мПЦР, рассчитанные для трёх биологических повторов, \pm О.С.

мРНК IL-1 β , IL-6 и IL-18 наблюдали как в инфицированных, так и в незаражённых клетках. Заражение клеток вирусом гриппа A/California/07/09 приводило к активации транскрипции генов IL-4, IL-10 и TNF- α (рис. 11). Заражение клеток вирусом гриппа A/California/07/09 приводило к значительному увеличению числа транскриптов IL-1 β через 24 и 48 часов. На всех сроках после заражения вирусом клеток A549 наблюдали незначительное (в 2–3 раза) повышение уровня мРНК IL-6, уровень мРНК IL-18 не изменялся. Вирус гриппа A/California/07/09 индуцировал в клетках A549 образование мРНК IL-4, IL-10 и TNF- α , которые не выявлялись в контрольных клетках.

Через 8 часов после заражения наблюдали максимальный уровень мРНК IL-4 и TNF- α , после чего происходило его плавное снижение. мРНК IL-10 детектировали через 8 часов после инфекции, через 24 часа наблюдали максимум экспрессии этой мРНК, а к 48 часам происходило снижение её уровня.

Уровни секретируемых клетками A549 цитокинов определили с использованием белкового микрочипа. Во внеклеточной среде выявляли только TNF- α и IL-8 (рис. 12). Секрецию IL-8 наблюдали как в случае контрольных, так и инфицированных вирусом клеток. При заражении наблюдали плавное двукратное повышение уровня IL-8 через 24 и 48 часов. Уровень IL-8 через 8 часов после заражения был сравним с количеством IL-8 во внеклеточной среде контрольных клеток. К сожалению, сопоставить количество белка IL-8 с уровнем кодирующей его мРНК не представлялось возможным, так как используемые нами тест-системы для определения экспрессии цитокинов на уровне мРНК не включали IL-8. Через 24 часа после заражения вирус гриппа A/California/07/09 индуцировал секрецию TNF- α , которую не наблюдали ни через 8, ни через 48 часов после заражения. При этом максимальный уровень мРНК TNF- α в клетках наблюдали через 8 часов после заражения вирусом.

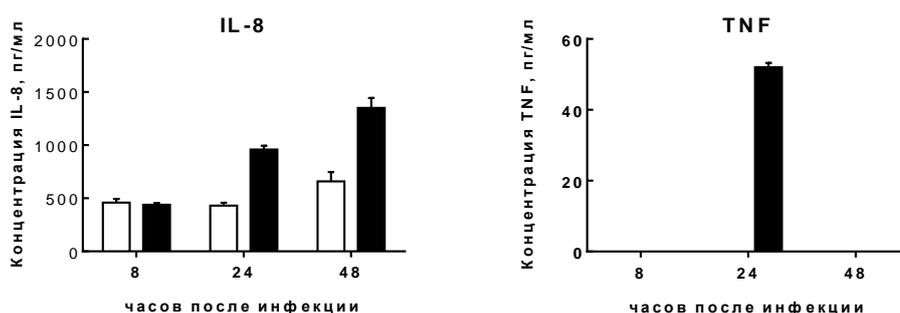


Рис. 12. Индукция цитокинового ответа в незаражённых клетках (□) и клетках A549, инфицированных вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1_{pdm09}) (■), через 8, 24 и 48 часов после инфицирования. На диаграмме представлены средние значения концентраций по трём биологическим репликам \pm О.С.

Представленные данные дают основание полагать, что при заражении эпителиальных клеток A549 вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1_{pdm09}) происходит регуляция уровня цитокинов на различных этапах экспрессии гена. В частности, несмотря на то что в клетках выявляли мРНК цитокинов IL-4 и IL-10 на всех сроках после заражения, во внеклеточной среде не было обнаружено соответствующих белковых продуктов. Это может быть связано с тем, что происходит блокирование трансляции и/или секреции цитокинов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе выполнения диссертационного исследования были разработаны три лабораторных образца тест-систем для мультиплексного определения экспрессии цитокинов человека: на основе олигонуклеотидного микрочипа и мультиплексной ПЦР с детекцией в режиме реального времени для оценки мРНК и на основе белкового микрочипа для количественного

выявления секретируемых клетками растворимых цитокинов в биологических жидкостях. Все три предложенных метода использовали для оценки цитокинового статуса в клетках A549 при инфицировании различными штаммами вируса гриппа А. Разработанные тест-системы были успешно верифицированы и могут быть использованы в дальнейшем как основа для создания отечественных коммерческих наборов для диагностики цитокинов.

