

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГРИППА
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

На правах рукописи

**ПЛОТНИКОВА
Марина Александровна**

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

Специальность 03.02.02 – вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Васин Андрей Владимирович

Санкт-Петербург – 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Современные представления о цитокинах	11
1.1.1 Классификация и функции цитокинов	11
1.1.2 Цитокиновые рецепторы и общий механизм внутриклеточной передачи сигнала	15
1.2 Цитокины как медиаторы иммунного ответа.....	19
1.2.1 Цитокины и иммунный ответ при вирусных инфекциях.....	19
1.2.2 Роль цитокинов в иммунном ответе на инфекцию вирусом гриппа	27
1.3 Современные методы определения цитокинов	32
1.3.1 Особенности проведения анализа цитокинов	32
1.3.2 Методы выявления цитокинов	33
1.3.3 Технология микрочипов.....	35
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	44
2.1 Объекты.....	44
2.1.1 Клеточные культуры	44
2.1.2 Вирусы	45
2.2 Вирусологические методы	45
2.2.1 Определение инфекционной активности вируса	45
2.2.2 Стимуляция клеток ВГА	46
2.3 Иммунологические методы.....	46
2.3.1 «Сэндвич»-ИФА	46
2.3.2 Мультиплексный «сэндвич»-вариант МФА в формате микрочипа	47
2.4 Молекулярно-генетические методы	49
2.4.1 Экстракция РНК.....	49
2.4.2 Обратная транскрипция.....	49
2.4.3 Полимеразная цепная реакция	49
2.4.4 Электрофоретическое разделение ДНК в агарозном геле	50
2.4.5 Печать олигонуклеотидного микрочипа	50
2.4.6 Подготовка пробы кДНК для гибридизации методом ОТ-ПЦР.....	51
2.4.7 Подготовка пробы амплифицированной мРНК для гибридизации методом ОТ-IVT.	51
2.4.8 Подготовка библиотек кДНК для гибридизации с использованием набора MINT..	52
2.4.9 Гибридизация на олигонуклеотидном микрочипе	52
2.4.10 Мультиплексная ПЦР с детекцией в режиме реального времени	53
2.4.11 Детекция вирусной РНК методом ПЦР	54
2.5 Методы вычислительной биологии.....	54
2.5.1 Филогенетический анализ гена NS1 вируса гриппа типа А.....	54
2.5.2 Общие стратегии при конструировании олигонуклеотидных зондов и праймеров	55
2.5.3 Анализ изображения, получаемого после гибридизации	56
2.5.4 Анализ результатов мПЦР	57
2.5.5 Статистические методы анализа	57
3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	58
3.1 Выбор штаммов вирусов гриппа А и клеточной модели для изучения особенностей экспрессии цитокинов.....	58
3.2 Разработка олигонуклеотидного микрочипа для выявления мРНК цитокинов и его применение для изучения роли белка NS1 вируса гриппа А/Kurgan/5/05 (H5N1) в индукции цитокинового ответа	64
3.2.1 Подбор олигонуклеотидных зондов и праймеров для мРНК цитокинов-мишеней IL- 1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 β , IL-18, IFN- γ , TNF- α человека.....	64

3.2.2	Создание лабораторного образца олигонуклеотидного микрочипа для анализа экспрессии цитокинов и выбор условий проведения основных этапов гибридизации.....	66
3.2.3	Выбор условий проведения основных этапов гибридизации на олигонуклеотидном микрочипе.....	68
3.2.4	Оценка аналитической чувствительности олигонуклеотидного микрочипа	70
3.2.5	Выбор способа подготовки флуоресцентно меченой пробы для анализа на микрочипе на примере клеток A549, инфицированных вирусом гриппа A/Kurgan/5/05 (H5N1).	71
3.2.6	Анализ роли белка NS1 вируса гриппа A/Kurgan/5/05 (H5N1) в индукции цитокинового ответа в клетках A549 методом олигонуклеотидного микрочипа и ОТ-ПЦР	75
3.3	Разработка метода определения уровня цитокинов с использованием мультиплексной ПЦР в режиме реального времени.....	77
3.3.1	Подбор праймеров и TaqMan зондов и оптимизация условий проведения реакции мультиплексной ПЦР в режиме реального времени для выявления IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 β , IL-18, IFN- γ , TNF- α человека	77
3.3.2	Проверка валидности системы мПЦР для оценки экспрессии цитокинов.....	83
3.4	Сравнение паттернов экспрессии мРНК цитокинов в клетках A549, инфицированных вирусами гриппа A/H1N1 _{pdm09} , A/H3N2 и A/H5N1, методом мультиплексной ПЦР	86
3.5	Разработка белкового микрочипа для количественного выявления цитокинов.....	91
3.5.1	Выбор моноклональных антител и рекомбинантных цитокинов для использования в микрочипе	91
3.5.2	Дизайн белкового биочипа для выявления IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IFN- γ и TNF- α человека.	92
3.5.3	Анализ специфичности и чувствительности белкового микрочипа с помощью рекомбинантных цитокинов.....	95
3.5.4	Анализ влияния гена NS1 вируса гриппа A/H5N1 на спектр цитокинов, секретируемых клетками МКПК методами биочипа и традиционного ИФА	98
3.6	Анализ особенностей экспрессии цитокинов клетками A549 на уровне транскрипции и на уровне трансляции при заражении вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1 _{pdm09}).....	99
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	103
	ВЫВОДЫ.....	106
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	107
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	108
	СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.....	116

ВВЕДЕНИЕ

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 приобретенного иммунитета. Кроме того, в процессе реассортации геномных сегментов в популяции человека могут появляться новые несвойственные ей штаммы вируса гриппа, обладающие пандемическим потенциалом. Примерами таких вирусов являются вирус «испанки» 1918 года и 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 воздействия 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 типа 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 et al., 2009*). Данное явление было хорошо изучено на высокопатогенных вирусах гриппа А/Н5N1 человека, для которых характерна высокая степень летальности, во многом вызванная 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., 2001; 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. Анализ 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 секретируемых 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 и методики 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.

Объем 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.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Современные представления о цитокинах

1.1.1 Классификация и функции цитокинов

Цитокины – биологически активные молекулы белковой природы, регулирующие широкий спектр протекающих в организме процессов и вырабатываемые клетками при воспалительных реакциях, развитии и формировании иммунного ответа, дифференциации, пролиферации и апоптозе (*Goldsby et al., 2003*). По значимости выполняемых биологических функций цитокины можно рассматривать как самостоятельную систему регуляции, которая участвует в поддержании гомеостаза и обеспечивает согласованность действий иммунной, эндокринной и нервной систем в нормальных условиях и в ответ на патологические воздействия.

Термин «цитокины» был предложен в 1974 г. С. Коэном (*Cohen et al., 1974*) и в настоящее время используется для общего обозначения лимфокинов, монокинов, интерлейкинов, интерферонов и хемокинов. Молекулы цитокинов могут быть как простыми полипептидами, так и сложными белками, состоящими из нескольких одинаковых или разных субъединиц с молекулярной массой от 5 до 50 кДа (*Симбирцев, 2004*). Многие цитокины являются гликозилированными. Система цитокинов насчитывает около 200 индивидуальных молекул. Несмотря на то, что цитокины имеют ряд общих биохимических и функциональных характеристик, их номенклатура и классификация затруднены.

В соответствии с биохимическими свойствами и функциями цитокины можно условно разделить на следующие группы (*Ярилин, 1999; Симбирцев, 2004; Goldsby et al, 2003*):

- интерлейкины, выполняющие функции медиаторов межклеточных взаимодействий (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10, IL-12 и др.);
- факторы некроза опухолей, обладающие цитотоксической и цитостатической активностями в отношении многих чужеродных, в том числе опухолевых, клеток (TNF- α , TNF- β , лимфотоксин- β);

- колониестимулирующие факторы, вызывающие размножение и дифференцировку клеток-предшественников различных ростков гемопоэза на разных этапах их созревания (GM-CSF, G-CSF, IL-3, эритропоэтин и др.);
- интерфероны, участвующие в регуляции иммунного ответа в качестве противовирусных агентов широкого спектра действия (IFN- α , IFN- β , IFN- γ);
- хемокины или хемотаксические цитокины, обеспечивающие активацию миграции лейкоцитов различных типов и некоторых других клеток (RANTES, IL-8, подсемейства хемокинов CC, CXC, C);
- трансформирующие ростовые факторы, участвующие в регуляции роста клеток, их дифференцировке и апоптозе, а также в модуляции иммунной системы (TGFB1) (Мордвинов и Фурман, 2009).

Биологические функции цитокинов и вызываемые ими цитологические эффекты направлены на регуляцию трёх групп физиологических процессов: иммунного ответа, кроветворения (система гемопоэза) и воспаления. О биологическом действии цитокинов как медиаторов и регуляторов механизма воспаления, врождённого и адаптивного иммунитетов будет подробно написано в п. 1.2.1.

Экспрессия генов цитокинов не является конститутивной. В отсутствие эндогенного или экзогенного воздействий большинство цитокинов в клетке не синтезируются. Исключение составляют гемопоэтические цитокины, которые локально функционируют практически постоянно, а также некоторые другие цитокины, спонтанно продуцируемые в малых количествах (например, IL-6 и IL-15 в моноцитах) (Ярилин, 1999). Различные типы клеток могут синтезировать цитокины в ответ на разнообразные стимулы. При этом спектр продуцируемых клеткой цитокинов зависит от природы, продолжительности и интенсивности воздействия индуктора, а также от присутствия дополнительных факторов: других цитокинов, гормонов, межклеточных взаимодействий (Feldmann *et al.*, 2000).

Один и тот же цитокин может продуцироваться различными по гистогенетическому происхождению клетками организма в разных органах,

однако значительная часть цитокинов преимущественно синтезируется только одним типом клеток (*Симбирцев, 2002; Fainboim et al., 2007*). Можно выделить три относительно автономные группы продуцентов цитокинов: стромальные клетки, моноциты/макрофаги и Т-лимфоциты (табл. 1.1). Они характеризуются своим собственным типом ответа на активирующие воздействия, а также индивидуальным, хотя и значительно перекрывающимся, набором продуцируемых цитокинов и теми процессами, реализацию которых они обеспечивают (*Ярилин, 1999*).

Таблица 1.1
Основные клетки-продуценты цитокинов (на основе книги Ярилина, 1999)

Клетки-продуценты	Процессы, реализуемые клетками	Индукторы цитокинов	Кинетика выработки цитокинов	Продуцируемые цитокины
Стромальные клетки (фибробласты, эндотелиальные клетки)	отвечают за гемопоз	контактные взаимодействия, бактериальные продукты	в пределах часа мРНК, через 3–4 ч пик секреции цитокинов	GM-CSF, G-CSF, M-CSF, IFN- β , TGF- β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-11
Моноциты/макрофаги	синтез медиаторов воспалительных процессов	бактерии и их продукты, полиэлектролиты, форболовые эфиры	в пределах часа мРНК, через 6–14 ч пик секреции цитокинов	IL-1, IL-6, TNF- α , IL-10, IL-12, IL-15, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, TGF- β , IFN- α , хемокины
Т-лимфоциты	развитие антиген-специфической составляющей иммунного ответа	клеточный ответ: связывание антигена/митогена через TCR-CD3/CD28, IL-12	через 5–8 ч мРНК, через 10–48 ч пик секреции цитокинов	IL-2, IFN- γ , TNF- α , TNF- β , IL-3, GM-CSF, хемокины
		гуморальный ответ: связывание антигена/митогена, IL-4	через 5–8 ч мРНК, через 10–48 ч пик секреции цитокинов	IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, GM-CSF, хемокины

Тканеспецифический характер экспрессии генов цитокинов формируется в процессе клеточной дифференцировки и часто определяется присутствием в клетках специфического набора транскрипционных факторов (*Rudensky et al., 2006*). Регуляция экспрессии генов цитокинов осуществляется на уровне транскрипции. В ней участвует ряд активируемых сигнал-зависимых

транскрипционных факторов, таких как NF-κB, NF-AT, AP-1, и *cis*-регуляторные элементы, локализованные в пределах проксимального промотора (*Rao et al., 1997; Tsuruta et al., 1998*). Структура промоторных участков генов различных цитокинов и их рецепторов отличается, хотя и содержит некоторые общие элементы. Факторы транскрипции, отвечающие за экспрессию генов цитокинов и их рецепторов, в покоящейся клетке не активны, они формируются в результате передачи активационного сигнала. Синтез цитокинов носит кратковременный характер и зависит от разнообразных механизмов авторегуляции. В основе «выключения» синтеза цитокинов, как правило, лежат события, ведущие к блокаде транскрипции посредством простагландинов, кортикостероидных гормонов и некоторых других факторов (*Kunkel et al., 1988; Симбирцев, 2002*) и/или сокращению времени жизни мРНК за счёт наличия AU-богатых участков в 3'-нетранслируемой области (*Shaw&Kamen, 1986*). Цикл продукции цитокинов при нормальных условиях продолжается от нескольких часов до нескольких дней.

Регуляторная система цитокинов обладает рядом особенностей. Во-первых, цитокины обладают плеiotропностью, то есть один и тот же цитокин способен действовать на разные типы клеток, вызывая в них различные эффекты. Во-вторых, для цитокинов характерна взаимозаменяемость и многофункциональность биологического действия: несколько разных цитокинов могут вызывать один и тот же биологический эффект или обладать сходной активностью. В-третьих, цитокины могут реагировать на сами клетки-продуценты цитокинов (аутокринно); на расположенные рядом клетки (паракринно), например, в очаге воспаления или в лимфоидном органе; на клетки-мишени любых органов и тканей после попадания цитокина в кровеносную систему (эндокринно) (*Мордвинов и Фурман, 2009; Кадагидзе, 2003*). В-четвёртых, *in vivo* цитокины очень редко, если вообще, реагируют по отдельности. Клетка, как правило, подвержена действию целого комплекса цитокинов, стимулирующих или ингибирующих синтез самих себя и/или других цитокинов. Такая особенность функционирования системы цитокинов приводит к их каскадной активности и формированию разветвлённой и многоуровневой сети, биологическим

(биохимическим) понятием которой является «цитокиновая среда». Цитокиновая среда характеризуется высокой надёжностью и обеспечивает кооперацию клеток иммунной системы.

1.1.2 Цитокиновые рецепторы и общий механизм внутриклеточной передачи сигнала

Цитокины реализуют свои биологические функции путём активации специфических рецепторов, которые экспрессируются разными типами чувствительных клеток в малых количествах (от 100 до 10000 рецепторов на клетку) (*Fischereder, 2007*). Следует отметить, что индукторами цитокина и его рецептора обычно являются одни и те же факторы. При этом экспрессия генов рецепторов, как правило, продолжается дольше, чем экспрессия генов самих цитокинов. Например, на уровне индивидуальной клетки белковая продукция IL-2 осуществляется на протяжении суток после антигенной стимуляции, в то время как экспрессия его рецептора продолжается в течение трёх суток (*Ярилин, 1999*).

Рецепторы цитокинов, как правило, связывают лиганды с высокой степенью аффинности. Константы диссоциации комплекса цитокина со своим рецептором находятся в пределах 10^{-10} – 10^{-12} М. Для сравнения, константы диссоциации комплексов антиген-антитело составляют 10^{-7} – 10^{-11} М (*Abbas et al., 2011*). Все цитокиновые рецепторы являются трансмембранными белками, состоящими из одной и более субъединиц. Некоторые из субъединиц могут являться общими для нескольких цитокинов. Внеклеточная часть рецепторов участвует в узнавании и связывании цитокинов, а цитоплазматическая отвечает за активацию внутриклеточного сигнального пути. Связываясь с рецепторами, цитокины запускают каскад передачи сигнала, приводящий к активации различных транскрипционных факторов (*Поём и др., 2000; Whiteside, 1994*).

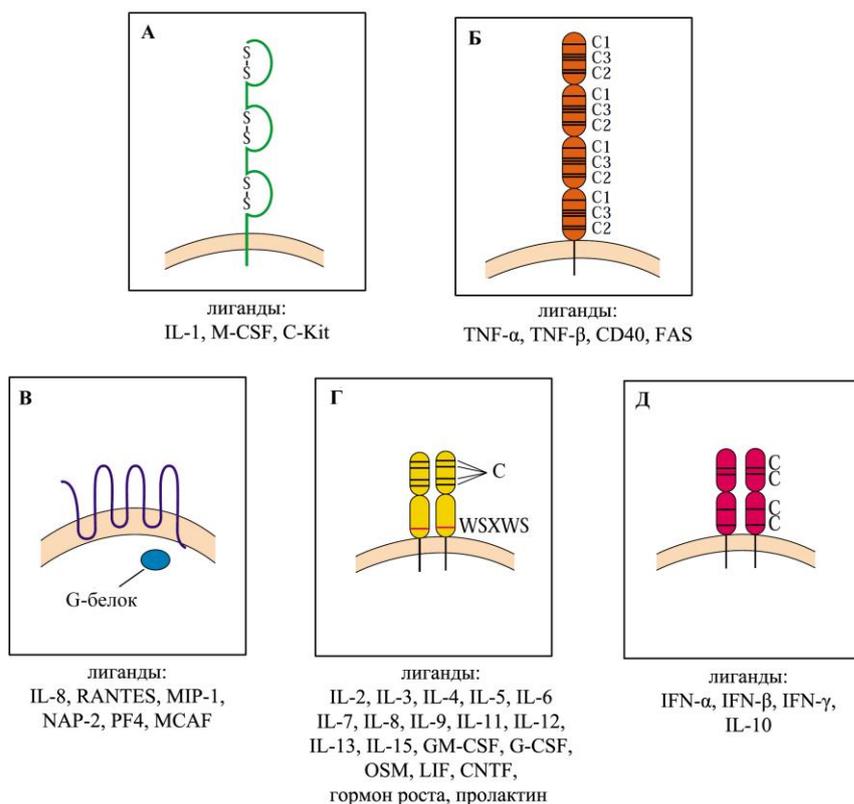


Рисунок 1.1 Рецепторы цитокинов и их лиганды (Goldsby et al., 2003) А. Суперсемейство иммуноглобулиновых рецепторов. Б. Семейство рецепторов TNF. В. Рецепторы хемокинов. Г. Цитокиновые рецепторы I типа. Д. Цитокиновые рецепторы II типа. Схемы показывают структурные особенности пяти основных семейств цитокиновых рецепторов. Рецепторы большинства интерлейкинов принадлежат к цитокиновым рецепторам I типа. Буквами «С» отмечены консервативные остатки цистеина.

В соответствии с классификацией, основанной на структурной гомологии цитокин-связывающих доменов, цитокиновые рецепторы можно разделить на 5 основных семейств (рис. 1.1) (Goldsby et al., 2003; . Abbas et al., 2011):

- суперсемейство рецепторов, внеклеточные домены которых имеют иммуноглобулин подобную структуру.
- семейство рецепторов TNF состоит из рецепторов, содержащих консервативные богатые цистеином внеклеточные домены. Не все рецепторы TNF являются цитокиновыми, среди них CD27, CD30, CD40 и FAS. Активация рецепторов TNF вызывает разнообразные клеточные ответы: от стимуляции экспрессии генов транскрипционных факторов NF- κ B и AP-1 до индукции апоптоза (Smith et al., 1994; Gravestain&Borst, 1998).
- семейство хемокиновых рецепторов (также известны как семиспиральные рецепторы, серпентины, сопряжённые с G-белком рецепторы), содержат семь α -

спиральных доменов, пронизывающих мембрану.

- цитокиновые рецепторы I типа, также называемые гемопоэтиновыми рецепторами, содержат во внеклеточном домене консервативные аминокислотные мотивы, такие как четыре консервативных по положению остатка цистеина (CCCC) и обращённую к мембране последовательность триптофан-серин-Х-триптофан-серин (WSXWS), где Х – любая аминокислота.

- цитокиновые рецепторы II типа, схожие по строению с цитокиновыми рецепторами I типа, также обладают консервативными CCCC мотивами, однако, не имеют последовательности WSXWS. Изначально предполагали, что лигандами для рецепторов этого семейства являются только интерфероны α , β и γ , однако, впоследствии было показано, что цитокиновые рецепторы II типа также связывают IL-10 (*Gadina et al., 2001*).

Одним из наиболее понятных и хорошо изученных механизмов передачи цитокинами внутриклеточного сигнала является JAK/STAT система сигнальной трансдукции, характерная для цитокиновых рецепторов I и II типов (*Abbas et al., 2011*) (рис. 1.2). Специфичность цитокин индуцированного клеточного ответа обусловлена тем, что различные рецепторы цитокинов обладают определённой уникальной трёхмерной структурой, вследствие чего строго специфически связывают и активируют различные комбинации JAK-тирозинкиназ и транскрипционных факторов STAT (*Sadowski et al., 1993*). Например, цитокины IL-2 и IL-4 взаимодействуют с «общей» субъединицей γ рецептора IL-2 и активируют молекулы JAK1 и JAK3, при этом в случае IL-4 фосфорилируется молекула STAT6, а в случае IL-2 – образующие гетеродимер субъединицы STAT5a и STAT5b (*Abbas et al., 2011, Ройт и др., 2000*). Функциональная гибкость сигнальных систем возрастает ещё больше благодаря тому, что активировать факторы STAT могут не только тирозинкиназы JAK, но и другие киназы, в том числе запускающие сигналы апоптоза. Так, в случае TNF- α и IL-1 β действует механизм внутриклеточной передачи сигнала с участием Ras-зависимых MAP-киназ, которые активируют факторы транскрипции AP-1 и NF- κ B (*Ройт и др., 2000*). Известны механизмы регуляции биологических функций цитокинов,

которые основаны либо на подавлении JAK/STAT системы сигнальной трансдукции, либо на изменении взаимодействия внеклеточной части рецептора и соответствующего цитокина.

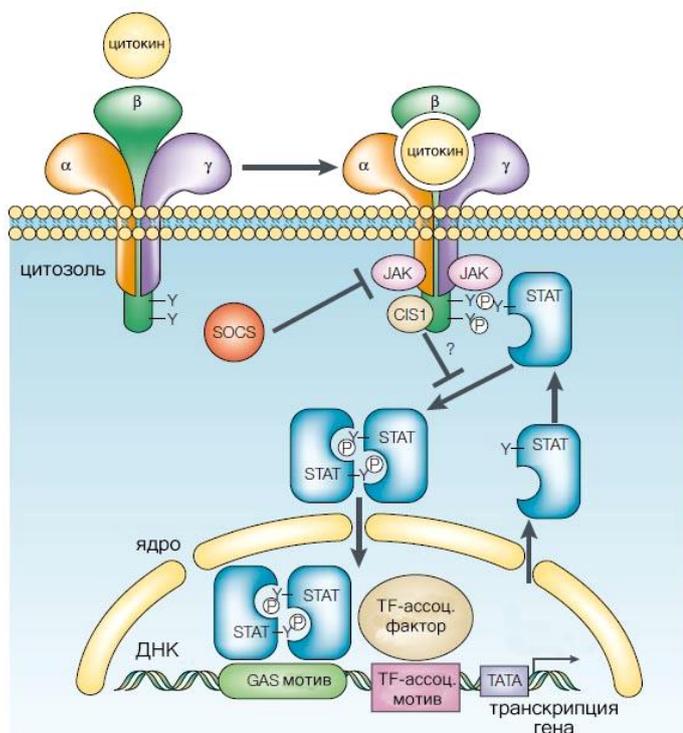


Рисунок 1.2 Схема пути внутриклеточной передачи сигнала от цитокина к соответствующему гену-мишени. При связывании цитокина со своим рецептором происходит сближение субъединиц рецепторной молекулы, приводящее к активации тирозинкиназы JAK (Warren, 2001). Активированные JAK фосфорилируют тирозиновые остатки в цитоплазматической части рецепторов. Некоторые из таких фосфорилированных фрагментов рецепторов узнают SH2-домены мономеров цитозольных белков STAT, в результате чего последние также присоединяются к рецепторам и фосфорилируются JAK (Becker et al, 1998). Фосфорилированные молекулы STAT диссоциируют от рецептора. SH2-домены одной молекулы STAT способны связываться с фосфотирозин содержащими последовательностями другой молекулы STAT, формируя гомо- и гетеродимеры. Димеры проникают в ядро, где непосредственно связываются с активируемыми этим цитокином энхансерами, запуская и усиливая транскрипцию соответствующего гена.

В подавлении активности цитокинов на внутриклеточном уровне могут участвовать различные белки: CIS (cytokine inducible SH2-containing protein), SOCS (suppressor of cytokine signaling protein), тирозинфосфатазы и другие супрессоры (Yoshimura et al., 1995; Starr et al., 1997; Abbas et al., 2011).

Регуляторы, действующие на внеклеточном уровне, связываются с наружной частью цитокинового рецептора, но не запускают сигнальную систему (например, IL-1R α), или ассоциируются непосредственно с цитокином и изменяют

его активность (растворимые рецепторы). Растворимые рецепторы, обнаруженные для IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IFN- γ и TNF- α , могут функционировать как агонисты, так и как антагонисты цитокинов (*Levine, 2004*).

В цитокин-индуцируемые сигнальные каскады часто вмешиваются вирусы, которые синтезируют цитокин-связывающие белки или гомологи цитокинов. Например, вирус оспы и некоторые другие представители семейства *Poxviridae* кодируют растворимые белки, связывающие TNF- α и IL-1; вирус Эпштейна – Барр семейства *Herpesviridae* кодирует вирусный гомолог IL-10, связывание которого с соответствующим рецептором приводит к подавлению Th1-опосредованного противовирусного ответа (*Goldsby et al., 2003*). Использование цитокин-связывающих белков и гомологов цитокинов позволяет вирусам манипулировать иммунным ответом и ускользать от защитных реакций хозяина.

1.2 Цитокины как медиаторы иммунного ответа

1.2.1 Цитокины и иммунный ответ при вирусных инфекциях

В развитии иммунного ответа принимают участие различные иммунокомпетентные клетки лимфоидного (В- и Т-лимфоциты) и миелоидного (нейтрофилы, моноциты, дендритные клетки и др.) рядов, а также инфицированные клетки (*McAdams et al., 1995*). Дифференцировка, созревание и комплекс взаимодействий между этими клетками в процессе иммунного ответа опосредованы цитокинами (*Goldsby et al., 2003*).

Защита организма от инфекции осуществляется системами врождённого и приобретённого (адаптивного) иммунитета. В основе этих систем лежат разные принципы. Врождённый иммунитет функционирует, опираясь на воспаление и фагоцитоз. Приобретённый иммунитет использует антитела и иммунные лимфоциты (*Абелев, 1998*).

Врождённый иммунитет. Врождённый иммунитет, также называемый конститутивным или естественным, является ранней фазой защиты организма при внедрении патогенного микроорганизма или вируса. Он состоит из клеточных и биохимических защитных механизмов, которые либо функционируют до встречи

с инфекционным агентом (эпителиальный барьер кожи и выстилающие ткани желудочно-кишечного и респираторного трактов), либо в норме неактивны, но быстро активируются в ответ на внедрение патогена (фагоциты и система комплемента).

Основными продуцентами цитокинов врождённого иммунитета являются активированные дендритные клетки и макрофаги или их предшественники (моноциты), циркулирующие в кровеносной системе. В ответ на инвазию вирусов происходит активация паттерн-распознающих рецепторов, расположенных на поверхности внутриклеточных компартментов, таких как эндосомы, лизосомы или эндоплазматический ретикулум (*Kumagai et al., 2008; Lester&Li, 2014*). Ответ на вирусную инфекцию со стороны врождённой иммунной системы обеспечивают три класса рецепторов: Toll-подобные (TLR), RIG-I-подобные (RLR) и Nod-подобные (NLR) рецепторы (рис. 1.3).

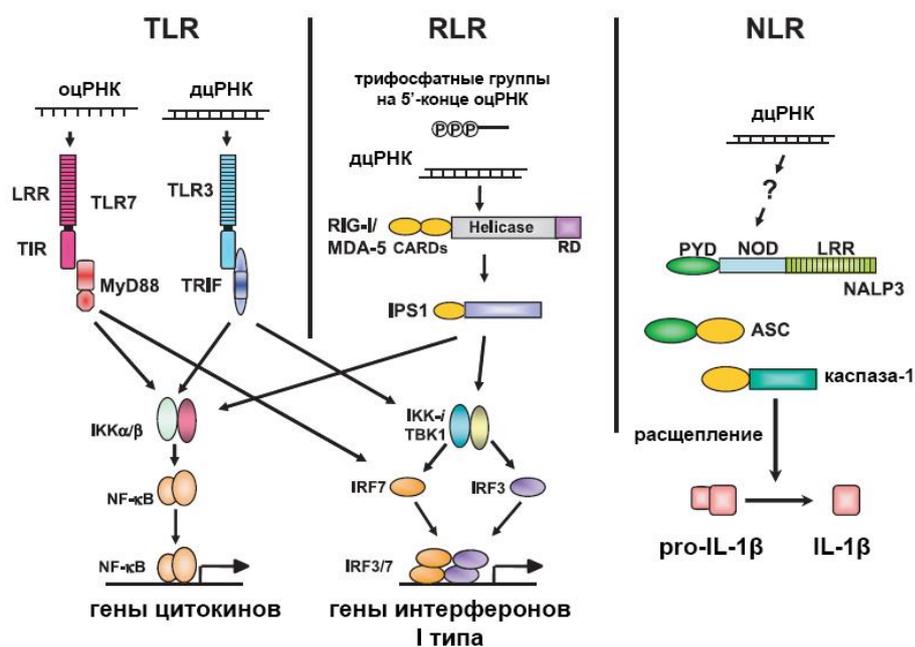


Рисунок 1.3 Три класса паттерн-распознающих рецепторов, обеспечивающих иммунный ответ на РНК-содержащие вирусы. Паттерн-распознающие рецепторы узнают различные молекулярные структуры вирусной природы, такие как дцРНК, G/U богатые области в оцРНК, РНК с трифосфатными группами на 5'-конце (*Takeda&Akira, 2005*). Связывание TLR (TLR3, TLR7/TLR8) с молекулярными компонентами патогена приводит к активации экспрессии генов провоспалительных цитокинов и хемокинов. NLR участвуют в регуляции продукции цитокинов семейства IL-1 (IL-1β, IL-18 и IL-33), обеспечивая их созревание в результате протеолитической активации каспазой-1. Активация RLR индуцирует синтез интерферонов I типа (*Takeuchi&Akira, 2009*).

Связывание паттерн-распознающих рецепторов с различными молекулярными компонентами патогена запускает внутриклеточные пути, индуцирующие систему цитокинов.

Главным гуморальным фактором противовирусной защиты является система интерферонов (Ank et al., 2006). Интерфероны I типа (IFN- α , IFN- β , IFN- ω) вырабатываются непосредственно в ответ на внедрение вирусов, после чего частично подавляют вирусную репликацию и ограничивают распространение вирусного потомства. Синтез интерферонов I типа приводит к образованию IL-6, IL-12, IL-18 и TNF- α в клетках. IFN- γ , относящийся к интерферонам II типа, продуцируется в ответ на узнавание инфицированных клеток активированными Т-лимфоцитами и NK-клетками (рис. 1.4 А) (Vilcek & Sen, 1996). IFN- γ индуцирует экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости I и II типов (МНС-I и МНС-II), обеспечивающих эффективную презентацию антигенов. Кроме того, IFN- γ регулирует продукцию и секрецию других цитокинов (Фрейдлин, 1998).

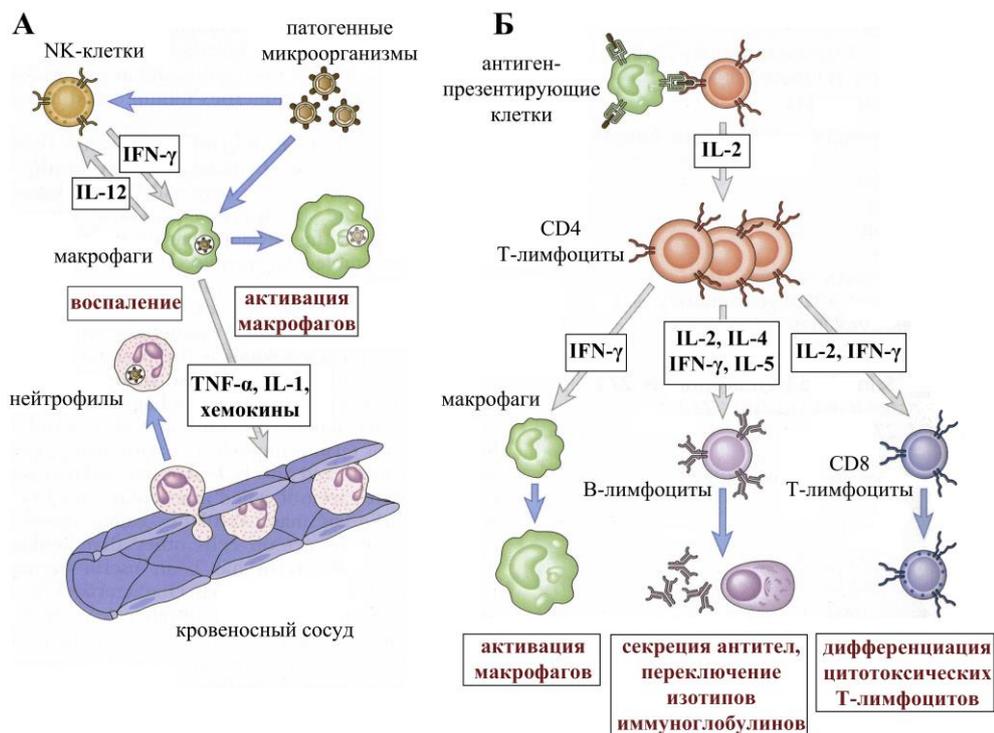


Рисунок 1.4 Функции цитокинов при иммунном ответе. **А.** Врожденный иммунитет. При врожденном иммунном ответе цитокины, секретируемые активированными макрофагами и NK-клетками, формируют воспалительную реакцию и обеспечивают раннюю защиту организма от патогенов. **Б.** Адаптивный иммунитет. При адаптивном иммунном ответе цитокины контролируют пролиферацию и дифференциацию стимулированных антигеном лимфоцитов и активируют эффекторные клетки (Abbas et al., 2011).

TNF- α и IL-1 воздействуют на эндотелиальные клетки кровеносных сосудов, примыкающих к зоне инфекции (рис. 1.4 А), и индуцируют экспрессию на клеточной мембране адгезионных молекул и лигандов интегринов, главным образом VCAM-1 и ICAM-1, которые запускают механизм выхода нейтрофилов и моноцитов из кровяного русла в зону инфекции (*Rot&von Andrian, 2004*). Процесс миграции также активно стимулируется хемокинами, вызывая клеточную реакцию врождённого иммунитета, называемую воспалением.

Цитокины, участвующие в формировании воспалительного иммунного ответа, подразделяют на провоспалительные (IL-1 α , IL-1 β , IL-18, TNF- α , IFN- γ , IL-8 и IL-12), противовоспалительные (IL-4, IL-10, IL-13, IFN- α и TGF- β) и представителей семейства IL-6, функции которых амбивалентны и зависят от фазы иммунного ответа (*Koj, 2008*). Провоспалительные цитокины отвечают за индукцию лихорадки и процессов катаболизма мышечной ткани, активацию мононуклеарных фагоцитов, стимуляцию синтеза белков острой фазы и обеспечивают воспалительный процесс, приводящий к уничтожению патогена. В ограничении развития воспаления и в поддержании гомеостаза при воспалительной реакции большую роль играют противовоспалительные цитокины. Как правило, они подавляют синтез провоспалительных цитокинов. Дисбаланс между провоспалительными и противовоспалительными цитокинами имеет ключевое значение в развитии аутоиммунных состояний, хронизации и прогрессировании воспалительных заболеваний.

Таким образом, к цитокинам врождённого иммунитета можно отнести цитокины (табл. 1.2), контролирующие ответ на вирусные инфекции (IFN- α и IFN- β), стимулирующие пролиферацию и активацию NK-клеток (IL-12 и IL-15), активирующие макрофаги (IFN- γ) и медиаторы воспаления (TNF- α , IL-1 и хемокины) (*Abbas et al., 2011*).

Приобретённый иммунитет. Дальнейшее развитие реакций врождённого иммунитета приводит к активации механизмов приобретённого иммунитета. Цитокины приобретённого иммунитета (табл. 1.2) контролируют пролиферацию и дифференциацию лимфоцитов после распознавания антигена в ранней фазе

иммунного ответа, а также активируют специализированные эффекторные клетки (мононуклеарные фагоциты, нейтрофилы и эозинофилы) для устранения антигенов при поздней (эффекторной) фазе иммунного ответа (*Abbas et al., 2011*).

Таблица 1.2

Основные цитокины, участвующие в иммунном ответе (*Abbas et al., 2011*)

Цитокин	Какие клетки секретируют	Мишени и эффекты
<i>Некоторые цитокины врождённого иммунитета</i>		
Интерлейкин 1 (IL-1)	моноциты, макрофаги, эндотелиальные клетки, эпителиальные клетки	Эндотелиальные клетки: активация (воспаление, коагуляция) Гипоталамус: лихорадка Печень: индукция белков острой фазы воспаления
Фактор некроза опухолей α (TNF- α)	макрофаги, Т-лимфоциты	Эндотелиальные клетки: активация (воспаление, коагуляция) Нейтрофилы: активация Гипоталамус: лихорадка Печень: индукция белков острой фазы воспаления Мышечные и жировые ткани: катаболизм (кахексия) Различные типы клеток: апоптоз
Интерлейкин 12 (IL-12)	макрофаги, дендритные клетки	Т-лимфоциты: дифференциация по Th1-типу NK-клетки и Т-лимфоциты: синтез IFN- γ , увеличение цитолитической активности
Интерлейкин 6 (IL-6)	макрофаги, эндотелиальные клетки	Печень: индукция белков острой фазы воспаления В-лимфоциты: пролиферация и индукция синтеза антител
Интерфероны I типа (IFN- α , IFN- β)	IFN- α : макрофаги IFN- β : фибробласты	Все типы клеток: стимуляция противовирусного состояния, увеличение экспрессии молекул МНС-I NK-клетки: активация
Интерлейкин-10 (IL-10)	макрофаги, Т-лимфоциты (главным образом Th2)	Макрофаги, дендритные клетки: ингибирование продукции IL-12, экспрессия костимуляторов и молекул МНС-II
Интерлейкин-18 (IL-18)	макрофаги	NK-клетки и Т-лимфоциты: синтез IFN- γ
Интерлейкин-15 (IL-15)	макрофаги	NK-клетки: пролиферация Т-лимфоциты: пролиферация
Хемокины	макрофаги, тромбоциты, эндотелиальные клетки, Т-лимфоциты, фибробласты	Лейкоциты: хемотаксис, активация процессов миграции в ткани

Таблица 1.2 (продолжение)

<i>Некоторые цитокины адаптивного иммунитета</i>		
Интерлейкин 2 (IL-2)	Т-лимфоциты	Т-лимфоциты: пролиферация, увеличение синтеза цитокинов, инициация апоптоза через FAS-рецептор NK-клетки: пролиферация, активация В-лимфоциты: пролиферация и индукция синтеза антител
Интерлейкин 4 (IL-4)	Th2-клетки, тучные клетки	В-лимфоциты: переключение синтеза изотипов иммуноглобулинов на IgE Т-лимфоциты: пролиферация, дифференциация по Th2-типу Макрофаги: подавление активации, индуцированной IFN- γ Тучные клетки: пролиферация
Интерлейкин 5 (IL-5)	Th2-клетки	Эозинофилы: активация В-лимфоциты: пролиферация, продукция IgA
Трансформирующий ростовой фактор β (TGF- β)	Т-лимфоциты, макрофаги, другие типы клеток	Т-лимфоциты: ингибирование пролиферации и эффекторных функций В-лимфоциты: ингибирование пролиферации, продукция IgE Макрофаги: ингибирование
Интерферон γ (IFN- γ)*	Th1-клетки, цитотоксические Т-лимфоциты, NK-клетки	Макрофаги: активация В-лимфоциты: переключение синтеза изотипов иммуноглобулинов Т-лимфоциты: дифференциация по Th1-типу Различные типы клеток: увеличение экспрессии молекул MHC-I и MHC-II, усиление процесса презентации антигена

* относится к цитокинам врождённого и приобретённого иммунитета

Среди клеток иммунной системы – продуцентов цитокинов – значительное место занимают Т-лимфоциты, являющиеся важнейшим компонентом системы клеточного иммунитета (*Mossman, 1986*). В тимусе происходит дифференцировка Т-лимфоцитов на функциональные субпопуляции Т-хелперов, несущих на поверхности клетки молекулы CD4, Т-киллеров (цитотоксических Т-лимфоцитов), поверхность которых содержит маркер CD8, и Т-супрессоров (*Галактионов, 1998*). Субпопуляция Т-хелперов выполняет ведущую роль в запуске и регуляции иммунного ответа, проявляя большинство своих хелперных функций (участие в созревании цитотоксических Т-лимфоцитов, пролиферации и дифференциации В-лимфоцитов, активации макрофагов) посредством секреции цитокинов (рис. 1.4 Б). Хотя цитотоксические Т-лимфоциты также вырабатывают

цитокины, их набор, как правило, более ограничен по сравнению с Т-хелперами (*Goldsby et al., 2003*).

Приобретённый иммунитет является строго специализированным. В ответ на разные типы патогенов включается определённый защитный механизм, обусловленный дифференциацией Т-хелперов (рис. 1.5) под воздействием цитокинов, секретируемых антиген-презентирующими клетками (АПК) или непосредственно самими Т-лимфоцитами (*Abbas et al., 2011*). Недифференцированные Т-лимфоциты (Th0), образующиеся в тимусе, способны экспрессировать практически весь спектр Т-клеточных цитокинов. Они представляют собой клетки-предшественники двух зрелых субпопуляций Т-хелперов Th1 и Th2, каждая из которых секретирует свой индивидуальный спектр цитокинов и инициирует развитие иммунного ответа по клеточному (Th1) или гуморальному (Th2) типу (*Симбирцев, 2002*).

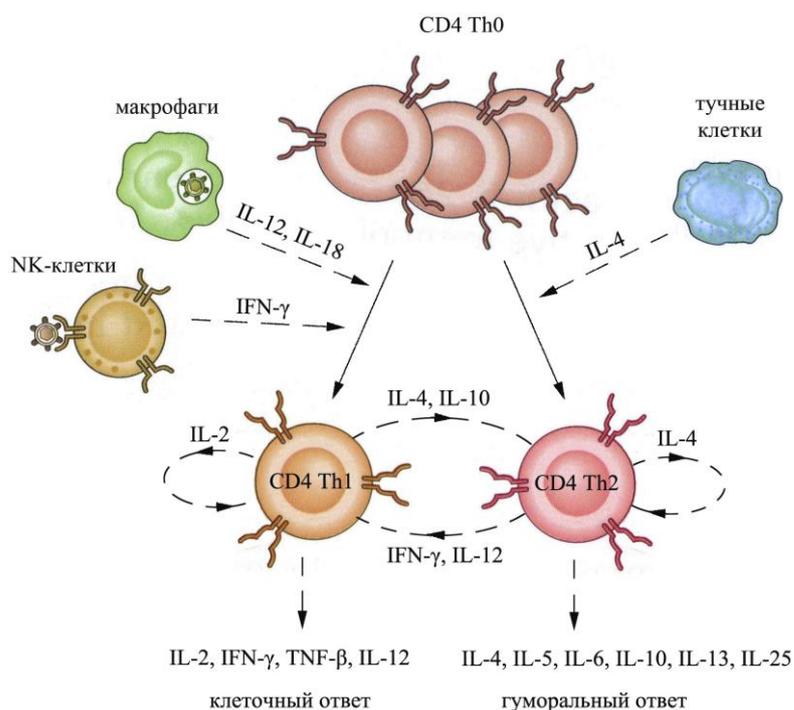


Рисунок 1.5 Стимуляция Th1 и Th2 иммунных ответов. Дифференциация Th0-лимфоцитов осуществляется под действием цитокинов, продуцируемых макрофагами, NK-клетками и тучными клетками на ранних стадиях иммунного ответа. Активация Th1-клеток, секретирующих IL-2, IFN-γ, TNF-β и IL-12, ведёт к развитию ответа клеточного типа, активация Th2-клеток, секретирующих IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 и IL-25, стимулирует преимущественно гуморальное звено иммунитета. Цитокиновые продукты Th1- и Th2-клеток ингибируют активность противоположных клонов. Сплошными стрелками показаны превращения клеток, прерывистыми – влияния указанных цитокинов на соответствующие клетки, их дифференцировку и пролиферацию (*Ярилин, 1999*).

Th1-клетки участвуют в иммунном ответе при вирусных инфекциях, вызываемых внутриклеточными микроорганизмами, при иммунизации белками-антигенами, применяемыми с сильными адьювантами, а также в реакциях гиперчувствительности замедленного типа (*Goldsby et al., 2003*). Включение клеточно-опосредованного противовирусного иммунитета в большой степени обусловлено действием IL-12, продуцируемого активированными макрофагами при ранних защитных реакциях, индуцированных системой врождённого иммунитета. Регуляция клеточного ответа осуществляется Th1-клетками посредством продукции или гиперпродукции IL-2, IFN- γ , TNF- β и IL-12 (*Lucey et al., 1996*). Клеточно-зависимый противовирусный иммунный ответ имеет существенное значение в элиминации возбудителя и предотвращении ассоциированных с патогеном осложнений, но не вносит значительный вклад в предупреждение инфекции.