ВЫВОДЫ

1. Разработан олигонуклеотидный микрочип для одновременной качественной детекции мРНК цитокинов IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 β , IL-18, IFN- γ и TNF- α . Предложенный мультиплексный подход является альтернативой традиционному методу ОТ-ПЦР.
2. На основе мультиплексной ПЦР в режиме реального времени разработана система, позволяющая проводить высокочувствительный одновременный количественный анализ мРНК IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 β , IL-18, IFN- γ и TNF- α человека.
3. Разработан белковый микрочип для специфического мультиплексного количественного анализа IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IFN- γ и TNF- α человека в диапазоне концентраций от 5 до 3800 пг/мл.
4. Удаление NS1 гена в вирусе гриппа A/Kurgan/5/05 (H5N1) приводит к повышению уровней мРНК IL-1 β , IL-6, TNF- α и активации IL-10 в инфицированных клетках A549 по сравнению с вирусом, содержащим полноразмерный NS1, и ингибирует синтез мРНК IL-4.
5. Вирусы гриппа A/California/07/09 (H1N1_{pdm09}), A/Victoria/361/11 (H3N2) и A/chicken/Kurgan/5/05 (H5N1) индуцируют в клетках A549 экспрессию мРНК IL-6 и провоспалительных цитокинов IL-1 β , TNF- α и IL-18, при этом существуют штамм-специфические различия в уровнях этих мРНК. Заражение вирусами гриппа A/Victoria/361/11 и A/California/07/09, но не вирусом гриппа A/chicken/Kurgan/5/05, активировало образование мРНК противовоспалительного цитокина IL-4. Появление мРНК IL-12 β наблюдается только в случае заражения клеток вирусом гриппа A/Victoria/361/11.
6. Вирус гриппа A/California/07/09 (H1N1_{pdm09}) индуцирует в инфицированных клетках A549 синтез мРНК IL-4, IL-10 и TNF- α , в то время как во внеклеточной среде выявляется только TNF- α .

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Монография:

1. Грипп: эпидемиология, диагностика, лечение, профилактика / Под редакцией акад. РАМН проф. О.И. Киселева, д-ра мед. наук Л.М. Цыбаловой, акад. РАМН проф. В.И. Покровского. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», – 2012. – 496 с.

Статьи:

1. Vasin, A.V. Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: An overview of recently discovered proteins / A.V. Vasin, O.A. Temkina, V.V. Egorov, S.A. Klotchenko, M.A. Plotnikova, O.I. Kiselev // **Virus Research**. – 2014. – № 185. – P. 53–63.
2. Васин, А.В. Универсальный диагностический олигонуклеотидный микрочип для определения и субтипирования вирусов гриппа А человека и животных / А.В. Васин,

Сандыбаев Н.Т., Плотникова М.А. и др. // **Вопросы вирусологии.** – 2013. – № 5. – С. 32–38.

3. Плотникова, М.А. Сравнение паттерна экспрессии мРНК цитокинов в эпителиальных клетках А-549, инфицированных вирусами гриппа А/Н1N1_{pdm09}, А/Н3N2 и А/Н5N1 / М.А. Плотникова, А.В. Васин, С.А. Клотченко и др. // **Цитокины и воспаление.** – 2013. – Т. 12 (№ 1–2). – С. 57–65.
4. Смирнова, Т.Д. Изучение влияния различных субтипов вируса гриппа А в присутствии противовирусных препаратов на пролиферацию и индукцию фактора некроза опухоли в клеточных линиях человека А-549 и ЕСV-304 // Т.Д. Смирнова, Д.М. Даниленко, М.А. Плотникова и др. // **Клеточные культуры. Информационный бюллетень.** – 2012. – Т. 28. – С. 37–49.
5. Плотникова, М.А. Применение твердофазного иммуноферментного анализа в формате микрочипа для количественного определения уровня цитокинов / М.А. Плотникова, С.А. Клотченко, В.В. Егоров и др. // **Медицинская иммунология.** – 2012. – Т. 14 (№ 4–5). – С. 415–418.
6. Плотникова, М.А. Олигонуклеотидный биочип для определения профиля экспрессии генов цитокинов человека / М.А. Плотникова, А.В. Васин, Е.Ю. Марочкина и др. // **Цитокины и воспаление.** – 2011. – Т. 10 (№ 2). – С. 5–9.