Th2-клетки участвуют в формировании защитных реакций против повторных инфекций, а также иммунного ответа на аллергены, обеспечивая гуморальное звено иммунитета, при котором зачастую не происходит активации макрофагов (*Goldsby et al., 2003*). Образование из клеток Th0 клеток Th2 и индукция иммунного ответа по гуморальному пути осуществляются посредством IL-4, функционирующего как аутокринный ростовой фактор (*Swain et al., 1990; Seder et al., 1992*). Клетки Th2 секретируют цитокины IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 и IL-25, которые стимулируют продукцию В-лимфоцитами IgM, IgE и некоторых субтипов IgG (IgG4), активируют эозинофилы, а также подавляют активность макрофагов.

Продукты клеток Th1 и Th2 негативно влияют на активацию противоположных субпопуляций. Например, IL-2 подавляет пролиферацию лимфоцитов, индуцированную IL-4, и наоборот. Избыточная активация какого-либо типа Т-хелперов может приводить к развитию иммунопатологических состояний (*Симбирцев, 2002*). Динамическое равновесие цитокинов, секретируемых клетками Th1 и Th2, обеспечивает гибкость гуморального и клеточного иммунных ответов (*Мордвинов и Фурман, 2009*).

1.2.2 Роль цитокинов в иммунном ответе на инфекцию вирусом гриппа

Вирусы гриппа относят к семейству *Orthomyxoviridae* и на основе антигенных свойств внутренних белков вириона (M1 и NP) разделяют на три типа – А, В и С. Наибольшую эпидемиологическую опасность представляют вирусы гриппа типа А (ВГА). ВГА вызывают острые высоко контагиозные инфекционные заболевания дыхательных путей, как правило, верхних отделов – носа, горла и бронхов. Инфекция характеризуется внезапной лихорадкой, мышечными болями, общим недомоганием, сопровождающимся кашлем, поражением горла и носовыми выделениями. Иногда ВГА также поражают нижние отделы дыхательных путей, что приводит к возникновению первичных вирусных пневмоний. ВГА вызывают ежегодные сезонные эпидемии и периодические пандемии с высоким уровнем летальности.

Геном ВГА состоит из 8 сегментов однонитевой РНК отрицательной полярности, кодирующих от 10 до 18 белков (*Chen et al., 2001; Wise et al., 2009; Clifford et al., 2009; Vasin et al., 2014*). Ключевыми факторами, позволяющими вирусу «ускользнуть» от действия механизмов противовирусной защиты, являются генетический дрейф, обусловленный отсутствием корректорской активности у вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы, и генетический сдвиг, обусловленный возможностью reassortации геномных сегментов. Важную роль в противостоянии иммунному ответу клетки-хозяина играют белок матрикса М1, неструктурный белок NS1 и белок PB1-F2, обнаруженный у некоторых штаммов ВГА и обладающий проапоптотической активностью (*Chen et al., 2001*). Эти вирусные белки наряду с поверхностными гликопротеинами являются факторами, обуславливающими патогенность ВГА. М1 ингибирует комплемент-зависимую нейтрализацию вирусных частиц (*Zhang et al., 2009*). NS1 блокирует продукцию IFN I типа и регулирует (супрессирует) экспрессию ряда провоспалительных цитокинов и хемокинов: MIP-1 β , IL-12p35, IL-23p19, RANTES, IL-8, IFN- γ и CCR7 (*Fernandez-Sesma et al., 2006*).

Основными мишенями ВГА являются эпителиальные клетки дыхательных путей и макрофаги (моноциты). Продуктивно реплицирующиеся в эпителиальных

клетках вирусы подавляют синтез пре-мРНК клетки-хозяина и ингибируют систему трансляции клеточных белков, что может вызвать клеточную гибель в результате цитолитической активности или по механизму апоптоза (*Lu et al., 1994*). Защитные механизмы эпителиальных клеток, поражённых ВГА, направлены в первую очередь на ограничение дальнейшего распространения инфекции. В частности, в ответ на вирусное заражение в клетке активируются транскрипционные факторы, приводящие к экспрессии генов хемокинов (RANTES, MIP-1 α , MCP-1, MCP-3 и IP-10), противовирусных (IFN- α/β) и провоспалительных (IL-1 β , IL-6, IL-18 и TNF- α) цитокинов (рис. 1.6).

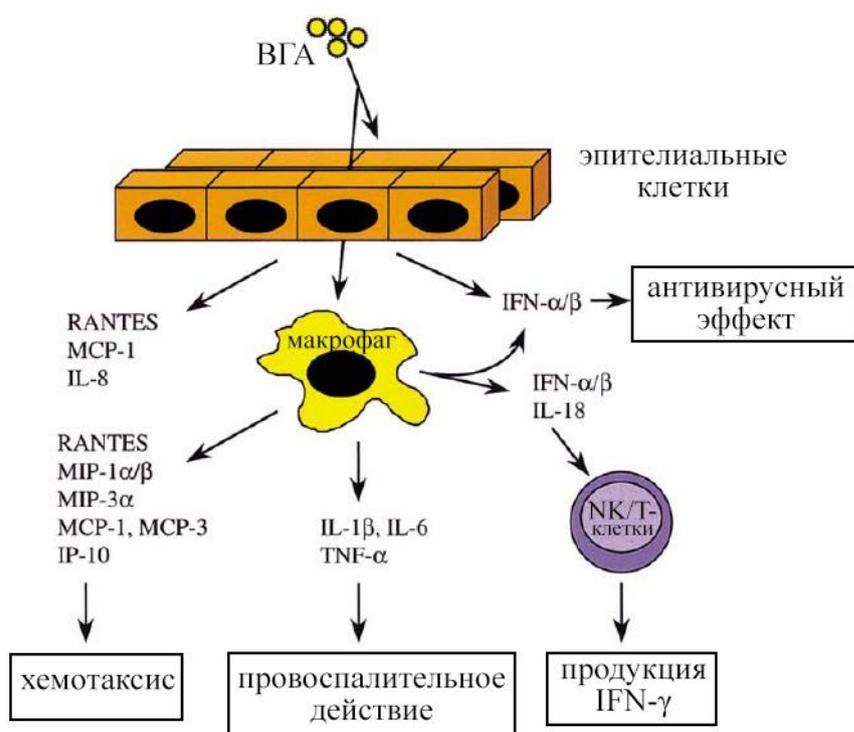


Рисунок 1.6 Продукция цитокинов эпителиальными клетками и макрофагами, инфицированными ВГА (на основе статьи *Julkunen et al., 2001*)

Продукция хемокинов при инфекции ВГА стимулирует миграцию моноцитов крови к очагу воспаления. Поражённые ВГА макрофаги и моноциты секретируют MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, MCP-1, MCP-3, MCP-3 α и IP-10, в то время как продукция IL-8 ограничена (*Bussfeld et al., 1998*). Эпителиальные клетки в ответ на вирусную инфекцию синтезируют RANTES, MCP-1 и IL-8.

Важнейшими цитокинами, продуцируемыми инфицированными ВГА макрофагами и эпителиальными клетками, являются интерфероны I типа, под

действием которых активируются врождённые защитные механизмы соседних клеток, обеспечивая им устойчивость к вирусной инфекции (*Samuel, 2001*). Интерфероны I типа активируют экспрессию генов, которые кодируют белки, обладающие прямой антивирусной активностью. К ним, в частности, относят дцРНК-зависимую протеинкиназу PKR, которая фосфорилирует α -субъединицу эукариотического фактора инициации трансляции eIF2, блокируя тем самым синтез вирусных белков, а также 2',5'-олигоденилатсинтетазу, которая активирует латентную при нормальных условиях РНКазу L, способную разрушать как клеточные, так и вирусные РНК (*Goodbourn et al., 2000*). Помимо этого происходит включение специфичных антивирусных многофакторных IFN-зависимых иммунных механизмов. Например, белок Mx подавляет первичную транскрипцию генов вируса гриппа, но почти или вовсе не воздействует на другие вирусы.

Помимо непосредственной антивирусной активности интерфероны I типа принимают участие в различных механизмах, стимулирующих иммунный ответ клетки-хозяина. Во-первых, IFN- α/β индуцируют экспрессию хемокинов MCP-1, MCP-3 и IP-10, которые отвечают за приток моноцитов/макрофагов и Th1-клеток в зону инфекции. Во-вторых, интерфероны I типа усиливают презентацию вирусных антигенов, стимулируя экспрессию молекул МНС и созревание АПК. В-третьих, интерфероны I типа являются важнейшими кофакторами в развитии иммунного ответа по Th1-клеточному типу, активируя синтез Т-лимфоцитами рецепторов IL-12 и IL-18, а также стимулируя НК-клетки к продукции IFN- γ . Всё вышеописанное подчёркивает огромную роль интерферонов I типа как в индукции врождённого, так и в развитии приобретённого иммунного ответов на инфекцию ВГА.

При инфицировании вирусом гриппа в клеточных культурах различного происхождения (эпителиального, лимфоцитарного, миеломного) может наблюдаться синтез тех или иных цитокинов и хемокинов в самых различных сочетаниях и соотношениях. Показано, что макрофаги в ответ на заражение ВГА в больших количествах секретируют IFN- α/β , IL-1 β , IL-6 и TNF- α (*Julkunen et al.,*

2001). Кроме того, макрофаги синтезируют также IL-18 и IL-12. Значительная продукция IL-12 отмечена у дендритных клеток в ответ на ВГА или двунитевые РНК. ВГА также индуцируют синтез IL-15 мононуклеарными клетками периферической крови. Таким образом, можно сделать вывод, что эпителиальные и эндотелиальные клетки являются мощными стимуляторами различных хемокинов, а дендритные клетки и макрофаги дают важный вклад в секрецию противовирусных и иммуностимулирующих цитокинов при инфекции ВГА.

Провоспалительные цитокины IL-1 β , IL-6 и TNF- α косвенно стимулируют противовирусную активность клеток, создавая микроокружение для развития иммунного ответа. IL-1 β и TNF- α вовлекаются в стимуляцию экспрессии хемокинов MCP-1 и MCP-3 и созревание макрофагов и дендритных клеток. IL-6 стимулирует пролиферацию и дифференцировку В- и Т-клеток. Важной функцией IL-18 в синергизме с IL-12 и интерферонами I типа при ВГА инфекции является индукция синтеза IFN- γ NK-клетками и Т-лимфоцитами. Взаимодействия цитокинов IL-1 β , IL-18, TNF- α , IFN- α/β , IFN- γ и хемокинов формируют комплексную систему со сложными обратными связями, приводящую к воспалительному ответу, развитию вирус-специфического Th1-клеточного иммунного ответа и, в конечном итоге, элиминации патогена.

Таким образом, на местном уровне цитокины отвечают за все последовательные этапы развития противовирусного ответа на инфекцию ВГА, обеспечения локализации и удаления вируса, а затем восстановления повреждённой структуры тканей.

Однако, по пока ещё не вполне понятным причинам, некоторые ВГА, такие как А/Н5N1, А/Н1N1 1918 года и А/Н1N1_{pdm09} могут вызывать серьёзные лёгочные повреждения и воспаления у некоторых пациентов, приводящие к смертельным исходам. Тяжёлое течение болезни и возникающие осложнения при гриппе связывают с явлением «цитокинового шторма» или гиперцитокинемии (*Ferrara et al., 1993*). Неконтролируемая каскадная гиперпродукция цитокинов IL-6, IL-8 и хемокинов IP-10, MIG, MCP-1 при инфекциях, вызываемых ВГА, приводит к несостоятельности врождённого иммунного ответа организма и

ограничению развития специфического иммунитета, что ведёт к нарушению цитокинового баланса. Если гиперцитокинемия возникает в лёгких, внеклеточные белки, продуцируемые макрофагами, и сами клетки иммунной системы накапливаются и блокируют дыхательные пути, вызывая удушье.

Результаты обследования пациентов с вызванными ВГА инфекциями показали, что интенсивная продукция цитокинов и хемокинов, связанных с провоспалительным действием и иммунным ответом, развивающимся по Th1-клеточному типу, прямо коррелирует с неконтролируемой вирусной репликацией (*Lee et al., 2009*). Важно, что уровень экспрессии и профиль цитокинов и хемокинов, индуцированных штаммами различных антигенных кладов ВГА, сильно различаются (*Oslund&Baumgarth, 2011*). Явление «цитокинового шторма» при заболеваниях гриппом связывают, в частности, с белком NS1, являющимся одним из ключевых факторов патогенности ВГА.

При лёгком течении инфекции, вызываемой непандемическими ВГА H1N1 или H3N2, локальный (назальный) и системный (периферическая кровь) цитокиновый ответы обусловлены в основном повышением продукции IL-6 и IL-8, уровень которых напрямую связан с тяжестью заболевания. Провоспалительный цитокин IL-6 отвечает за развитие лихорадки и формирование синдромов, характерных для гриппа. Значительное увеличение уровня IL-6 ассоциируют с длительностью и тяжестью заболевания, а также с осложнениями, вызываемыми ВГА, такими как энцефалопатии и кардиореспираторные нарушения. Штаммы высокопатогенных вирусов A/H5N1 и пандемических вирусов A/H1N1_{pdm09} индуцируют выработку цитокинов IL-6, IL-8 и хемокинов IP-10, MIG, однако их цитокиновый профиль включает также MCP-1, IL-10, TNF- α и IFN- α . При этом системный уровень всех цитокинов намного выше, чем при инфекциях, вызванных сезонными штаммами (*Chan et al., 2005*). Гиперцитокинемия приводит к возникновению вторичных сопутствующих осложнений, особенно часто встречающихся у детей и лиц пожилого возраста.

Изучение роли цитокинов при заболеваниях, вызванных ВГА, а также при клинических исследованиях вакцинных препаратов против гриппа, является

основополагающим как для понимания патогенеза инфекционного процесса, так и для оценки иммуногенных свойств вирусов.

1.3 Современные методы определения цитокинов

1.3.1 Особенности проведения анализа цитокинов

Многочисленные методы анализа цитокинов направлены на изучение клеток-продуцентов, определение цитокинов и их антагонистов в биологических средах организма и исследование клеток-мишеней.

Наиболее распространённым в настоящее время является исследование цитокинов в биологических средах: сыворотке крови, спинномозговой, синовиальной и перинатальной жидкостях, бронхиальном лаваже. Измеряемые таким образом уровни цитокинов, секретируемых клетками организма *in vivo*, отражают текущее состояние иммунной системы. Следует учитывать, что определение цитокинов в крови не всегда является информативным. Например, показано, что концентрации цитокинов, измеренные в сыворотке и плазме крови, могут отличаться. Наличие антикоагулянтов также может влиять на уровень цитокинов, стимулируя или ингибируя их продукцию клетками крови *in vitro* (Thavasu et al., 1992; Wong et al., 2008). Кроме того, цитокины, как правило, являются локальными медиаторами, и их синтез происходит только в отдельных органах. Измерение уровня цитокинов в плазме крови может быть полезно при остром воспалении, при стойком хроническом воспалительном процессе и для определения фармакокинетики цитокинов, применяемых при терапии (Whiteside, 1994).

Уровень экспрессии цитокинов в клетках-продуцентах и чувствительность соответствующих клеток-мишеней к воздействию цитокинов отражают функциональное состояние иммунной системы организма. Например, спонтанная продукция цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови (МКПК) в культуре свидетельствует о том, что клетки уже активированы *in vivo*. Сниженная индуцированная продукция цитокинов клетками может служить одним из признаков иммунодефицитного состояния. Интересным примером

практического применения индуцированной экспрессии цитокинов является клеточный тест на антиген-стимулированную индукцию АПК IFN- γ *in vitro* (ELISpot), являющийся на сегодняшний день «золотым стандартом» диагностики туберкулёза.

Цитокины сильно подвержены деградации вследствие короткого периода полужизни и поэтому характеризуются нестабильным уровнем *in vitro* (Zhou *et al.*, 2010). Из этого следует, что получение, хранение и подготовка биологических образцов является важным фактором при проведении количественного анализа цитокинов. Пробы нужно отбирать в стерильные охлаждённые пробирки, сыворотку или плазму следует как можно быстрее отделить от клеточной фракции. При необходимости образцы можно хранить при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, избегая многократного замораживания и оттаивания. Большинство цитокинов остаются стабильными при таких условиях в течение двух лет (de Jager *et al.*, 2009).

1.3.2 Методы выявления цитокинов

Различают молекулярно-биологические и иммунологические методы анализа цитокинов, а также тестирование их биологической активности. Определение уровня мРНК является в большей степени научно-исследовательской задачей. Детекция цитокинов в клинических лабораториях проводится на уровне белка и практически ограничена иммунологическими методами. При проведении клинических анализов наиболее часто используют методы детекции цитокинов с помощью специфических моноклональных антител. При этом можно измерять как один, так и одновременно несколько цитокинов, используя мультиплексные системы.

Иммуноанализ цитокинов реализован в основном в «сэндвич»-формате, при котором используют два антитела, обладающих различной эпитопной специфичностью к выявляемому цитокину. Одно антитело, как правило, иммобилизовано на твёрдой фазе, а второе конъюгировано с меткой и используется для детекции связывания антигена.

ELISpot. Другим распространённым методом, позволяющим оценивать продукцию цитокинов на уровне отдельных клеток, является система ELISpot. При данном подходе исследуемые клетки *in vitro* стимулируют соответствующим митогеном или антигеном, после чего измеряют уровень индуцированных цитокинов.

Иммуногистохимия. Иммуногистохимические методы с использованием меченых антител применяются в основном в научных целях. С их помощью нельзя получить точные количественные данные, однако можно определить локализацию продукции цитокинов непосредственно в тканях.

Проточная цитофлуориметрия. В научных целях широко используется внутриклеточная детекция цитокинов методом проточной цитофлуориметрии, позволяющим не только количественно выявить цитокины, но и фенотипически охарактеризовать популяцию клеток-продуцентов.

Мультиплексные методы анализа цитокинов преимущественно основаны на проточной цитофлуориметрии и иммунологических реакциях в «сэндвич»-формате (*Leng et al., 2008*). Доступные в настоящее время коммерческие наборы позволяют измерять свыше 25 различных цитокинов в одном образце. К ним относят системы определения цитокинов методом проточной цитофлуориметрии с использованием лигандов, конъюгированных на шариках-носителях (Luminex, BD Biosciences, BioPlex), и биологические микрочипы (RayBiotech, Full Moon BioSystems, Allied Biotech и др.).

К молекулярно-биологическим системам анализа цитокинов относят метод полимеразной цепной реакции, сопряжённой с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Экспрессия генов цитокинов находится под сильным контролем: мРНК цитокинов быстро синтезируются, процессируются, транслируются и деградируют, что мешает их детекции и интерпретации результатов (*Whiteside, 1994*). ПЦР с детекцией в режиме реального времени позволяет оценивать уровень мРНК цитокинов или исследовать аллельные варианты генов. Локализовать транскрипцию мРНК цитокинов в клетках и тканях можно методом

флуоресцентной гибридизации *in situ*. Мультиплексный экспрессионный анализ генов цитокинов проводят с использованием ДНК-микрочипов.

1.3.3 Технология микрочипов

Технология микрочипов была практически одновременно разработана группами независимых исследователей в СССР (*Lysov et al, 1988; Khrapko et al, 1989*) и США (*Kulesh et al, 1987; Masko&Southern, 1992*) как способ секвенирования ДНК, основанный на гибридизации.

Биочипы представляют собой твёрдую подложку (как правило, стеклянный слайд площадью от 0,1 до 10 см²), на которой в матричном порядке в виде индивидуальных микроточек (спотов) диаметром от 10 до 500 мкм локализованы зонды для выявления мишеней в биологическом материале (*Маркелов и др., 2008*). В настоящее время разработаны различные типы микрочипов с иммобилизованными фрагментами ДНК и РНК, олигонуклеотидами, растворимыми или мембранными белками, пептидами, углеводами, пептидо-нуклеиновыми кислотами, разнообразными малыми молекулами, тканями и живыми клетками (*Nakaya et al, 2007*). В качестве анализируемого биологического материала также могут быть использованы практически любые субстанции (сыворотка, цельная кровь, микробиологические препараты, суспензии органических веществ, продуктов питания, почвы).

В процессе анализа с использованием микрочипов экстрагированные из биологического материала и химически меченые нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК), белки или другие аналиты инкубируют с зондами на поверхности микрочипа. Далее осуществляют отмывку несвязавшихся лигандов и регистрацию процессов межмолекулярных взаимодействий с помощью флуоресцентных, люминесцентных, электрохимических и даже масс-спектрометрических методов.

Современные технологии, использующие роботизированные системы, позволяют создавать микрочипы, содержащие десятки тысяч индивидуальных зондов. Для их нанесения на микрочип используют две основные технологии: контактную или бесконтактную печать уже готовых зондов и *in situ* синтез

олигонуклеотидов (*Fodor et al., 1991*) или пептидов (*Shin et al., 2010*) непосредственно на подложке микрочипа. Обе технологии имеют свои преимущества и недостатки. Роботизированные системы – споттеры, основанные на технологии печати, используются, в основном, для создания некоммерческих микрочипов в научно-исследовательских целях, они являются оптимальными для печати множества разнообразных спотов на небольшое количество слайдов (*Spurrier et al., 2008*). Производство микрочипов в процессе синтеза *in situ* (рис. 1.7 В) предполагает создание полимерного зонда непосредственно на поверхности подложки путём поэтапного добавления мономеров к растущему концу цепи. При синтезе микрочипов *in situ* достигается беспрецедентно высокая плотность расположения зондов.

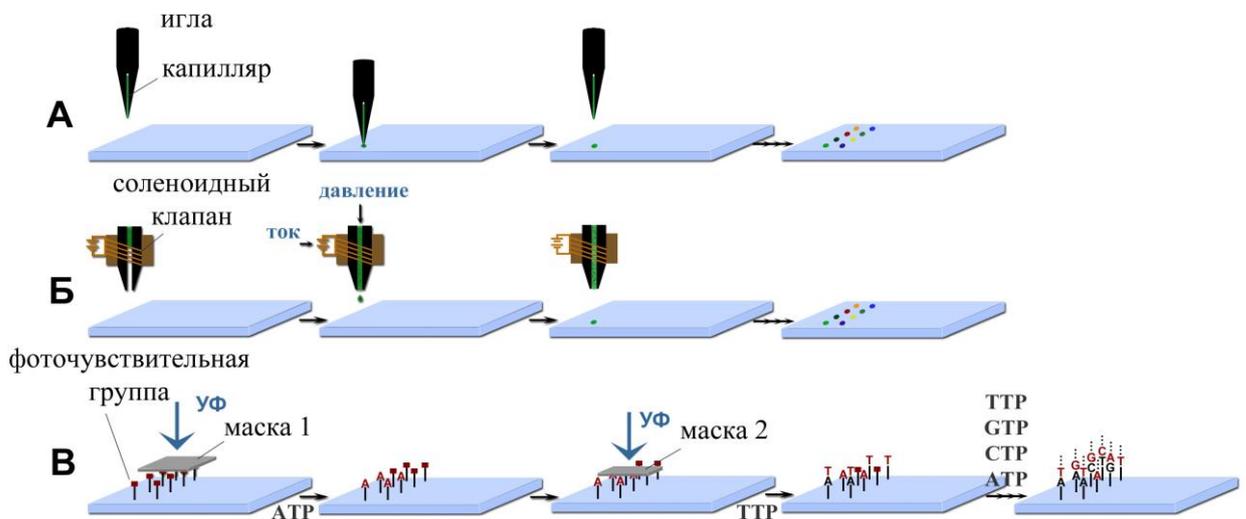


Рисунок 1.7 Технологии производства микрочипов. А. Метод контактной печати. Б. Метод бесконтактной печати. В. *In situ* синтез зондов на подложке.

В случае использования споттеров цикл печати состоит из последовательного заполнения зондом раскапывающего механизма (иглы или пипетки), нанесения пробы в заданную область подложки в нужном количестве повторов (реплик) и тщательной процедуры отмывки. Для контактной печати зондов (рис. 1.7 А) применяют иглы, содержащие щелевой или сквозной капилляр. Забор образца зонда происходит из лунок микропланшета под действием капиллярных сил, а печать обусловлена силами поверхностной адгезии, возникающими в процессе соприкосновения кончика печатающей иглы с

поверхностью подложки (*Microarray Handbook, 2002*). При нанесении зондов бесконтактным способом (рис. 1.7 Б) используют нанопипетки с соленоидным (электромагнитным) клапаном или пьезоэлементом, обеспечивающие высокоточное нанесение зонда (вплоть до нескольких десятков молекул) без непосредственного контакта с подложкой (*Bruckbauer et al, 2003*).

Для определения уровня экспрессии генов на уровне транскриптов или белков используют олигонуклеотидные или белковые микрочипы, соответственно.

Общая схема проведения гибридационного анализа с использованием олигонуклеотидного микрочипа включает четыре основных стадии: дизайн и печать микрочипа, подготовка исследуемой пробы, гибридизация пробы с чипом, сканирование и статистический анализ полученных данных (рис. 1.8) (*Microarray Handbook, 2002*).

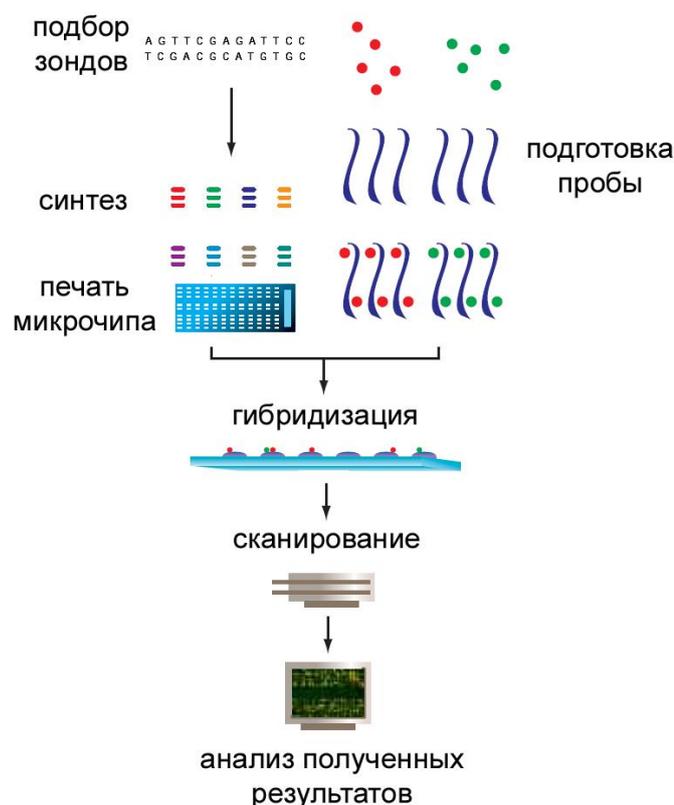


Рисунок 1.8 Основные стадии проведения анализа с применением биологических микрочипов (на основе *Microarray Handbook, 2002*).

В настоящее время в качестве зондов при создании ДНК-микрочипа в основном применяют химически синтезированные специфические

олигонуклеотиды. Такие зонды позволяют наряду с изучением профиля экспрессии также определять альтернативно сплайсированные транскрипты и одновременно проводить анализ разных участков одного и того же гена. При печати предварительно синтезированных зондов в олигонуклеотид вводят различные гомобифункциональные линкеры, выступающие в качестве адаптера между молекулой и реактивными группами подложки (Todt&Blohm, 2009). Они обеспечивают ковалентную иммобилизацию зондов на микрочипе и уменьшают стерические препятствия, способствуя гибридизации (Shchepinov et al., 1997).

Достоверность биологических данных, получаемых в результате анализа с применением олигонуклеотидного микрочипа, в значительной степени определяется стадией подготовки исследуемой пробы для гибридизации. Для обеспечения специфичности и чувствительности анализа выделяемая РНК должна соответствовать определённым критериям чистоты и целостности. При проведении некоторых исследований (например, при работе с культурами клеток, биопсиями и т.п.) не всегда можно получить пробы, содержащие мРНК в концентрациях, достаточных для проведения анализа. В связи с этим требуется дополнительная амплификация мРНК (Ginsberg, 2005). Большинство разработанных способов амплификации можно отнести к одной из трёх групп (рис. 1.9): 1) методы на основе ОТ-ПЦР; 2) методы с проведением *in vitro* транскрипции; 3) изотермическая амплификация РНК с использованием РНК-зависимой ДНК-полимеразы (Robert, 2010). Необходимым условием подготовки пробы при проведении амплификации является сохранение соотношения числа копий мРНК, присутствующих в пробе (Zhu et al, 2006).

Используемую для детекции метку, как правило, вводят в пробу непосредственно в процессе амплификации. Полученные флуоресцентно меченые пробы подвергают очистке от компонентов реакции, после чего гибридизуют с зондами, иммобилизованными на микрочипе. Процедура гибридизации в целом аналогична проводимой при Саузерн-блоттинге или нозерн-блоттинге и зависит от различных условий, таких как длина зонда, количество меченой пробы, структура флуоресцентной метки, температура гибридизации, состав гибридизационной

смеси (Koltai & Weingarten-Baror, 2008).

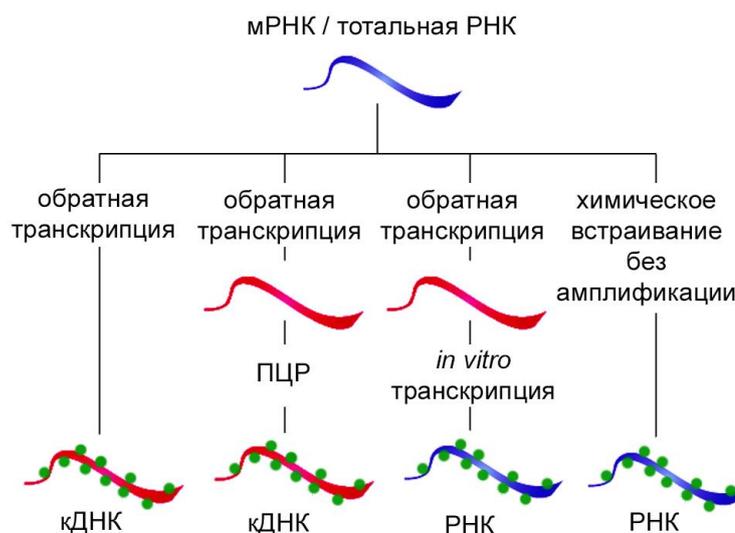


Рисунок 1.9 Способы получения флуоресцентно меченой пробы для гибридизации с микрочипом.

Регистрацию флуоресцентного сигнала осуществляют путём сканирования микрочипа с использованием специализированного сканирующего конфокального микроскопа (сканера). Определение уровня экспрессии проводят сравнительным анализом. Для этого микрочипы гибридизуют со смесью контрольной и исследуемой проб, каждая из которых мечена своим флуоресцентным красителем. Нормированное отношение сигналов флуоресценции даёт информацию об уровне экспрессии (Tuimala & Lain, 2003).

Развитие метода анализа экспрессии генов на основе олигонуклеотидных микрочипов подвело технологическую основу для появления аналогичной методики изучения пептидов и белков (Utz, 2005). В основе белковых микрочипов лежат те же принципы, что и у традиционных методов ИФА, однако, формат биочипа позволяет одновременно детектировать сотни белков с использованием малых объёмов реагентов и образцов (Sanchez-Carbayo, 2006).

Условно можно выделить четыре формата белковых микрочипов (рис. 1.10): микрочипы для детекции белковых взаимодействий; микрочипы прямой фазы с непосредственно меченым аналитом; микрочипы прямой фазы с использованием меченого антитела («сэндвич»-иммуноанализ); микрочипы обратной фазы с иммобилизованным аналитом (Spurrier et al., 2008).

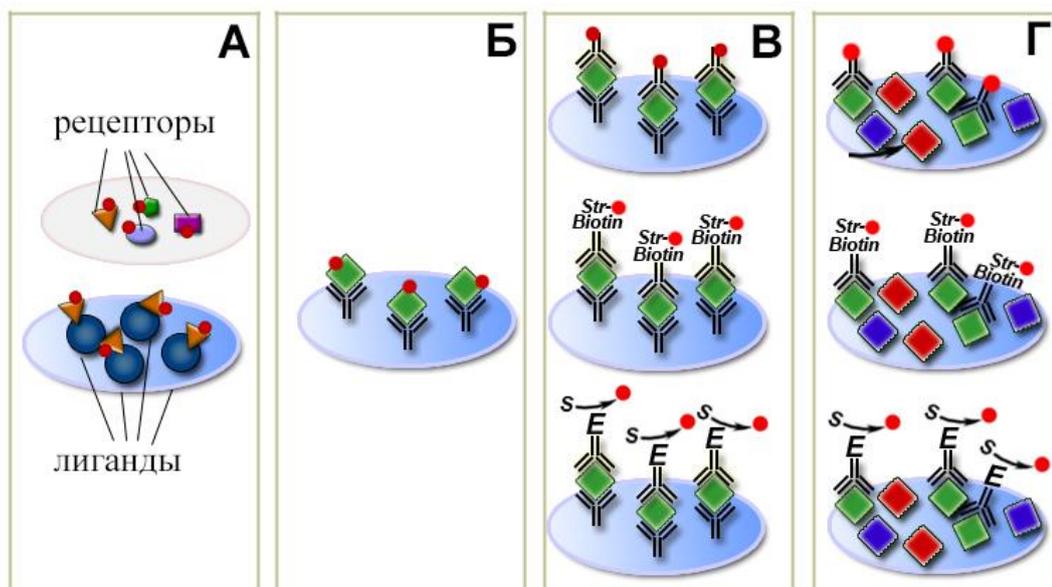


Рисунок 1.10 Схемы проведения анализа с использованием белковых микрочипов. **А.** Микрочипы для детекции белковых взаимодействий. **Б.** Микрочипы прямой фазы, гибридизация происходит с непосредственно меченым анализом. **В.** Микрочипы прямой фазы, визуализация белковых взаимодействий осуществляется с использованием меченого антитела. **Г.** Микрочипы обратной фазы, анализируемый анализт иммобилизован на подложке.

Микрочипы для детекции белковых взаимодействий (рис. 1.10 А) содержат иммобилизованные в матричном порядке белки, пептиды, гликопротеины и прочие лиганды, которые в процессе анализа инкубируют с различными молекулами-кандидатами. Применение таких микрочипов в фундаментальных биологических научных исследованиях позволяет определять ферментативную активность и механизмы действия белков (*Ptacek et al., 2005*), проводить характеристику ассоциированных с заболеваниями белковых каскадов (*Jones et al., 2006*), выявлять новые лекарственные средства и мишени, на которые они направлены (*Huang et al., 2004*).

Для клинической диагностики наибольший интерес представляют иммунологические микрочипы с использованием специфических антител (иммуночипы). Микрочипы прямой фазы (рис. 1.10 Б) содержат иммобилизованные антитела, специфически связывающие молекулы антигенов, входящих в состав пробы, такой как сыворотка крови или лизат тканей (*Kricka et al., 2006*). При проведении анализа с использованием микрочипов прямой фазы флуоресцентную метку вводят либо непосредственно в антиген – анализ с одним антителом, либо осуществляют визуализацию с использованием вторых антител –

«сэндвич»-иммуноанализ. Оба подхода имеют как преимущества, так и недостатки.

При прямом встраивании флуорофора в аналит не требуются дополнительные антитела, можно проводить одновременный сравнительный анализ двух проб, помеченных разными метками, в одном эксперименте (*Sanchez-Carbayo, 2006*). Одним из недостатков прямого мечения является высокий фоновый сигнал, приводящий к снижению чувствительности метода. К другому недостатку можно отнести возможность нарушения взаимодействия между антигеном и антителом в случае, если реакция мечения значительно изменяет структуру связывающего участка антигена (*Kopf&Zharhary, 2007*).

При проведении «сэндвич»-иммуноанализа для выявления белков, специфически связавшихся с иммобилизованными антителами, используют смесь вторых детектирующих антител, подобранных к другим эпитопам антигена, что значительно повышает специфичность микрочипа. Вторые антитела обычно конъюгированы с биотином, который образует стойкие комплексы с флуоресцентно меченым стрептавидином или авидином (*Sanchez-Carbayo, 2006*). Кроме того, система детекции может быть основана на цветных реакциях, катализируемых ферментами (пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза), ковалентно связанными с антителами. Одним из существенных недостатков «сэндвич»-формата является ограниченное количество белков (до 100), которые можно одновременно анализировать на микрочипе (*Witte&Nock, 2004*). Это обусловлено возрастанием неспецифического связывания и перекрёстного взаимодействия детектирующих антител при увеличении числа мишеней. Кроме того, при проведении эксперимента для каждого микрочипа возникает необходимость построения стандартных калибровочных кривых с известными концентрациями анализируемых белков (*Hamelinck et al., 2005*).

Другой способ проведения клинических иммунологических исследований основан на использовании микрочипов обратной фазы (*Neuman de Vegvar et al., 2003*). При обратном подходе (рис. 1.10 В) на слайд наносят анализируемые белковые экстракты (клеточные лизаты, сыворотку крови и т.п.), а их детекция

осуществляется специфическими флуоресцентно мечеными антителами (*Kricka et al., 2006*). Такой метод позволяет на одном микрочипе проводить высокопроизводительный анализ множества образцов на наличие одного-двух белков-мишеней (*Spurrier et al., 2008*).

Завершающей стадией исследования с использованием микрочипов является анализ результатов, который состоит из нескольких этапов: 1) регистрации флуоресценции микрочипа путём сканирования; 2) расчёта интенсивностей флуоресценции (ИФ) спотов полученного изображения; 3) стандартизации полученных значений с введением фоновых и статистических поправок; 4) нормализации данных (*Microarray Handbook, 2002; Causton et al., 2003*).

Флуоресценция спотов микрочипа после гибридизации регистрируется с использованием специальных камер или оптических сканеров, представляющих собой конфокальный микроскоп.

После сканирования получается изображение, которое воспроизводит интенсивность каждого пикселя на микрочипе. В зависимости от типа сканера существует ряд варьируемых параметров, позволяющих получать изображение требуемого качества. Наиболее часто встречающиеся из этих параметров – это мощность лазерного излучения, коэффициент усиления фотоэлектронного умножителя (РМТ) и разрешение сканирования (*Smyth et al., 2003*).

Далее полученное изображение анализируют с использованием специализированного программного обеспечения. Процесс обработки включает поиск спотов, их сегментацию (т.е. определение фоновых пикселей и пикселей, непосредственно образующих спот) и расчёт интенсивности флуоресценции каждого спота (*Yang et al., 2001*).

Для обеспечения достоверности результатов проводится стандартизация рассчитанных значений интенсивностей. Этот процесс основан на введении фоновых поправок, анализе значений интенсивностей положительных и отрицательных контролей, статистической оценке данных, получаемых от спотов, нанесённых в нескольких повторах (*Brazma et al., 2001*).

Нормализация является заключительным этапом обработки данных. Основная цель нормализации – исключить или скорректировать систематические небиологические различия между микрочипами, возникающие в процессе исследования (*Yang et al., 2002*). Источниками этих вариаций являются: различная эффективность реакций встраивания красителей в анализируемую пробу, условия проведения гибридизации и отмывок, физические несоответствия между чипами, небольшие отклонения в концентрациях и чистоте реагентов.

Нормализацию олигонуклеотидных микрочипов можно проводить с учётом уровней экспрессии всех генов, представленных на микрочипе; определённого набора генов, выбранного исследователем (как правило, генов домашнего хозяйства), или некоторых экзогенных контролей, внесённых в анализируемую пробу. Нормализацию белковых микрочипов осуществляют путём построения калибровочных кривых. В последнее время использование экзогенных контролей становится общим стандартом качества при сравнении результатов гибридизации как «внутри», так и между чипами (*Brazma et al., 2001*). Существуют различные методы расчёта и стандартизации, основанные на суммарной интенсивности, коэффициентах эквивалентности, линейных и нелинейных регрессионных моделях (*Quackenbush, 2001*). Для проведения такого рода анализов разработано множество алгоритмов, реализованных в виде пакета программ для статистической обработки экспрессионных профилей.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объекты

2.1.1 Клеточные культуры

В работе использовали перевиваемые клеточные линии человека *A549* (карцинома лёгких), *Jurkat* (иммортиализованные Т-лимфоциты), *Namalva* (иммортиализованные В-лимфоциты) и *THP-1* (иммортиализованные моноциты), полученные из коллекции клеточных культур ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, а также *первичную культуру человеческих лимфоцитов*, выделенную из крови здоровых добровольцев.

Постоянные клеточные линии *Jurkat*, *Namalva* и *THP-1* поддерживали в среде RPMI 1640 («Биолот», Россия) с добавлением 2 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота (КРС) без антибиотиков, с регулярным пересевом на 5–6 сутки. Для проведения опыта использовали 3-суточные культуры с концентрацией клеток 3×10^5 в 1 мл.

Для культивирования клеточной линии *A549* использовали питательную среду DMEM («Gibco», США) без антибиотиков с добавлением 5–10 % фетальной сыворотки КРС («Gibco», США). Количество клеток при проведении экспериментов составляло от $\approx 10^5$ до $\approx 10^7$ в 1 мл в зависимости от поставленных целей. Для проведения опыта использовали суточные культуры.

Первичные лимфоциты выделяли из цельной крови стандартным методом центрифугирования на фиколл-градиенте («РАА», США) либо с помощью сепарационных пробирок BD Vacutainer CPT («BD Biosciences», США). Полученные клетки культивировали в течение 7–9 дней в 6-луночных планшетах с гидрофобной поверхностью («Greiner Bio-One», Германия) в количестве 1×10^6 в лунке в культуральной среде RPMI 1640, содержащей 10 % фетальной сыворотки КРС и GM-CSF в концентрации 250 ед/мл.

Все клеточные культуры поддерживали при 37 °С и 5 % CO₂.

2.1.2 Вирусы

В работе использовали штаммы вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1_{pdm09}), A/Victoria/361/11 (H3N2), A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1), A/PR/8/34 (H1N1), A/Brisbane/10/07 (H3N2), а также реассортантные штаммы, полученные методом обратной генетики. Вирусы были любезно предоставлены лабораторией молекулярной вирусологии и генной инженерии ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России.

Для моделирования гриппозной инфекции использовали реассортанты на основе вакцинного штамма IVR-116 (H1N1), содержащие гены HA и NA от вируса H5N1: A/Kurgan/5/05 (H5N1) с полноразмерным геном NS1 и A/Kurgan/5/05 (H5N1) deltaNS1, имеющий делецию последовательности, кодирующей белок NS1 (*Romanova et al., 2009*).

Также в работе использовали штамм A/PR/8/34 (H1N1) delNS1-116-IL2, геном которого кодирует IL-2 человека (*Kittel et al., 2005*).

В качестве вирус-содержащего материала использовали аллантоисную жидкость от инфицированных 9-дневных куриных эмбрионов. Инфекционную активность вируса (ТЦД50) определяли титрованием на клетках MDCK по визуальной детекции цитопатического действия.

Все работы с вирусами проводили в боксах биологической безопасности II класса.

2.2 Вирусологические методы

2.2.1 Определение инфекционной активности вируса

Инфекционную активность вирусов в аллантоисной жидкости определяли на клетках MDCK. Для этого готовили серии 10-кратных разведений вирусосодержащей суспензии на среде Alpha MEM («Биолот», Россия) с добавлением трипсина («Sigma-Aldrich», США) (до конечной концентрации 2,5 мкг/мл) и антибиотиков стрептомицина/пенициллина (до 1 %).

Для определения 50 % тканевой инфекционной дозы (ТИД50) использовали 96-луночные культуральные планшеты Nunc («Thermo Scientific Nalgene», США) с

суточным монослоем клеток MDCK. После удаления среды в лунки вносили по 100 мкл приготовленных разведений вирусосодержащего материала. Далее планшеты инкубировали 72–96 часов при температуре 37 °С и 5 % CO₂. Учёт результатов проводили визуально по наличию цитопатического эффекта для каждой лунки и контролировали с помощью метода гемагглютинации с использованием 0,5 % суспензии куриных эритроцитов. 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.

2.2.2 Стимуляция клеток ВГА

В работе использовали 2-суточный монослой культур клеток, выращенный в стандартных планшетах или флаконах Nunc (“Thermo Scientific Nalgene”, США). Для анализа продукции цитокинов к полностью сформированному монослою клеток (10⁵–10⁶ клеток/мл) вносили исследуемые ВГА с множественностью заражения (MOI), равной 1. Объём вирус содержащей среды рассчитывали по

формуле:
$$V_{[мл]} = \frac{\frac{X[\%]}{100[\%]} \times \rho \times S[см^2] \times a \times MOI}{\text{титр}}$$
, где X – конфлюентность; ρ – плотность клеток при 100% конфлюентности, ρ = 150000; S – площадь монослоя, см²; а – число слоёв, а = 1 для матраса; титр – TCID₅₀/мл. После инкубации в течение 1 часа при комнатной температуре вирусосодержащий материал удаляли, монослой клеток отмывали от не адсорбированных вирусных частиц и вносили свежую культуральную среду. Анализ паттернов экспрессии цитокинов в зависимости от целей эксперимента проводили через 2–48 часов после инкубации при 37 °С и 5 % CO₂.