Тезисы:

1. Plotnikova, M. Development of multiplex real-time PCR for quantification of cytokines mRNA expression in influenza virus infected human cells / M. Plotnikova and A. Vasin. // **FEBS Journal.** – 2013. – Vol. 280, Supplement 1. – P. 282.
2. Plotnikova, M. Cytokines gene expression in human lung epithelial A549 cells induced by non-structural NS1 protein of influenza A viruses / M. Plotnikova, S. Klotchenko, A. Shurygina, A. Vasin // **European Journal of Human Genetics.** – 2013. – Vol. 21, Supplement 2. – P. 523–524.
3. Плотникова, М.А. Белковый микрочип для определения профиля экспрессии цитокинов / М.А. Плотникова, С.А. Клотченко, А.В. Васин // **Материалы IV Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням, Москва.** – 2012. – С. 300.
4. Плотникова, М.А. Разработка экспресс-системы для качественного и количественного определения цитокинов IL2, IL4, IL10, IFN γ и TNF человека на основе белковых микрочипов / М.А. Плотникова, С.А. Клотченко, В.В. Егоров и др. // **Тезисы VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика-2010», Москва.** – 2010. – С. 334–336.
5. Плотникова, М.А. Олигонуклеотидный биочип для определения уровня экспрессии мРНК цитокинов / М.А. Плотникова, С.А. Клотченко, О.А. Темкина и др. // **Материалы II Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням, Москва.** – 2010. – С. 242.
6. Васин, А.В. Сравнение 2D- и 3D-подложек для белковых микрочипов / А.В. Васин, М.А. Плотникова, С.А. Клотченко и др. // **Тезисы докладов участников Второго Международного форума по нанотехнологиям, Москва.** – 2009. – С. 601–603.
7. Плотникова, М.А. Разработка биочипа для определения профиля экспрессии цитокинов / М.А. Плотникова, С.А. Клотченко, О.А. Темкина и др. // **Тезисы Международной конференции «Новое поколение противовирусных вакцин», Санкт-Петербург.** – 2009. – С. 88–89.
8. Плотникова, М.А. Разработка системы определения цитокинов на основе белковых биочипов / М.А. Плотникова, С.А. Клотченко, О.А. Темкина и др. // **Тезисы 13-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пущино.** – 2009. – С. 36–37.
9. Плотникова, М.А. Разработка ДНК биочипа для определения экспрессии генов цитокинов при вирусных инфекциях / М.А. Плотникова, С.А. Клотченко, И.В. Крылова и др. // **Тезисы Международной научно-практической конференции «Перспективы сотрудничества государств-членов ШОС в противодействии угрозе инфекционных болезней», Новосибирск.** – 2009. – С. 168–170.
10. Васин, А.В. Агарозная подложка для белковых микрочипов, используемых в системе определения уровня цитокинов / А.В. Васин, М.А. Плотникова, В.В. Егоров и др. // **Тезисы 12-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пущино.** – 2008. – С. 11.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность и признательность своему научному руководителю – кандидату биологических наук Васину Андрею Владимировичу за предложенную интересную тему и внимательное отношение на всех этапах работы. Автор благодарит сотрудников лаборатории структурной и функциональной протеомики и других подразделений ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России за понимание, поддержку, консультации при выполнении научных исследований и дружеские советы на стадии написания работы.

Автор благодарит д.б.н. Кривицкую В.З., д.б.н. Жилинскую И.Н., д.б.н. Еропкина М.Ю., к.б.н. Слиту А.В. за исчерпывающую конструктивную критику и тщательное рецензирование работы. Автор также благодарит коллег и соавторов публикаций, принимавших участие в формировании интересных задач для апробации разработанных мультиплексных методов и оформлении результатов работы.

Автор выражает признательность директору ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, академику РАН, д.б.н., профессору Кисёлеву О.И. за всестороннюю поддержку работы.