2.3 Иммунологические методы

2.3.1 «Сэндвич»-ИФА

ИФА проводили с использованием 96-луночных планшетов Nunc MaxiSorp (“Thermo Scientific Nalgene”, США), моноклональных антител (МКА) и рекомбинантных цитокинов производства компании “BD Biosciences” (США).

МКА, разведённые в растворе $1 \times \text{PBS}$ до концентрации 2 мкг/мл, вносили в лунки в объёме 100 мкл и инкубировали при комнатной температуре в течение ночи. После отмывки раствором $1 \times \text{PBST}$ (Tween 20 до 0,05 %) несвязавшихся МКА лунки блокировали 2 % бычьим сывороточным альбумином (БСА) на $1 \times \text{PBST}$ в течение 2 часов при комнатной температуре. Наличие цитокинов определяли в цельных супернатантах клеток, стандарты (рекомбинантные цитокины) готовили серией 5- или 10-кратных разведений на блокирующем буфере. Инкубацию с анализируемыми образцами проводили при комнатной температуре в течение 2 часов. После отмывки планшета раствором $1 \times \text{PBST}$ в лунки вносили биотинилированные МКА в объёме 100 мкл в концентрации 0,5 мкг/мл и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. Связавшиеся с антигеном биотинилированные МКА детектировали с помощью конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена (“R&D Systems Inc.”, США), разведённого 1:1000 в $1 \times \text{PBST}$, в течение 30 мин при комнатной температуре. Пероксидазную реакцию проявляли добавлением в каждую лунку 100 мкл субстратной смеси, содержащей 9 частей раствора А и одну часть раствора В из набора TMB Peroxidase EIA Substrate Kit (“Bio-Rad”, США). После остановки реакции добавлением в каждую лунку 50 мкл $2\text{N H}_2\text{SO}_4$ измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм (OD_{450}) на планшетном фотометре Multiskan EX (“Thermo Fisher Scientific”, США). Дальнейшую обработку результатов проводили с использованием программ Microsoft Office Excel 2003/2007 и GraphPad Prism 6.

2.3.2 Мультиплексный «сэндвич»-вариант МФА в формате микрочипа

Для печати белковых микрочипов использовали слайды с поли-L-лизиновой подложкой. Для изготовления слайдов чистые микробиологические стёкла FisherFinest Premium (“Fisher Scientific”, США) промывали Milli-Q H_2O и инкубировали в течение 5 мин в 0,01 % растворе поли-L-лизина (“Sigma-Aldrich”, США), приготовленном на Milli-Q H_2O . Затем стёкла высушивали при 60°C в течение 1 часа. Чистые приготовленные слайды хранили не более недели при комнатной температуре.

МКА иммобилизовали на полилизиновые слайды методом контактной печати на споттере SpotBot 3 (“Arrayit Corporation”, США) с использованием иглы 946MP4 (“Telechem”, США) при поддержании уровня относительной влажности 55–60 % и температуре 18–22 °С. После печати слайды оставляли на ночь в споттере. Готовые микрочипы хранили при комнатной температуре не более 1 месяца.

Все этапы инкубации проводили в объёме 100 мкл при температуре 25 °С в условиях перемешивания при 250 об/мин на термошейкере для планшетов Biosan PST-60 HL plus (“BioSan”, Латвия) с использованием МКА и рекомбинантных цитокинов производства компании “BD Biosciences” (США) в рамках для гибридизации на 16 субэреев FAST Frame (“Whatman”, США).

Анализ с использованием созданного биочипа осуществляли в четыре этапа. Вначале во избежание возможного неспецифического связывания поверхность микрочипа блокировали раствором 1 % БСА на 1× PBS. Затем проводили инкубацию биочипа с цельными пробами или стандартами, полученными серией разведений на блокирующем растворе, в течение 2 часов. 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 МКА визуализировали окрашиванием эреев флуоресцентным реагентом Cy3-стрептавидин (“Invitrogen”, США), разведённым 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 90. Дальнейшую обработку результатов проводили с использованием программ ScanArray Express v.3.0, Microsoft Office Excel 2003/2007 и GraphPad Prism 6.

2.4 Молекулярно-генетические методы

2.4.1 Экстракция РНК

Выделение тотальной РНК проводили из 100–200 мкл суспензии изучаемых клеток (10^5 – 10^6) с использованием реагента TRIzol (“Ambion”, США) в полном соответствии с инструкцией производителя. После экстракции концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (“NanoDrop Technologies”, США), по отношению A_{260}/A_{280} (в норме $\geq 1,9$) оценивали чистоту выделенного препарата.

2.4.2 Обратная транскрипция

Синтез кДНК проводили методом ОТ в 25 мкл реакционной смеси с использованием РНК-зависимой ДНК-полимеразы вируса лейкемии мышей Молони (М-MLV обратной транскриптазы). К образцу тотальной РНК в количестве 0,5–1 мкг добавляли 0,5 мкг олиго-(dT)₁₆ праймеров («ДНК-Синтез», Россия) и доводили объём смеси до 10 мкл стерильной водой (“Sigma-Aldrich”, США), свободной от ДНКаз и РНКаз (такую воду далее использовали во всех экспериментах с НК), затем осуществляли отжиг праймеров на матрице РНК при 70 °С в течение 5 мин в термошейкере Thermomixer comfort (“Eppendorf”, Германия), после чего пробы немедленно охлаждали на льду в течение 2 мин. Данный твердотельный термостат далее использовали для всех одностадийных реакций с участием НК. Далее к 10 мкл пробы добавляли 15 мкл реакционной смеси в 1-кратном буфере для ОТ, которая содержала 200 единиц М-MLV обратной транскриптазы, эквимольную смесь четырёх dNTP по 500 мкМ каждого и 25 единиц ингибитора РНКаз RNasin Plus (все компоненты в смеси производства компании “Promega”, США). Реакцию проводили в течение 1 часа при 42 °С. Пробы кДНК хранили при – 20 °С в течение 1 года.

2.4.3 Полимеразная цепная реакция

ПЦР проводили в 30 мкл реакционной смеси, содержащей 1-кратный Taq-буфер, 4 мМ MgCl₂, 2,5 единицы 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 амплификаторе CFX96 или MJ Mini (“Bio-Rad”, США) по следующим программам:

- для IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-18 и АСТВ: денатурация 95 °С – 4 мин; затем 10 циклов: 95 °С – 30 с; 60 °С – 30 с с понижением на 0,5 °С в каждом следующем цикле, 72 °С – 30 с; затем 30 циклов: 95 °С – 30 с; 55 °С – 30 с, 72 °С – 30 с; затем дополнительная элонгация 72 °С – 4 мин.

- для IL-10, IL-12 β , IFN- γ , TNF и GAPDH: денатурация 95 °С – 4 мин; затем 10 циклов: 95 °С – 30 с; 62 °С – 30 с с понижением на 0,5 °С в каждом следующем цикле, 72 °С – 30 с; затем 30 циклов: 95 °С – 30 с; 57 °С – 30 с, 72 °С – 30 с; затем дополнительная элонгация 72 °С – 4 мин.

2.4.4 Электрофоретическое разделение ДНК в агарозном геле

Детекцию ДНК-продуктов после ОТ-ПЦР проводили в 1–2 % агарозном геле (в зависимости от длины продуктов) на 1-кратном TBE-буфере (0,089 М Tris, 0,089 М борная кислота и 0,002 М ЭДТА) с бромистым этидием (до 0,5 мкг/мл) в камере для горизонтального электрофореза Sub-Cell GT (“Bio-Rad”, США) при постоянном токе 60 мА (напряжение 100–150 В).

2.4.5 Печать олигонуклеотидного микрочипа

Подобранные олигонуклеотидные зонды (п. 3.1.1) синтезировали («ДНК-синтез», Россия), растворяли для печати в 3 \times SSC-буфере (20 \times SSC: 3 М хлорид натрия и 0,3 М цитрат натрия) до конечной концентрации 10 пмоль/мкл и наносили на альдегидные стёкла Vantage Aldehyde Slides (“CEL Associates”, Эстония) методом контактной печати с использованием споттера SpotBot 3 (“Arrayit Corporation”, США). Печать проводили иглой 946MP4 (“Telechem”, США) в условиях 55–60 % влажности и температуре 18–22 °С. После печати слайды оставляли на 1 час в споттере, затем облучали ультрафиолетом (0,09 Дж/см²) с помощью кросслинкера BioLink (“Biometra”, Германия) при 254 нм.

2.4.6 Подготовка пробы кДНК для гибридизации методом ОТ-ПЦР

Подготовка флуоресцентно меченой пробы кДНК состояла из двух этапов: вначале проводили ОТ аналогично протоколу, описанному в п. 2.4.2, затем ПЦР со специфическими праймерами с добавлением одного меченого дезоксирибонуклеотида. Реакционная смесь в объёме 30 мкл содержала: 1-кратный Taq-буфер, 4 mM MgCl₂, 2,5 единицы Taq-полимеразы («Медиген», Россия), по 250 мкМ dATP, dTTP и dGTP, 100 мкМ dCTP («Promega», США), 17 мкМ Cy3(Cy5)-dCTP («ДНК-Синтез», Россия), по 0,3 мкМ прямого и обратного праймеров («ДНК-Синтез», Россия) и 2 мкл неочищенной кДНК из ОТ-смеси. В случае мультиплексной ПЦР (мПЦР) в смесь добавляли несколько пар праймеров (по 0,3 мкМ каждого). Программы амплификации использовали, как описано в п. 2.4.3. Флуоресцентно меченую пробу кДНК из ПЦР-смеси после амплификации без дополнительной очистки использовали для гибридизации на олигонуклеотидном микрочипе.

2.4.7 Подготовка пробы амплифицированной мРНК для гибридизации методом ОТ-IVT

В основе метода подготовки флуоресцентной аРНК-пробы для гибридизации лежит способ линейной глобальной амплификации мРНК, предложенный Д. Эбервайном (*van Gelder et al., 1990*). Метод состоит из двух этапов: ОТ мРНК с использованием олиго-(dT)₁₆ праймеров, конъюгированных с промоторной областью для РНК-полимеразы фага T7, и обратная конверсия кДНК (после достройки второй цепи) в РНК путём транскрипции *in vitro* (IVT).

ОТ проводили с использованием набора AMV RT (Promega, США) в соответствии с прилагаемой инструкцией, за исключением того, что в реакцию добавляли 0,5 мкг праймера T7-(dT18) (5'-AATTCTAATACGACTCACTATAGG-GAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3') («Синтол», Россия). Далее осуществляли синтез второй цепи. Смесь для достройки второй цепи содержала: 1-кратный Taq-буфер, 4 mM MgCl₂, 1,5 единицы Taq-полимеразы («Медиген», Россия), эквимольную смесь четырёх dNTP по 500 мкМ каждого («Promega», США) и

20 мкл неочищенной ОТ-смеси, содержащей оцДНК. После инкубации полученной смеси при 72 °С в течение 1 часа проводили очистку дцДНК от компонентов реакции на колонках GFX PCR DNA Purification Kit (“GE Healthcare Life Sciences”, США) согласно прилагаемому протоколу.

IVT проводили с использованием 50–150 нг очищенной дцДНК. Смесь для IVT объемом 100 мкл содержала: 1-кратный буфер для транскрипции, 10 мМ DTT, 40 единиц T7 РНК-полимеразы (“Promega”, США), 100 единиц ингибитора РНКаз RNasin Plus (“Promega”, США), по 100 мкМ rATP, rCTP и rGTP, 50 мкМ rUTP, 10 мкМ биотин-rUTP («ДНК-Синтез», Россия) и очищенную дцДНК. Реакцию проводили при 37 °С в течение 2 часов. Синтезированную меченную биотином пробу аРНК без дополнительной очистки использовали для гибридизации на олигонуклеотидном микрочипе.

2.4.8 Подготовка библиотек кДНК для гибридизации с использованием набора MINT

Синтез библиотек кДНК осуществляли с использованием набора реактивов MINT («Евроген», Россия) в соответствии с прилагаемой инструкцией производителя. На стадии амплификации кДНК в рекомендуемую смесь дополнительно вносили Су3(Су5)-dCTP до конечной концентрации 20 мкМ. Флуоресцентно меченую пробу кДНК из ПЦР-смеси после амплификации без дополнительной очистки использовали для гибридизации на олигонуклеотидном микрочипе.

2.4.9 Гибридизация на олигонуклеотидном микрочипе

Полученную флуоресцентно меченую пробу доводили Milli-Q H₂O до объема 27 мкл и денатурировали при 99 °С в течение 2 мин, затем охлаждали 2 мин на льду и сразу наносили на микрочип. Смесь для гибридизации в объеме 50 мкл содержала: денатурированную пробу объемом 27 мкл, 20 % формамид, 1 % БСА и 0,1 % SDS в растворе 3× SSC-буфера. Олигонуклеотидные зонды на микрочипе предварительно денатурировали кипячением слайда в Milli-Q H₂O в течение 1 мин с последующей инкубацией в 96 % этаноле (с – 20 °С) в течение 1

мин, после чего слайд высушивали центрифугированием при 300 г в течение 2 мин. Гибридизацию проводили с использованием специальных рамок на 16 субэреев FAST Frame (“Whatman”, США) в объёме 50 мкл гибридизационной смеси на эррей в течение 2 часов при температуре 37 °С с перемешиванием при 250 об/мин на термошейкере для планшетов Biosan PST-60 HL plus (“BioSan”, Латвия). После гибридизации микрочипы отмывали от несвязавшихся молекул пробы и гибридизационной смеси в растворе 1× SSC/0,1 % SDS (по 100 мкл в лунку). При гибридизации ОТ-IVT-пробы проводили дополнительный этап – окрашивание эреев флуоресцентным реагентом Cy3(Cy5)-стрептавидин (“Invitrogen”, США), разведённым 1:500 в растворе 1 % БСА/3× SSC, в течение 15 мин, после чего ещё раз проводили отмывку. После снятия рамок микрочипы дополнительно промывали погружением на 1–2 мин в Milli-Q H₂O, а затем высушивали центрифугированием при 300 г в течение 2 мин. Сканирование биочипов проводили на сканере ScanArray Express (“PerkinElmer”, США) с разрешением 5 мкм и значением PMT в пределах 70–90. Дальнейшую обработку результатов проводили с использованием программ ScanArray Express v.3.0 и Microsoft Office Excel 2003/2007.

2.4.10 Мультиплексная ПЦР с детекцией в режиме реального времени

мПЦР с детекцией в режиме реального времени проводили в 30 мкл реакционной смеси, содержащей 1-кратный Taq-буфер, 4 мМ MgCl₂, 5 единиц 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, подобранных в ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России и синтезированных в компании «ДНК-Синтез» (Россия). Количественное соотношение праймеров и олигонуклеотидных TaqMan зондов в реакционных смесях было оптимизировано экспериментально:

SET1 содержал по 0,7 мкМ праймеров и 0,47 мкМ зонда к GAPDH; по 0,4 мкМ праймеров и 0,27 мкМ зонда к IL-1 β ; по 0,15 мкМ праймеров и 0,1 мкМ зонда к IL-12 β ; по 0,85 мкМ праймеров и 0,57 мкМ зонда к IFN- γ .

SET2 содержал по 0,65 мкМ праймеров и 0,43 мкМ зонда к GAPDH; по 0,15 мкМ праймеров и 0,1 мкМ зонда к IL-10; по 0,15 мкМ праймеров и 0,1 мкМ зонда к IL-4; по 0,4 мкМ праймеров и 0,27 мкМ зонда к TNF.

SET3 содержал по 0,7 мкМ праймеров и 0,47 мкМ зонда к GAPDH; по 0,15 мкМ праймеров и 0,1 мкМ зонда к IL-6; по 0,6 мкМ праймеров и 0,4 мкМ зонда к IL-18; по 0,15 мкМ праймеров и 0,1 мкМ зонда к IL-2.

мПЦР проводили в амплификаторе CFX96 (“Bio-Rad”, США) по следующей программе: 95 °C – 4 мин; затем 5 циклов: 95 °C – 30 с; 57 °C – 30 с, 72 °C – 60 с; затем 35 циклов: 95 °C – 30 с; 57 °C – 30 с, 72 °C – 60 с с детекцией по четырём каналам: FAM, HEX, ROX и Cy5.

2.4.11 Детекция вирусной РНК методом ПЦР

Для оценки количества вирусной РНК в пробах использовали рекомендованные CDC (Центры по контролю и профилактике заболеваний США) праймеры InfA (InfA F 5'-GACCRATCCTGTACCTCTGAC-3'; InfA R 5'-AGGG-CATTYTGGACAAAKCGTCTA-3'; InfA P 5'-FAM-TGCAGTCCTCGCTCACTGG-GCACG-BHQ1-3'), разработанные для типирования ВГА. Для нормализации исходного количества РНК использовали праймеры CDC к РНКазе Р (RNase P F 5'-AGATTTGGACCTGCGAGCG-3'; RNase P R 5'-GAGCGCCTGTCTCCACA-AGT-3'; RNase P P 5'-FAM-ТТСТГАССТГААГГСТСТГCGCG-BHQ1-3'). ПЦР проводили в соответствии с рекомендациями CDC с использованием SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR Kit (“Invitrogen”, США).

2.5 Методы вычислительной биологии

2.5.1 Филогенетический анализ гена NS1 вируса гриппа типа А

Для филогенетического анализа гена NS1 были выбраны все генетически различающиеся полноразмерные последовательности NS штаммов ВГА человека,

представленные в базе данных GenBank на декабрь 2013 год (всего 5856 последовательностей). Выравнивание проводили по алгоритму FFT-NS-2 для большого количества последовательностей в программе MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>). Для дальнейшего филогенетического анализа использовали 946 репрезентативных последовательностей, отобранных с помощью функции пакета CD-HIT по критерию идентичности более 95% (<http://weizhong-lab.ucsd.edu/cd-hit/>).

Филогенетический анализ проводили методом максимального правдоподобия с использованием алгоритма RAxML (*Stamatakis et al., 2005*) на сервере <http://www.fludb.org>. Филогенетическое дерево визуализировали и аннотировали в программе Archaeopteryx (*Han&Zmasek, 2009*).

2.5.2 Общие стратегии при конструировании олигонуклеотидных зондов и праймеров

Для работы использовали последовательности мРНК цитокинов IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 β , IL-18, IFN- γ и TNF, а также АСТВ и GAPDH, депонированные в базе данных GenBank.

Дизайн олигонуклеотидных зондов проводили в программе OligoWiz 2.1 (*Wernersson et al., 2007*), основываясь на следующих критериях: длина зонда в пределах от 45 до 55 н., температура плавления рассчитывается исходя из модели, принятой для гетеродуплекса РНК-ДНК, положение на последовательности мРНК и параметры для оценки уровня перекрёстной гибридизации приняты по умолчанию. Выбранные для иммобилизации олигонуклеотидные зонды дополнительно анализировали в программах BLAST (*McGinnis&Madden, 2004*) для выявления спектра возможной неспецифической гибридизации и MFold (*Zuker, 2003*) на предмет наличия вторичных структур типа «шпильки». В 5'-область последовательностей олигонуклеотидных зондов дополнительно был введён С6-спейсер со свободной аминогруппой для иммобилизации. Спейсерный участок должен уменьшать стерические препятствия при иммобилизации зонда на подложке, способствуя гибридизации.

Подбор праймеров для подготовки пробы для гибридизации проводили в программе Primer3 (Rozen&Skaletsky, 2000). Дизайн осуществляли так, чтобы ампликон включал в себя участок, комплементарный олигонуклеотидному зонду, а прямой и обратный праймеры располагались в разных экзонах.

Праймеры и TaqMan зонды для мПЦР были подобраны в программах Primer3 и PrimerQuest (<http://www.idtdna.com/Scitools>) к кодирующей области мРНК, при заданных расчётных температурах плавления праймеров 58 ± 1 °С, условии наличия интрона, разделяющего области посадки прямого и обратного праймеров, и расположения TaqMan зонда на стыке двух экзонов. Из панелей подобранных праймеров с использованием программы jPCR (Kalendar et al., 2011) были сформированы 3 группы (SET) для постановки мПЦР, одновременно выявляющей мРНК трёх цитокинов и АСТВ, либо GAPDH, с детекцией по четырём каналам FAM, HEX, ROX и Cy5. Выбранные последовательности тщательно проверяли с целью исключить их возможное неспецифическое связывание, которое может привести к ингибированию ПЦР или, наоборот, к появлению ложноположительных результатов. Главным критерием при этом было отсутствие стабильных гетеродимеров между парами праймеров и олигонуклеотидными зондами, используемыми в одной реакции.

Праймеры, TaqMan зонды и олигонуклеотиды для иммобилизации на микрочипе были синтезированы фирмой «ДНК-Синтез» (Россия).

2.5.3 Анализ изображения, получаемого после гибридизации

Флуоресцентный сигнал от ячеек микрочипа регистрировали с помощью сканирующего анализатора ScanArray Express (“PerkinElmer”, США) при длинах волн возбуждения/эмиссии 550/570 нм для Cy3, и 649/670 нм для Cy5. С использованием прилагаемого программного обеспечения на полученное пиксельное изображение биочипа накладывали матрицу, соответствующую схеме эррея. Далее проводили поиск спотов и расчёт интенсивностей флуоресценции пикселей в спотах по алгоритму Adaptive circle с циклической нормализацией при помощи локальной регрессии LOWESS.

В качестве результативных данных использовали медианные значения флуоресценции спота за вычетом сигнала фона, выраженные в относительных единицах (ед.). Алгоритм дальнейшей обработки сигналов зависел от конкретной исследовательской задачи.

2.5.4 Анализ результатов мПЦР

Эффективность амплификации рассчитывали по углу наклона стандартной кривой (α), полученной серией 10-кратных разведений специфических ампликонов, по формуле: $E = 10^{-(1/\alpha)}$ или $E(\%) = (E - 1) * 100 \%$. Расчет относительной экспрессии цитокинов проводили по методу дельта-дельта C_t ($\Delta\Delta C_t$), используя GAPDH в качестве нормировочного гена. Относительный уровень экспрессии генов рассчитывали по индуктивной формуле $R = 2^{-[\Delta\Delta C_t]}$. Все вычисления осуществляли с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2003/2007.

Коэффициент вариации мПЦР определяли по формуле: $V(\%) = (\sigma/C) * 100\%$, где σ – среднеквадратическое отклонение, C – среднее значение по всем измерениям.

2.5.5 Статистические методы анализа

Оценку статистической достоверности различий проводили при помощи компьютерной программы GraphPad Prism 6 с использованием теста непараметрических критериев Манна-Уитни (при сравнении двух малых независимых выборок) и критерия Краскала-Уоллиса (для оценки значимости различий в трёх и более независимых группах). Различия считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$. Для представления полученных данных использовали такие показатели описательной статистики, как среднеарифметическое значение и ошибка среднего (О.С.).

3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Выбор штаммов вирусов гриппа А и клеточной модели для изучения особенностей экспрессии цитокинов

Для изучения особенностей экспрессии цитокинов, индуцированной ВГА, выбрали штаммы, которые относятся к разным подтипам, обладают различной степенью патогенности и адаптации к человеку и отличаются по происхождению гена NS. Последнее связано с тем, что многофункциональный неструктурный белок NS1 вносит значительный вклад в патогенность вирусов гриппа, блокируя продукцию IFN I типа и регулируя экспрессию провоспалительных цитокинов и хемокинов (*Fernandez-Sesma et al., 2006*).

Генетическая история современных ВГА человека отслеживается от штамма A/BrevigMission/1/1918 (H1N1), последовательность генома которого была реконструирована методами археовирусологии (*Taubenberger&Kash, 2010*). Вирус 1918 года вызвал самую глобальную из документированных пандемий гриппа – «испанку», унесшую жизни не менее 50 миллионов человек. Считается, что вирус «испанки» произошел из пула ВГА птиц и является предковым для всех сезонных и пандемических вирусов, циркулирующих с тех пор в популяции человека (*Taubenberger&Kash, 2010*). В 1957 году произошло замещение вирусов A/H1N1 на вирусы A/H2N2 (пандемия «азиатского» гриппа) в результате реассортации с вирусами гриппа ВГА птиц и замены сегментов, кодирующих HA, NA и PB1. В 1968 году вирусы A/H2N2 были вытеснены из циркуляции новыми вирусами A/H3N2, в которых произошло замещение сегментов, кодирующих HA и PB1. Вызванная вирусами A/H3N2 пандемия, получившая название «гонконгский» грипп, характеризовалась низким уровнем смертности, сопоставимым с таковым при непандемическом сезонном гриппе. В 1977 году произошло, не сопровождающееся глобальной пандемией, возвращение в циркуляцию вирусов A/H1N1. С этого времени ВГА подтипов H1N1 и H3N2 совместно присутствовали в популяции человека вплоть до 2009 года. Следует отметить, что во всех

вышеописанных ВГА сохранялся исходный сегмент NS, ведущий свое происхождение от вируса A/BrevigMission/1/1918 (H1N1). Так как вирусы A/H2N2 в настоящее время не циркулируют в популяции человека, для анализа влияния на цитокиновый статус выбрали ВГА подтипов H1N1 и H3N2. Штамм A/Puerto Rico/8/34 является референтным штаммом вируса гриппа A/H1N1 и филогенетически близок штамму A/BrevigMission/1/1918. Штамм A/Victoria/361/11 относится к слабо патогенным сезонным ВГА человека подтипа H3N2 и рекомендован ВОЗ в качестве основы для создания вакцинных препаратов на 2013-2014 гг.

В 2009 году произошла пандемия, вызванная появлением нового вируса A/California/07/09 (H1N1_{pdm09}), произошедшего из ВГА свиней двух неродственных линий (*Киселёв, 2011*). Геном вирусов A/H1N1_{pdm09} содержит сегменты NA и M, относящиеся к свиным вирусам подтипа H1N1 Евразийской линии, которые имеют птичье происхождение. Все остальные сегменты генома ВГА H1N1_{pdm09} произошли от тройного реассортантного вируса A/H1N2, в котором гены NA, NP, M и NS принадлежат свиным вирусам «классической» линии, происходящим от вируса 1918 года, гены PB2 и PA происходят от ВГА птиц, а ген PB1 – от сезонных вирусов A/H3N2 человека (*Taubenberger&Kash, 2010*). Таким образом, в вирусах A/H1N1_{pdm09} человека ген NS происходит от вируса 1918 года, однако он эволюционировал в пуле вирусов, циркулирующих в популяции свиней. Пандемический штамм A/California/07/09, выбранный для анализа экспрессии цитокинов, относится к умеренно патогенным вирусам (*Киселёв, 2011*).

Кроме того, имеют место периодические случаи прямой межвидовой передачи ВГА от птиц к человеку (*Киселёв, 2012*). Наиболее известными и потенциально самыми опасными были случаи инфицирования людей высокопатогенными штаммами ВГА птиц подтипа H5N1, смертность от которых достигала 50%. Данные вирусы не имеют общих по происхождению с сезонными вирусами сегментов генома, в том числе NS. С целью анализа цитокинового

ответа использовали рекомбинантные штаммы, полученные на основе вируса A/chicken/Kurgan/05/2005.

Таким образом, для анализа цитокинового статуса в клетках выбрали отличающиеся степенью патогенности, адаптации к человеку и филогенетической удаленности штаммы A/Victoria/361/11 (H3N2), A/California/07/09 (H1N1_{pdm09}), A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1), а также рекомбинантные штаммы A/H5N1 на основе A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (рис. 3.1).

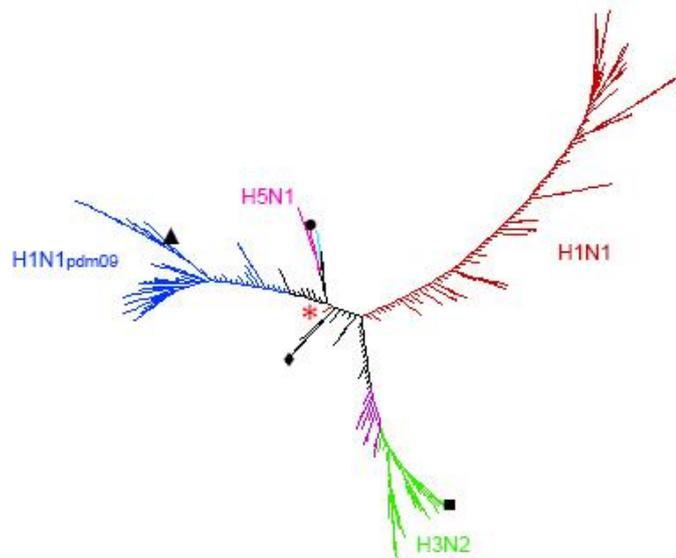


Рисунок 3.1 Схема филогенетического дерева белка NS1 вирусов гриппа А человека, построенного методом максимального правдоподобия по алгоритму **RaxML**. * – A/BrevigMission/1/1918 (H1N1); ◆ – A/Puerto Rico/8/34 (H1N1); ■ – A/Victoria/361/11 (H3N2); ▲ – A/California/07/09 (H1N1_{pdm09}); ● – A/Kurgan/05/05 (H5N1).

Сравнение аминокислотных последовательностей белков NS1 вышеприведенных штаммов показало, что они различаются наличием как точечных мутации, так и делеций (рис. 3.2, табл. 3.1). В белке NS1 вируса A/chicken/Kurgan/05/2005 наряду с небольшим количеством замен имеется делеция участка в положении 80-84. В штамме A/California/07/09 в белке NS1 наблюдаются многочисленные мутации (в положениях 6, 18, 59, 74, 76, 78, 86, 114 и т.д.), а также делеция 11 аминокислот на С-конце молекулы, соответствующих PDZ-связывающему домену, являющемуся фактором патогенности вирусов гриппа А/Н5N1 (Киселёв, 2011; Киселёв, 2012).

NS1 белок вируса гриппа типа А

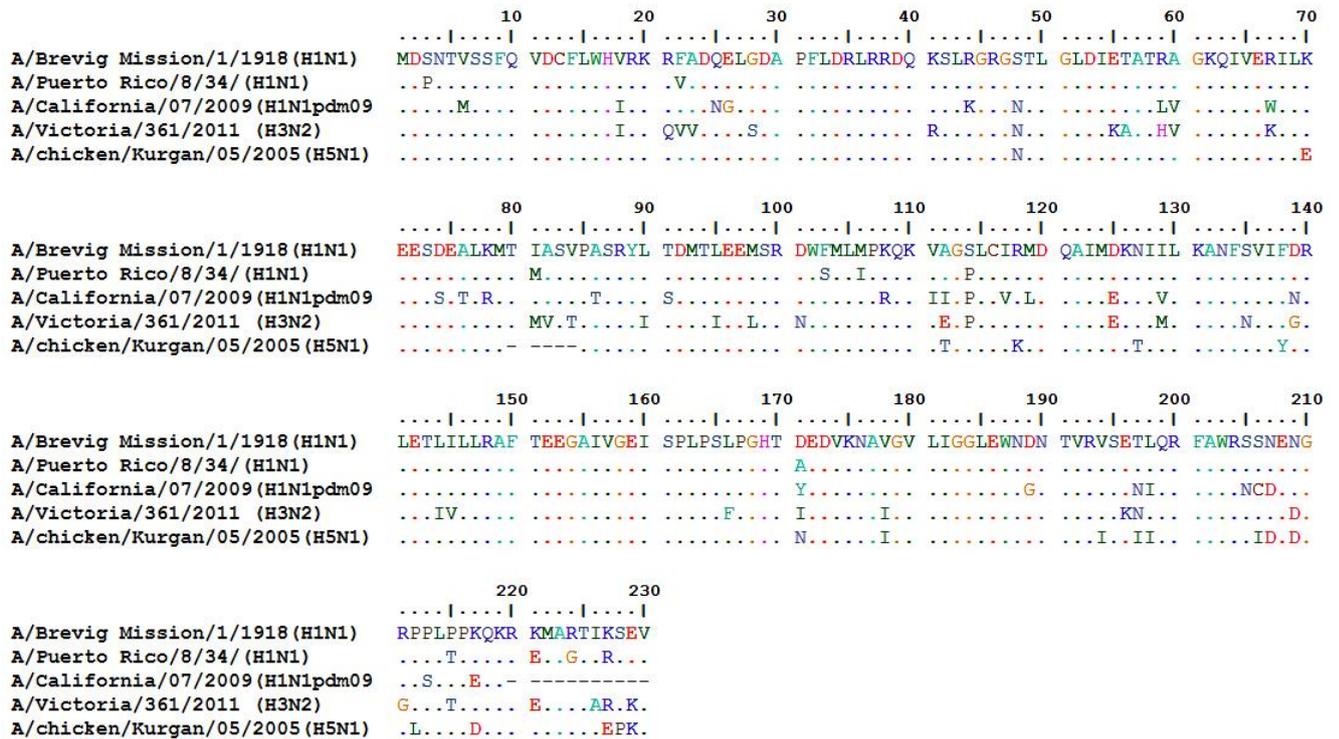


Рисунок 3.2 Выравнивание аминокислотных последовательностей белка NS1 вирусов гриппа A/BrevigMission/1/1918 (H1N1), A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/Victoria/361/11 (H3N2), A/California/07/09 (H1N1_{pdm09}) и A/chicken/Kurgan/05 (H5N1).

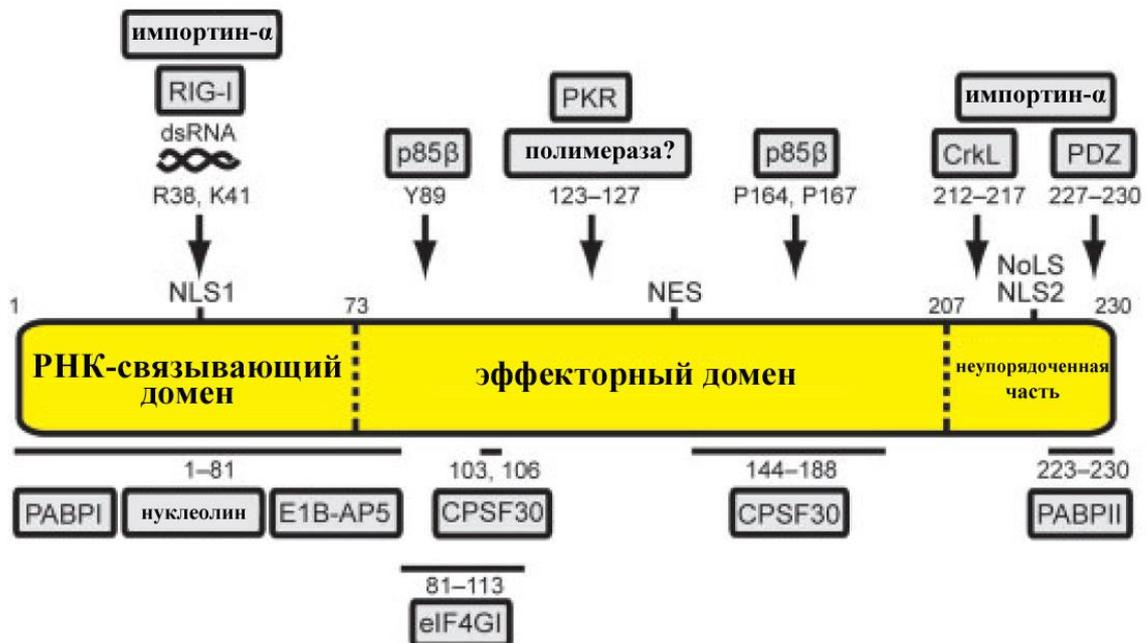


Рисунок 3.3 Схематическое представление функциональных доменов белка NS1 вируса гриппа А (Hale et al., 2008). На схеме представлены основные домены взаимодействия NS1 с клеточными и вирусными факторами.

Таблица 3.1
Характеристика ВГА, используемых в работе

название	подтип	происхождение и степень патогенности	Лиганд для PDZ-домена ¹	Делеция 80-84 ²	CPSF30 ³			P85β ⁴			дцРНК ⁵		PKR ⁶ 123-127
					Делеция 191-195 ⁷	103 п.	106 п.	89 п.	164 п.	167 п.	38 п.	41 п.	
A/BrevigMission/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/05/2005	H5N1	высокопатогенный вирус гриппа птиц	EPKV	делеция	нет	F	M	Y	P	P	R	K	IMDKT

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

² Делеция приводит к усилению вирулентности вируса гриппа.

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 подавления апоптоза клеток.

⁵ дцРНК – связывание NS1 с 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 серин/треониновая протеинкиназа, участвующая в ингибировании белкового синтеза.

⁷ Делеция уменьшает стабильность NS1, ослабляя его активность как антогониста системы IFN α/β и приводя к аттенуации вируса.

Провели анализ аминокислотных замен в доменах NS1, участвующих во взаимодействии с клеточными белками, так или иначе связанными с продукцией цитокинов (рис. 3.3, табл. 3.1). Белки NS1 всех исследуемых вирусов содержали область 191-195, влияющую на вирулентность ВГА и способность NS1 проявлять функции антогониста системы IFN α/β . Предполагается, что делеция данного участка дестабилизирует белок NS1 и препятствует его связыванию с клеточным фактором CPSF30, что приводит к увеличению синтеза клеточных пре-мРНК, кодирующих обладающие антивирусным действием белки, в том числе IFN. Наряду с этой делецией ключевое влияние на связывание NS1 с CPSF30 оказывают аминокислотные остатки в 103 и 106 положениях. При анализе данных участков отличия были обнаружены только для штамма A/Puerto Rico/8/34. В позициях, ответственных за связывание с клеточным белком P85 β , все штаммы ВГА имели одинаковые аминокислотные остатки: тирозин – в 89-ом и пролин – в 164/167-ом положениях. Молекулярный механизм NS1-опосредованной активации P85 β в настоящее время известен не полностью, однако, предполагается, что именно через P85 β NS1 регулирует такие клеточные процессы как супрессия цитокинов в дендритных клетках, возрастание уровня трансляции мРНК и подавление различных сигнальных путей врождённого иммунитета (*Hale et al., 2008*). Выявленная для штамма A/chicken/Kurgan/05/2005 делеция аминокислотных остатков в 80-84 положениях NS1 по данным литературы приводит к усилению вирулентности (*Long et al., 2008*).

В исследуемых штаммах вирусов гриппа A/H1N1 1918 и 1934 годов и A/H3N2 2011 года были выявлены PDZ-связывающие области, характерные для изолятов популяции человека соответствующих временных периодов. В штамме H1N1_{pdm09} была обнаружена делеция PDZ-связывающей области. Высокопатогенный вирус гриппа птиц содержал нехарактерный для вирусов гриппа A/H5N1 лиганд ЕРКV (*Obenauer et al., 2006*).

Исходя из вышеприведенных данных, а также данных литературы о цитокиновом ответе, индуцированном штаммами разных подтипов ВГА, следует ожидать, что профили экспрессии цитокинов в клетках, инфицированных

вирусами A/Victoria/361/11 (H3N2), A/California/07/09 (H1N1_{pdm09}) и A/Kurgan/5/05 (H5N1), будут отличаться. Таким образом, данные вирусы могут быть применены для отработки методов оценки особенностей грипп-индуцированной экспрессии цитокинов.

В качестве клеточной модели гриппозной инфекции выбрали клеточную линию карциномы легкого человека A549, часто используемую для изучения взаимодействия между ВГА и клеткой-хозяином. Выбор был обусловлен тремя критериями. Во-первых, основными мишенями вируса гриппа являются клетки эпителия верхних и нижних дыхательных путей, а клетки A549 представляют собой пневмоциты II типа (*Nardone&Andrews, 1979*). Во-вторых, разрабатываемые системы предназначены для определения экспрессии цитокинов в организме человека, а A549 являются клетками человека. В-третьих, для клеток A549 было показано наличие сиаловых рецепторов (преимущественно $\alpha 2,3$), узнаваемых ВГА (*Hidary et al., 2013*).

3.2 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

3.2.1 Подбор олигонуклеотидных зондов и праймеров для мРНК цитокинов-мишеней IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 β , IL-18, IFN- γ , TNF- α человека

Последовательности мРНК IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 β , IL-18, IFN- γ , TNF- α взяли из базы данных GenBank. Гены анализируемых цитокинов локализованы на разных хромосомах, длины зрелых транскриптов составляют от 800 до 2350 нуклеотидов. мРНК IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, IL-12 β , IFN- γ и TNF- α представлены единственными транскрипционными вариантами, для мРНК IL-4 и IL-18 имеется по два альтернативно сплайсированных варианта мРНК.

На первом этапе работы подобрали олигонуклеотидные зонды и праймеры для специфического выявления мРНК IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 β , IL-18, IFN- γ , TNF- α и генов «домашнего хозяйства» ACTB и GAPDH человека.

(табл. 3.1). Олигонуклеотидные зонды подбирали с учетом следующих требований:

- зонды должны соответствовать областям мРНК, расположенным преимущественно на стыке двух экзонов, чтобы избежать нежелательной гибридизации зондов с геномной ДНК;
- зонды должны быть комплементарны антисмысловой нити генов, что даёт возможность проводить гибридизацию с флуоресцентно мечеными пробами, полученными в процессе обратной транскрипции (ОТ), обратной транскрипции, совмещенной с полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР), или обратной транскрипции, совмещенной с *in vitro* транскрипцией (ОТ-IVT);
- разброс расчётных температур плавления нуклеотидных дуплексов при гибридизации на микрочипе не должен превышать 2–3 °С;
- праймеры должны быть подобраны таким образом, чтобы образующийся в процессе ПЦР ампликон содержал последовательность, комплементарную олигонуклеотидному зонду;
- зонды и праймеры для IL-4 и IL-18 должны выявлять оба существующих транскрипционных варианта соответствующих мРНК.

Наличие в олигонуклеотидном зонде участков стабильной вторичной структуры уменьшает специфичность его связывания с кДНК (кРНК) и препятствует прохождению гибридизации. С использованием программы Mfold (п. 2.5.2) показали, что зонды не обладают склонностью к образованию устойчивых вторичных структур, а также гомо- и гетеродимеры при предполагаемой температуре гибридизации.

С помощью BLAST анализа для выявления возможного спектра неспецифической гибридизации показали, что последовательности выбранных зондов и праймеров не имеют высокогомологических участков среди других генов человека.

При дизайне праймеров мы не смогли подобрать последовательности с одинаковыми температурами плавления, удовлетворяющие всем прочим

условиям (специфичность, отсутствие вторичных структур и т.п.) Расчётные температуры плавления для разных пар праймеров сильно варьировали в пределах от 55 °С до 62 °С, что затрудняло их использование при одном температурном профиле реакции. В связи с этим экспериментально оптимизировали условия проведения ПЦР для всех пар праймеров. Чтобы нивелировать разницу в температурах плавления использовали “touchdown” подход, при котором каждый последующий цикл ПЦР проводят с понижением температуры отжига. При таком методе система проходит через полосу оптимальной специфичности праймеров к молекулам кДНК. В результате предложили два температурных режима проведения ПЦР, при которых эффективно работали все подобранные пары праймеров. Условия проведения ПЦР приведены в п. 2.4.3.

3.2.2 Создание лабораторного образца олигонуклеотидного микрочипа для анализа экспрессии цитокинов и выбор условий проведения основных этапов гибридизации

Подобранные в п. 3.1.1 олигонуклеотидные зонды синтезировали и использовали для изготовления лабораторного образца олигонуклеотидного микрочипа для оценки экспрессии цитокинов. Чип состоял из 12-ти идентичных массивов точек, каждый из которых содержал олигонуклеотидные зонды, комплементарные антисмысловой нити генов цитокинов IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 β , IL-18, IFN- γ и TNF- α человека (рис. 3.4).

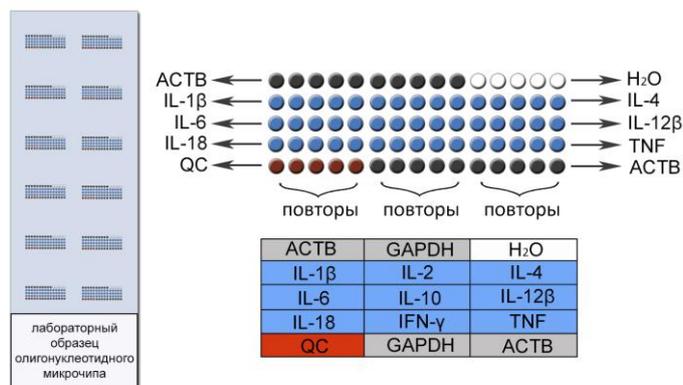


Рисунок 3.4 Схема лабораторного образца олигонуклеотидного микрочипа для анализа уровня экспрессии цитокинов IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 β , IL-18, IFN- γ и TNF- α человека

Таблица 3.2

Олигонуклеотидные зонды и праймеры для выявления 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 биочипа

№	цитокин	номер в базе данных NCBI	последовательность олигонуклеотидного зонда, 5'-3'	Tm, °C (Nearest Neighbor) ⁸	координаты зондов	последовательности праймеров, 5'-3'	Tm, °C ⁹	координаты праймеров	Длина ПЦР продукта
1	IL-1 β	NM_000576	TTTGAAGAAGAACCTATCTTCTTCGACACA TGGGATAACGAGGCTTATGTG	70,26	379-429	TCGAGGCACAAGGCACAACAG	57,61	12-32	553
						GGAGAACACCACTTGTTGCTCCA	57,17	542-564	
2	IL-2	NM_000586	CAGCAACCATTGTAGAATTTCTGAACAGA TGGATTACSTTTTGTCAAAGCATCA	70,02	447-500	CCCAAACCTCACCAGGATGCTCA	56,55	215-236	480
						CATTTTAGAGCCCCTAGGGCTTAC A	56,08	670-694	
3	IL-4	NM_000589	GCTGATTGGCCCCAAGTGACTGACAATCT GGTGTAACGAAAATTT	69,06	191-235	AGCAGCCCCAAGCTGATAAGATT	56,22	25-47	758/ 710
						CCAAGAAGTTTCCAACGTACTCT GG	56,24	757-782	
4	IL-6	NM_000600	CCTGAACCTTCCAAAGATGGCTGAAAAAG ATGGATGCTTCCAATCTG	70,56	383-429	GCCACCGGGAACGAAAGAG	57,63	67-86	392
						TTTACCAGGCAAGTCTCCTCATTG	57,21	434-458	
5	IL-10	NM_000572	GATGATTAATTCACCTTCCAGTGTCTCGGA GGGATTCCCCTAACCTC	69,43	1086-1132	TGAGGCTACGGCGCTGTCATC	59,00	421-441	751
						AGCTGGCCACAGCTTTCAAGAATG A	59,15	1147-1171	
6	IL-12 β	NM_002187	AGAAAAGAAAGATAGAGTCTTCACGGACA AGACCTCAGCCACGGTC	70,76	891-936	TGACGTGCGGAGCTGCTACA	58,46	545-564	493
						ATCAGAACCTAACTGCAGGGCACA	58,08	1014-1037	
7	IL-18	NM_001562	AGAAATTTGAATGACCAAGTTCTCTTCATT GACCAAGGAAATCGGCCTC	69,44	365-413	TGTCGCAGGAATAAAGATGGCTGC T	58,81	205-229	309/ 297
						ACAGCCATACCTCTAGGCTGGCT	58,92	491-513	
8	IFN- γ	NM_000619	AGCCAGTGCTTTAATGGCATGTCAGACAG AACTTGAATGTGTCAGG	71,03	1015-1060	TGACCAGAGCATCCAAAAGAGTGT GG	58,97	381-406	725
						ACCAGGCATGAAATCTCCTGAGAT GC	58,91	1080-1105	
9	TNF	NM_000594	GACCTCACCTAGAAATTGACACAAGTGGA CCTTAGGCCTTCTCTCTCC	71,2	1203-1251	CCCTCTGGCCCAGGCAGTCA	60,18	382-401	911
						GAGGGCTGGGCTCCGTGTCT	60,25	1273-1292	
10	GAPDH	NM_002046.4	ACACCATGGGGAAGGTGAAGGTCGGAGTC AACGGATTTGGTCGTATT	70,26	170-216	CAGTCAGCCGCATCTTCTTTTGCCT CG	62,74	121-147	130
						CAGAGTTAAAAGCAGCCCTGGTGA CCAGG	62,71	222-250	
11	ACTB	NM_001101.3	TCCTGTGGCATCCACGAACTACCTTCAAC TCCATCATGAAGTGTGACGTGGACA	73,19	895-949	GAAGATCCTCACCGAGCGCG	57,62	654-673	327
						AGCACTGTGTTGGCGTACAG	55,15	961-980	

⁸ <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>

⁹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

На микрочип также нанесли контрольные зонды, позволяющие выявить гены «домашнего хозяйства» АСТВ и GAPDH. Для контроля процедуры отмывки иглы споттера использовали точки, содержащие Milli-Q H₂O. В качестве положительного контроля прохождения гибридизации на микрочип иммобилизовали зонд QC, 5'-GCGCCTGACTAGTCAGTAGTATAACGCCCGTT-TGAAATGGTTAACCGGTGC-3'. Зонд QC также использовали для отработки основных этапов гибридизации и определения чувствительности микрочипа. Все точки наносили в пяти повторах, обеспечивающих статистическую достоверность получаемых при анализе данных. Чипы хранили при комнатной температуре не более года.

3.2.3 Выбор условий проведения основных этапов гибридизации на олигонуклеотидном микрочипе

Условия проведения гибридизации на микрочипе подбирали с использованием контрольного зонда СуЗ-QC*, представляющего собой флуоресцентно меченый олигонуклеотид 5'-GCACCGGTТААССАТТТС-АААСGGGCGTTАТАСТАСТGACTAGTCAGGCGC-3'. Каждая молекула СуЗ-QC* содержала на 5`-конце по одной молекуле цианинового флуоресцентного красителя СуЗ. Зонд СуЗ-QC* был полностью комплементарен иммобилизованному на чипе зонду QC.

На первом этапе провели выбор состава буфера для гибридизации. Гибридизационный раствор, помимо непосредственно меченой пробы, должен содержать формамид, ионы солей Na⁺, K⁺, детергенты и блокирующие реагенты, уменьшающие фоновый сигнал. Мы рассмотрели пять вариантов буферов, используемых в различных протоколах для проведения нозерн-блот гибридизации:

- (1) 6 × SSPE, 20 % формамид;
- (2) 3 × SSC, 0,1 % SDS, 1 % БСА, 20 % формамид;
- (3) 6 × SSC, 1× раствор Денхардта, 25 мкг/мл неспецифической дрожжевой тРНК, 20 % формамид;
- (4) коммерческий буфер ULTRAHyb (“Ambion”, США);

(5) 0,5 % желатин, 20 % формамид.

Зонд Су3-QC* в количестве 0,001 пмоль растворяли в каждом из вышеописанных буферов и гибридизовали с микрочипом при 37 °С в течение 2 часов. Подробный протокол проведения гибридизации и серии отмывок приведен в п. 2.4.9.

Как видно из результатов, представленных на рис. 3.5 А, стабильный флуоресцентный сигнал, свидетельствующий о связывании контрольного образца Су3-QC* с комплементарным ему зондом QC, наблюдали только при использовании буферов (1), (2) и (4). Проведение гибридизации без блокирующих компонентов приводило к увеличению интенсивности флуоресценции фона, обусловленному неспецифическим связыванием зонда Су3-QC* со свободными активными группами подложки микрочипа.

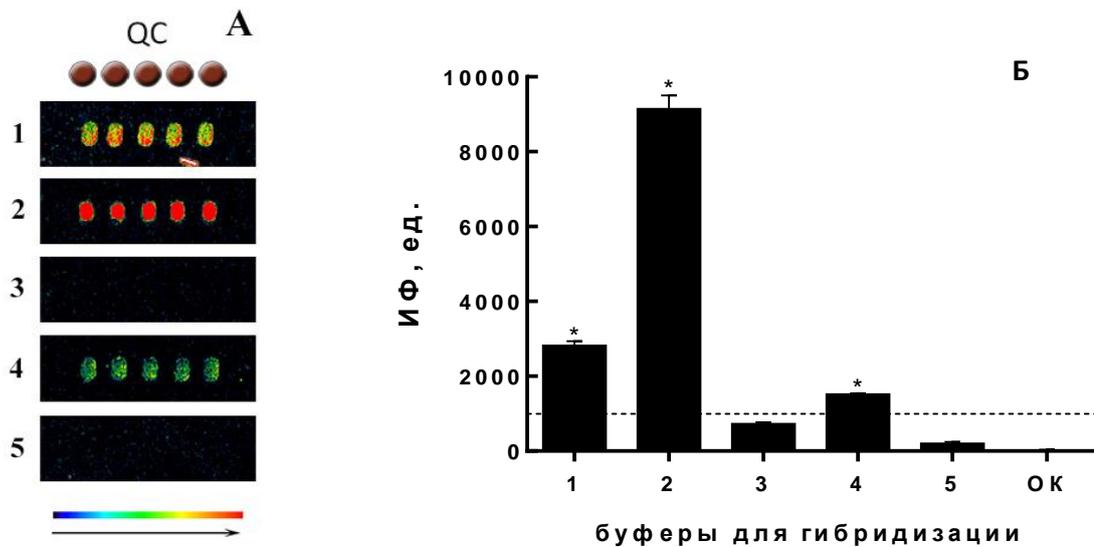


Рисунок 3.5 Результаты гибридизации микрочипа с контрольной пробой Су3-QC* при использовании различных блокирующих реагентов. Составы блокирующих буферов 1, 2, 3, 4 и 5 указаны в тексте. А – изображения эрреев, полученные после сканирования (представлены только споты, соответствующие зонду QC); Б – средние значения ИФ спотов ± О.С. ОК – отрицательный контроль (20 % формамид, 3 × SSC-буфер). Звёздочками показаны значимые отличия ИФ от ОК ($p < 0,05$, критерий Краскела-Уолиса). Пунктирной линией обозначено пороговое значение, равное 1000 ед.

Интенсивность флуоресценции точек на микрочипе оценивали количественно (рис 3.5 Б). Наибольший сигнал флуоресценции (≈ 9000 единиц) наблюдали при использовании буфера (2). Интенсивность флуоресценции, детектируемой в случаях использования буферов (1) и (4), была значительно

меньше и составляла ≈ 2800 и ≈ 1500 единиц, соответственно. Флуоресцентные сигналы, полученные при гибридизации пробы в буферах (3) и (5), были выше значений флуоресценции отрицательного контроля, но не превышали выбранного порогового значения флуоресценции.

Основываясь на полученных данных, для гибридизации флуоресцентно меченых проб с зондами на микрочипе в дальнейшем использовали буфер (2), содержащий $3 \times \text{SSC}$, 0,1 % SDS, 1 % БСА и 20 % формамид.

3.2.4 Оценка аналитической чувствительности олигонуклеотидного микрочипа

На следующей стадии оценили аналитическую чувствительность микрочипа. Для определения верхнего и нижнего пределов детекции провели гибридизацию биочипа с контрольной пробой СуЗ-QC* в количествах от 10^{-5} до 1 пмоль, полученных серией десятикратных разведений.

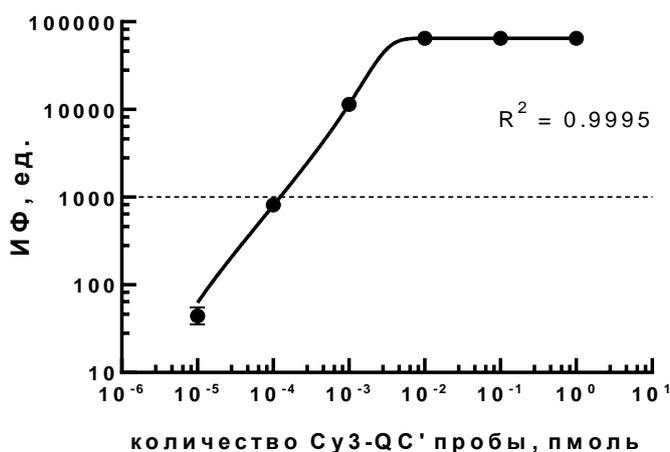


Рисунок 3.6 Стандартная кривая, полученная при гибридизации микрочипа с зондом СуЗ-QC*. Указаны средние значения интенсивности флуоресценции (ИФ) пяти точек \pm О.С. Пунктирной линией обозначено пороговое значение, равное 1000 ед. Для экстраполяции использована сигмоидальная логарифмическая модель с четырьмя параметрами.

Количественная обработка полученных изображений флуоресценции (Рисунок 3.6) показала нелинейный характер зависимости величины регистрируемого сигнала от концентрации СуЗ-QC*, кривая имеет предположительно сигмоидальный вид с протяжённым экспоненциальным участком. Аналитический диапазон чувствительности составил от 10^{-4} до 10^{-2} пмоль. Несмотря на то, что аппаратно регистрировали и более низкие количества

пробы Су3-QС* (10^{-5} пмоль), величина интенсивности флуоресценции при этом не преодолевала выбранное пороговое значение, равное 1000 единиц. При количестве пробы свыше 10^{-1} пмоль регистрируемые сигналы флуоресценции выходили на плато.

Таким образом, аналитический диапазон чувствительности микрочипа составил от 10^{-4} до 10^{-2} пмоль

3.2.5 Выбор способа подготовки флуоресцентно меченой пробы для анализа на микрочипе на примере клеток А549, инфицированных вирусом гриппа А/Kurgan/5/05 (H5N1).

Флуоресцентное мечение нуклеотидных проб для гибридизации на микрочипе можно проводить двумя способами. В первом случае используют праймер, содержащий флуоресцентный краситель на 5'-конце. При этом величина регистрируемого сигнала флуоресценции практически эквивалентна количеству меченой пробы, так как одна молекула мишени содержит только одну молекулу флуоресцентной метки. Во втором случае проводят встраивание конъюгированного с флуорофором дезоксинуклеотидтрифосфата в *de novo* синтезируемую цепь (Наседкина, 2009). В этом случае количество молекул флуорофора в одной молекуле пробы будет зависеть от первоначального содержания нуклеотида в реакционной смеси и от пространственной конфигурации флуоресцентной метки. Вследствие невысокой копийности мРНК цитокинов в образцах подготовку пробы для гибридизации решили проводить с использованием второго подхода, который позволяет проводить амплификацию регистрируемого сигнала и встраивание метки без использования праймеров, например, в процессе *in vitro* транскрипции.

Для стимуляции выработки цитокинов клетки А549 инфицировали штаммом вируса гриппа А/Kurgan/5/05 (H5N1). В процессе исследования оценили следующие способы подготовки флуоресцентно меченой пробы для анализа на микрочипе (рис. 3.7):

- 1) обратная транскрипция с последующей *in vitro* транскрипцией (ОТ-IVТ);

2) тотальный синтез ДНК с использованием набора «MINT», принцип работы которого основан на свойстве используемой ревертазы нематрично присоединять дезоксицитидин на 3'-конец растущей цепи;

3) ОТ-ПЦР со специфическими праймерами.

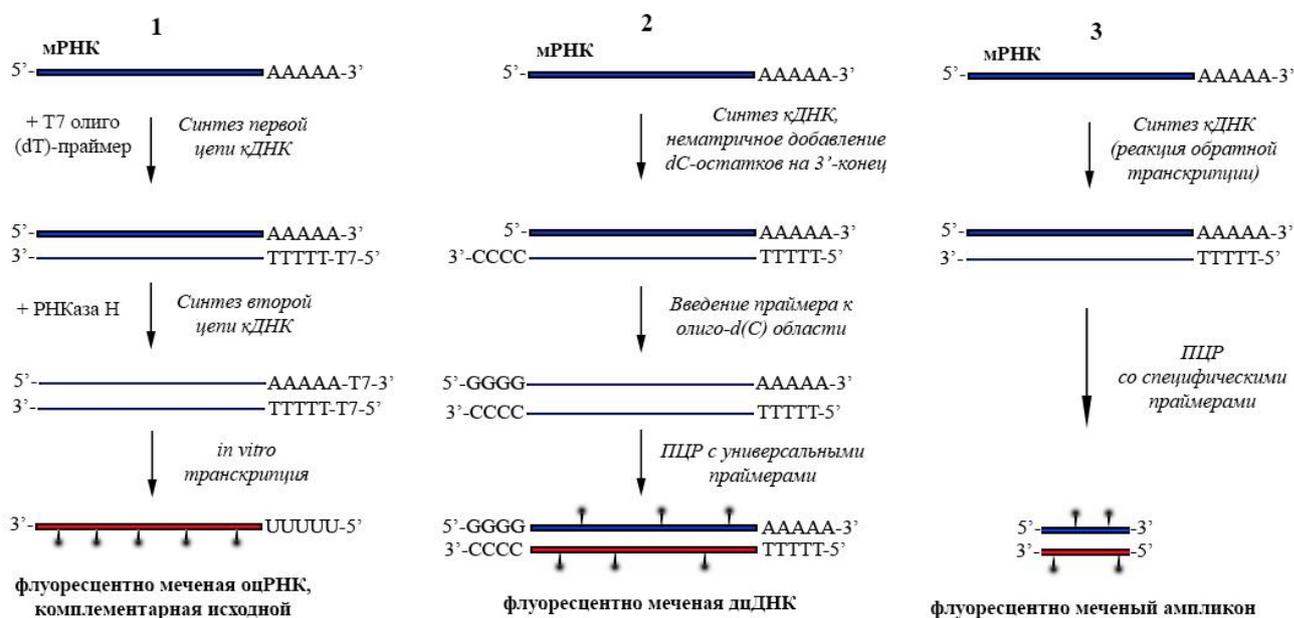


Рисунок 3.7 Схемы подготовки флуоресцентно меченых проб для проведения анализа на олигонуклеотидном микрочипе. 1) обратная транскрипция с последующей *in vitro* транскрипцией; 2) тотальный синтез ДНК с использованием набора «MINT»; 3) ОТ-ПЦР со специфическими праймерами.

Первым способом подготовки флуоресцентно меченой пробы была линейная амплификация мРНК методом ОТ-IVT. Вначале для отработки основных этапов проведения реакции (см. п. 2.4.7) использовали контрольную мРНК, входящую в состав набора AMV RT (“Promega”, США). Эффективность реакции амплификации и встраивания биотинилированного dNTP оценивали методом нозерн-блот гибридизации. Синтезированная в процессе ОТ-IVT проба кРНК, как и ожидали, специфично связывалась только с образцами контрольной мРНК. Далее из контрольных клеток A549 и клеток, инфицированных вирусом A/Kurgan/5/05, выделили мРНК и в процессе ОТ-IVT подготовили кРНК пробы для гибридизации на микрочипе. Несмотря на ряд предпринятых попыток мы не смогли получить воспроизводимых результатов при гибридизации микрочипа с пробами, подготовленными методом ОТ-IVT.

Вторым рассмотренным способом получения флуоресцентно меченой

пробы для гибридизации был синтез двухцепочечной кДНК с использованием набора «MINT». Предварительно, в соответствии с рекомендациями производителя, для образца тотальной РНК, выделенной из инфицированных вирусом A/Kurgan/5/05 клеток A549, оптимизировали количество циклов ПЦР. Для этого провели синтез кДНК на матрицах тотальной РНК (1 мкг) с использованием набора «MINT» при 18, 25, 40, 45 и 50 циклах ПЦР. Гибридизация биочипа с флуоресцентными пробами, полученными в процессе амплификации в течение 18–20 циклов ПЦР, дала отрицательные результаты. При повышении числа циклов ПЦР до 35 в пробе выявили мРНК АСТВ, GAPDH и IL-18 (рис. 3.8 В). При дальнейшем увеличении циклов амплификации до 40, 45 и 50 другие мРНК цитокинов в пробе не выявили. При этом, начиная с 25 циклов в продуктах ПЦР (рис. 3.8 А) наблюдали появление высокомолекулярных и уменьшение низкомолекулярных транскриптов, что, как правило, свидетельствует об избыточной амплификации.

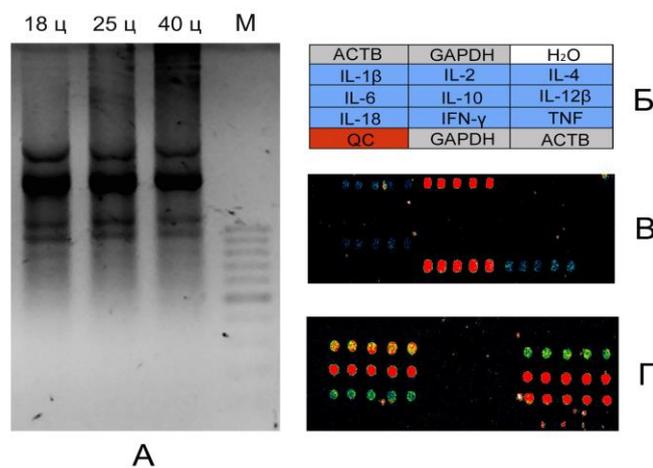


Рисунок 3.8 Подготовка флуоресцентно меченых проб для гибридизации. А – Результаты гель-электрофореза амплифицированной кДНК deltaNS, полученной с помощью набора MINT. Количество циклов ПЦР указано над дорожками. М – маркер GeneRuler 100 bp DNA Ladder (“Fermentas”, Литва). Представленная кДНК, обогащённая полноразмерными последовательностями, выглядит на геле как шмер длиной от 0,5 до 3 т.п.н. Б – схема эррея разработанного микрочипа. В – результаты гибридизации на разработанном микрочипе пробы, подготовленной с использованием набора MINT. Г – результаты гибридизации на микрочипе пробы, подготовленной методом ОТ-ПЦР (без эндогенных контролей).

Основной проблемой, делающий этот метод подготовки флуоресцентной пробы непригодным для использования при анализе на разработанном микрочипе, стала, по-видимому, нелинейная амплификация. Нелинейность обусловлена тем,

что преимущественно происходит амплификация коротких и высококопийных транскриптов, вследствие чего не соблюдается исходное соотношение матриц. К сожалению, критическую для этого метода подготовки пробы оптимизацию по числу раундов амплификации, невозможно было выполнить корректно. При небольшом количестве циклов не хватало чувствительности метода детекции на биочипе, а при увеличении циклов ПЦР в пробе невозможно было детектировать флуоресцентно меченые кДНК, соответствующие минорным низкокопийным транскриптам.

Третьим способом подготовки пробы являлась амплификация в процессе ОТ-ПЦР. Гибридизацию микрочипа проводили с флуоресцентно мечеными ампликонами, полученными методом 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 (п. 2.4.6).

Качественный анализ полученных в результате гибридизации изображений показал наличие достоверно значимого уровня флуоресценции точек, соответствующих IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-12 β , IL-18 и TNF- α (рис. 3.8 Г). Несмотря на то, что очистку от несвязавшихся флуоресцентно меченых нуклеотидов не проводили, при гибридизации не наблюдали неспецифического связывания, и фоновый сигнал флуоресценции оставался низким.

Полученные результаты дают основание полагать, что метод ОТ-ПЦР для подготовки флуоресцентной пробы подходит для качественного анализа уровня экспрессии цитокинов. Недостатком такого способа получения пробы является необходимость проведения индивидуальной ПЦР для каждого цитокина. Процесс пробоподготовки можно оптимизировать путём использования мультиплексной ОТ-ПЦР. На рис. 3.10 представлены изображения микрочипа после гибридизации с пробами, флуоресцентно мечеными в процессе мультиплексной ПЦР (см. п. 2.4.6). Представленные результаты гибридизации совпадают с данными, полученными в случае моноплексного варианта ОТ-ПЦР.

Суммируя полученные результаты, можно сделать вывод о том, что из трех рассмотренных способов подготовки флуоресцентно меченых проб для гибридизации на биочипе для определения уровня мРНК цитокинов может быть

использована только моноплексная или мультиплексная ОТ-ПЦР. Основным недостатком данного метода является невозможность проведения точной количественной оценки уровня анализируемых транскриптов.

3.2.6 Анализ роли белка NS1 вируса гриппа A/Kurgan/5/05 (H5N1) в индукции цитокинового ответа в клетках A549 методом олигонуклеотидного микрочипа и ОТ-ПЦР

На заключительном этапе данной части исследования применили разработанный микрочип для анализа роли белка NS1 вируса гриппа A/Kurgan/5/05 (H5N1) в индукции цитокинового ответа в клетках A549. Белок NS1 вирусов гриппа является мощным антагонистом иммунного ответа хозяина, и отсутствие его экспрессии приводит к потере вирусом способности ингибировать противовирусный ответ (*Ferko et al., 2004*).

Так как разработанный микрочип позволяет только качественно оценивать экспрессию мРНК цитокинов, провели сопоставление его чувствительности и специфичности с методом ОТ-ПЦР. Для стимуляции выработки цитокинов клетки A549 инфицировали реассортантными штаммами вируса гриппа A/Kurgan/5/05 (H5N1) (см. п. 2.1.2). 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. 3.9 А) и исследовали продукцию мРНК девяти различных цитокинов на микрочипе (рис. 3.10) и методом ОТ-ПЦР (рис. 3.9 Б). Результаты, полученные с использованием этих двух методов, совпали.

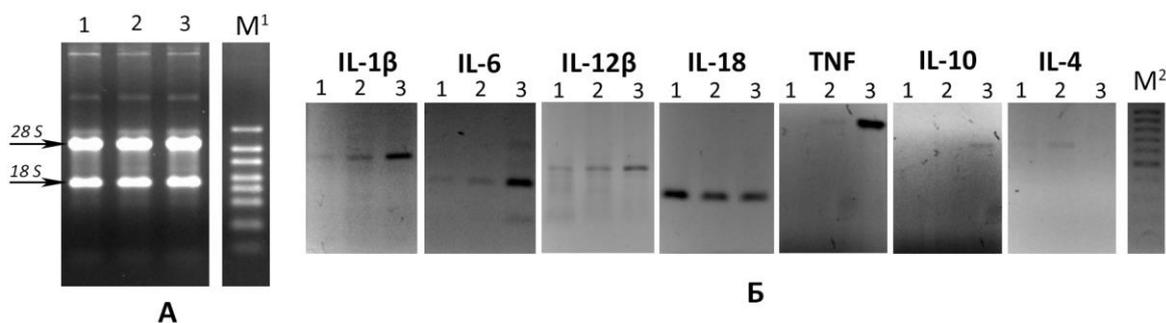


Рисунок 3.9 Экспрессия цитокинов клетками A549, инфицированными рекомбинантными вирусами гриппа A/Kurgan/5/05 (H5N1). **А** – Препараты тотальной РНК, выделенные из экспериментальных образцов. **Б** – Детекция результатов ОТ-ПЦР: 1 – К, 2 – wtNS, 3 – deltaNS, M^1 – маркер RiboRuler High Range RNA Ladder, 200–6000 bases (“Fermentas”, Литва), M^2 – маркер GeneRuler 100 bp DNA Ladder (“Fermentas”, Литва).

Выявили мРНК провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, IL-12 β , IL-18, TNF- α , IL-10 и IL-4 (табл. 3.3). Причём если стабильно высокий уровень экспрессии IL-18 регистрировали во всех клетках, включая неинфицированные контрольные, то продукция мРНК IL-1 β , IL-6, IL-12 β , TNF- α и особенно IL-4 и IL-10 являлась вирус-индуцированной. При стимуляции клеток deltaNS вирусом экспрессия цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF- α возрастала, что согласуется с литературными данными (*Stasakova et al., 2005*). Спектры мРНК цитокинов в клетках, инфицированных вирусами гриппа, существенно различались по присутствию мРНК IL-4 и IL-10. мРНК IL-4 обнаружили только в клетках, зараженных wtNS вирусом, а мРНК IL-10 – только в случае инфицирования deltaNS вирусом.

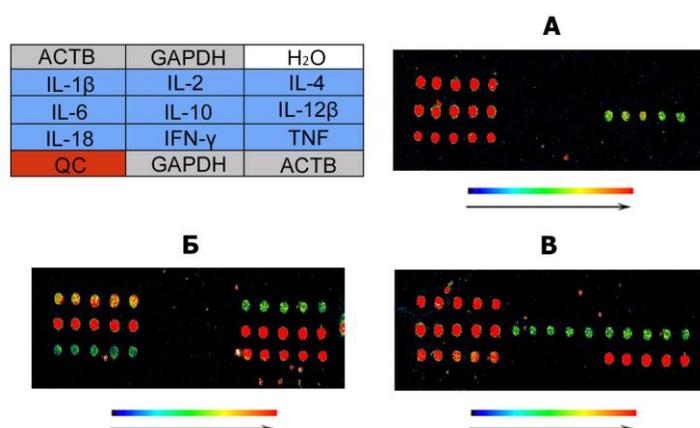


Рисунок 3.10 Результаты гибридизации микрочипа с флуоресцентно мечеными продуктами, полученными методом ОТ-ПЦР. **А** – контрольные клетки, **Б** – клетки, простимулированные wtNS; **В** – клетки, простимулированные deltaNS. Cy3-QC* не использовали.

Можно сделать вывод, что белок NS1 вируса гриппа A/Kurgan/5/05 напрямую или опосредованно отвечает за экспрессию противовоспалительных цитокинов IL-4 и IL-10 в клетках A549.

Таблица 3.3
Результаты исследования профиля цитокинов в клетках A549, инфицированных вирусами гриппа с полноценным и делетированным NS1 геном

	IL-1 β	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	IL-12 β	IL-18	IFN- γ	TNF- α
незаражённые клетки A549	+	—	—	+	—	+	+	—	—
A549 + A/Kurgan/5/05 wtNS (H5N1)	++	—	+	+	—	+	+	—	+
A549 + A/Kurgan/5/05 deltaNS1 (H5N1)	+++	—	—	++	+	+	+	—	+++

Следует отметить, что продукция противовоспалительных цитокинов, особенно IL-10, является одним из механизмов регуляции воспаления. При этом, хотя IL-10 и является противовоспалительным цитокином, он может играть роль в фиброзе, при котором его экспрессия индуцирует образование коллагена и пополнение фиброцитов в легких (*Tisoncik et al., 2012*). Системная продукция IL-10, следующая за началом «цитокинового шторма», является или маркером противовоспалительного ответа, или фактором ингибирования активности НК-клеток.

3.3 Разработка метода определения уровня цитокинов с использованием мультиплексной ПЦР в режиме реального времени

3.3.1 Подбор праймеров и TaqMan зондов и оптимизация условий проведения реакции мультиплексной ПЦР в режиме реального времени для выявления IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 β , IL-18, IFN- γ , TNF- α человека

С целью создания метода количественного определения мРНК цитокинов предложили альтернативный микрочипу подход, основанный на проведении мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (мПЦР). Особенностью этого метода является одновременная специфическая амплификация нескольких кДНК-продуктов. Для визуализации скорости накопления продуктов в разрабатываемой тест-системе использовали TaqMan

зонды, содержащие различные флуоресцентные метки на 5'-конце.

Оригинальные последовательности праймеров и TaqMan зондов (табл. 3.4) подобрали к белок-кодирующим областям генов цитокинов в соответствии с общими рекомендациями, представленными в п. 2.5.1. Праймеры разбили на группы для использования их в мультиплексных реакциях.

Таблица 3.4
Последовательности TaqMan зондов и праймеров для определения экспрессии цитокинов методом мПЦР

	цитокин	номер в базе данных NCBI	последовательности праймеров и TaqMan зонда, 5'-3'	T _m , °C	координаты праймеров	Длина ПЦР продукта
SET1	IL-1β	NM_000576	AGCTGATGGCCCTAAACAGA	58,71	162–181	93
			TGGTGGTCGGAGATTCTAG	58,90	254–235	
			HEX-GCCCTCTGGATGGCGGCATC-BHQ1	59,90	212–231	
	IL-12β	NM_002187	CCAGTACACCTGTCACAAAGG	58,51	300–320	143
			TGGCCTCGCATCTTAGAAAG	57,68	442–423	
			ROX-AGGTTCTAAGCCATTCGCTCCTGC-BHQ2	65,04	326–349	
	IFN-γ	NM_000619	GCTTTTCAGCTCTGCATCGT	59,20	151–170	115
			CCGCTACATCTGAATGACCTG	58,52	265–245	
			CY5-TGGCTGTTACTGCCAGGACCCA-BHQ2	59,78	183–204	
SET2	IL-10	NM_000572	TCCCTGTGAAAACAAGAGCAAG	59,05	449–470	87
			CTCATGGCTTTGTAGATGCCT	58,07	535–515	
			HEX-CCGTGGAGCAGGTGAAGAATGCC-BHQ1	60,06	472–494	
	IL-4	NM_000589	AGCTGATCCGATTCTGAAAC	58,09	370–390	94
			AACGTACTCTGGTTGGCTTC	57,83	463–444	
			ROX-CTGGCGGGCTTGAATTCCTGTC-BHQ2	64,02	414–435	
	TNF-α	NM_000594	ACTTTGGAGTGATCGGCC	56,96	330–347	139
			GCTTGAGGGTTTGTACAAC	57,29	468–449	
			CY5-CGAACCCCGAGTGACAAGCCT-BHQ2	64,66	419–439	
SET3	IL-6	NM_000600	CCACTCACCTCTTCAGAACG	57,93	200–219	150
			CATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG	57,49	349–328	
			HEX-AAATTCGGTACATCCTCGACGGCATC-BHQ1	65,20	231–256	
	IL-18	NM_001562	AAACTATTTGTCGCAGGAATAAAGAT	57,72	197–222	145
			GCTTGCCAAAGTAATCTGATTCC	58,32	341–319	
			ROX-TGCAATTGTCTTCTACTGGTTCAGCAGC-BHQ2	65,80	251–224	
	IL-2	NM_000586	AAAGAAAACACAGCTACAACCTGG	57,75	136–158	149
			GAAGATGTTTCAGTTCTGTGGC	57,85	284–263	
			CY5-TGTGAGCATCCTGGTGAGTTGGG-BHQ2	64,91	238–215	
<i>эндогенные контроли</i>						
GAPDH	NM_002046.4	CAGTCAGCCGCATCTCTTTTGCCTCG	68,59	121–147	130	
		CAGAGTTAAAAGCAGCCCTGGTGACCAGG	68,84	250–222		
		FAM-BGGGAAGGTGAAGGTTCGGAGTCAACGGATTGGTC-HQ1	74,15	176–211		
ACTB	NM_001101.3	TCTACAATGAGCTGCGTGTGGCTCCC	68,64	353–378	137	
		AGCAACGTACATGGCTGGGGTGTGAA	68,73	489–463		
		FAM-CAAGGCCAACCGCGAGAAGATGACCCAGATCAT-BHQ1	73,59	419–452		

Разработанная система состояла из 3 наборов реакций, каждый из которых позволял количественно выявлять три мРНК цитокинов-мишеней и одну мРНК

используемого для нормализации эндогенного контроля (гены GAPDH и АСТВ).

На первом этапе работы экспериментально оценили качество подобранных пар праймеров и зондов, а также возможность образования ими гетеро- и гомодимеров. Материалом для этого исследования служили образцы тотальной РНК, выделенной из клеток линий A549, Jurkat, THP-1 и Namalva, инфицированных вирусом гриппа A/Brisbane/10/07 (H3N2). В качестве проб, положительных на IL-2, использовали тотальную РНК, выделенную из клеток A549, инфицированных рекомбинантным вирусом deltaNS1-116-IL2 на основе A/PR/8/34 (H1N1), содержащим ген IL-2 человека. Анализ проводили согласно экспериментально оптимизированному в процессе работы протоколу, описанному в п. 2.4.10.

Качество проведения мПЦР оценивали с использованием отрицательного контроля (NTC) и контроля ревертирования. Контроли ревертирования и NTC, используемые для детекции цитокин-специфических мишеней, ни в одном случае не показывали положительного сигнала флуоресценции в ПЦР с детекцией режиме реального времени. Для генов GAPDH и АСТВ иногда наблюдали образование специфических продуктов в контрольных пробах, для которых не проводили ОТ, что, возможно, обусловлено частичной контаминацией проб РНК геномной ДНК. Однако при сопоставлении результатов, полученных для проб без ревертирования, с результатами, соответствующими этим же пробам при проведении ОТ, разница составила более 10-ти циклов ПЦР ($\Delta Cq > 10$), что соответствует более чем 1000-кратному различию в концентрациях исходных матриц. Такая разница практически не даёт погрешности при расчёте уровней экспрессии и допустима в данном анализе.

Все полученные ампликоны дополнительно анализировали методом электрофоретического разделения в 1 % агарозном геле. Для большинства проб наблюдали только специфические по размеру продукты, однако некоторые пробы содержали минорные по количеству ампликоны, размер которых соответствовал продуктам, получаемым с геномных матриц.

Ампликоны, длины которых соответствовали расчётным продуктам,

вырезали из геля, очищали на колонках и далее использовали в качестве кДНК матриц для оптимизации условий проведения мПЦР.

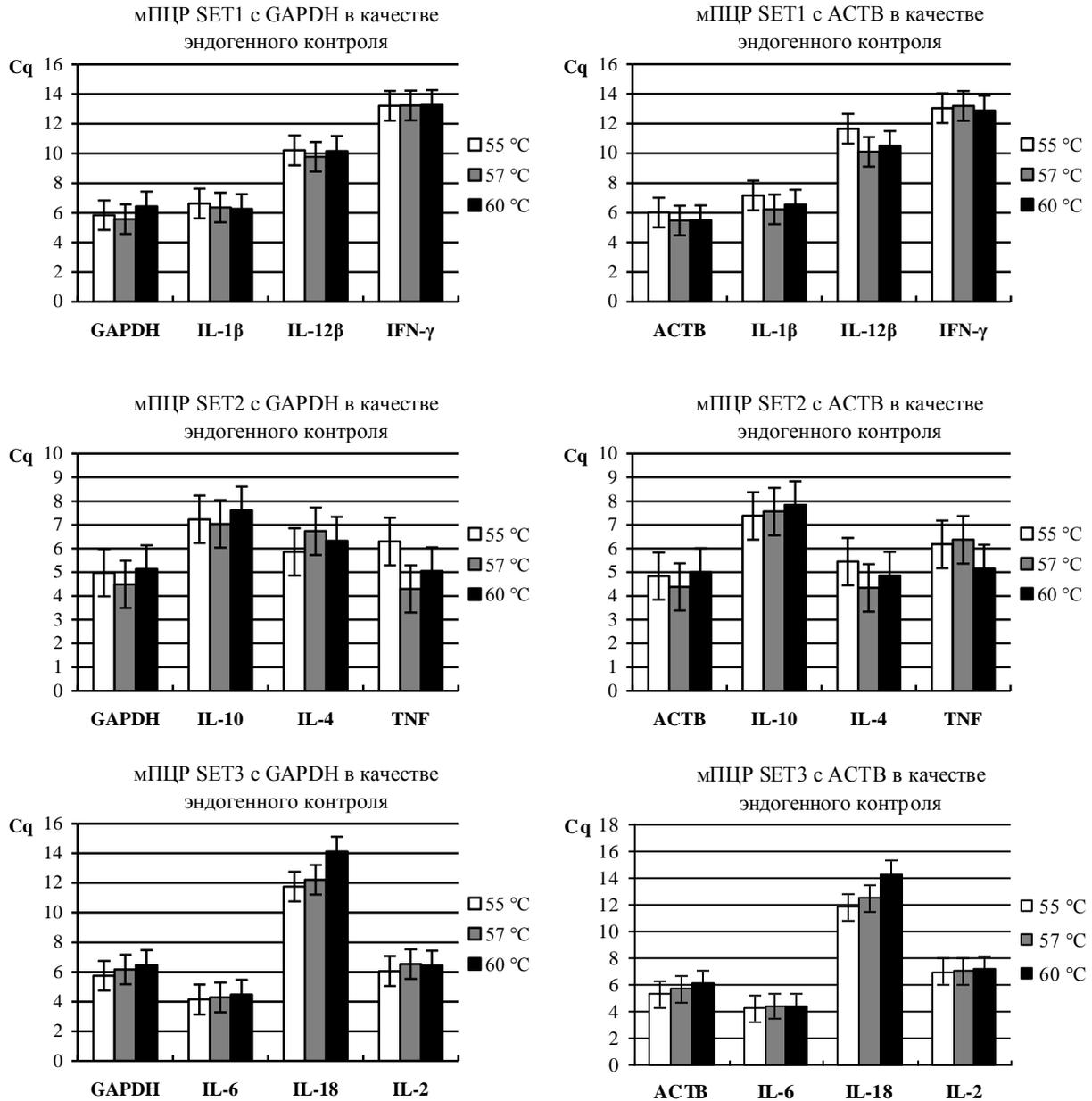


Рисунок 3.11 Диаграммы зависимости пороговых циклов C_q для исследуемых генов-мишеней. Эксперимент проводили без повторов. Планки погрешностей представлены исходя из того, что достоверные расхождения в репликах ПЦР не должны превышать ± 1 цикл.

Для определения оптимального термального профиля для всех четырёх мишеней в каждом из трёх наборов мПЦР (SET1, SET2 и SET3, соответственно) рассчитали пороговые значения C_q при трёх температурах отжига: 55 °C, 57 °C и 60 °C. В качестве кДНК матриц использовали смеси четырёх очищенных ампликонов в концентрациях по 0,1 нг/мкл, содержащие в том числе ампликоны

эндогенного контроля GAPDH или АСТВ. Данные, приведённые на рис. 3.11, показывают, что значения C_q не отличались в пределах погрешности при исследуемых температурах отжига. Исключение составлял IL-18, для которого увеличение температуры с 55 °С до 60 °С приводило к повышению величины C_q с 11,75 до 14,12, что, вероятно, обусловлено ингибированием ПЦР. Эти результаты согласуются с кривыми роста, представленными на рис. 3.12. Поскольку практически для всех мишеней наибольший сигнал флуоресценции получали при температуре отжига 57 °С, близкой к расчётной, то в дальнейшем это значение использовали во всех мПЦР.

Выбор эндогенного контроля не влиял на пороговые значения C_q . Поэтому в разрабатываемой мПЦР как GAPDH, так и АСТВ в равной степени можно использовать для определения относительного уровня экспрессии генов цитокинов.

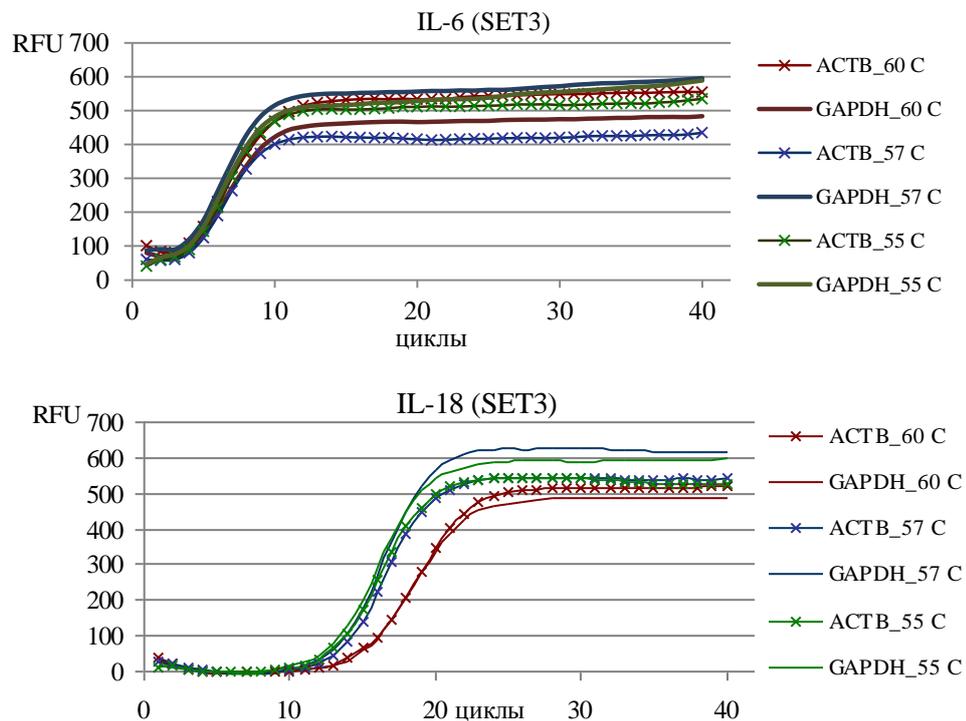


Рисунок 3.12 Кривые накопления продуктов в зависимости от температуры отжига и эндогенного контроля.

Таким образом, мы оптимизировали температурный профиль мПЦР и выбрали для нормализации ген GAPDH, широко используемый для таких задач (*Thellin et al., 1999*). В целях унификации разрабатываемой тест-системы для

каждой реакции использовали одинаковый состав ПЦР-смеси, идентичный по содержанию нуклеозидтрифосфатов, концентрации ионов магния и количеству единиц полимеразы, а также одинаковую программу амплификации.

Термодинамическая стабильность дуплекса праймер/мишень зависит от структуры праймера и варьирует при изменении его концентрации (*Nolan et al., 2006*). Поэтому на следующем этапе оптимизировали состав мПЦР-смеси по концентрациям праймеров и зондов. Для оптимизации соотношения праймеров для каждой мишени рассчитывали эффективность реакции по углу наклона кривых, полученных серией последовательных десятикратных разбавлений смесей ампликонов GAPDH. мПЦР проводили с различными комбинациями концентраций пар праймеров и зондов, варьирующих в пределах от 0,1 до 0,9 мкМ. Для корректного проведения относительного количественного анализа экспрессии генов цитокинов значения эффективностей амплификации соответствующих мРНК и эндогенного контроля должны быть идентичными или максимально приближенными друг к другу. В соответствии с этим подобрали оптимальные соотношения пар праймеров и зондов в мПЦР, которые представлены в табл. 3.5.

Таблица 3.5
Оптимальные концентрации праймеров и зондов в мПЦР, а также рассчитанные значения эффективностей реакции

	мишень	концентрация F/R праймеров в мПЦР, мкМ	концентрация олигонуклеотидного зонда в мПЦР, мкМ	угол наклона кривой (коэффициент α)	E, %
SET1	IL-1 β	0,4	0,27	-3,06	112
	IL-12 β	0,15	0,10	-3,15	108
	IFN- γ	0,85	0,57	-3,3	101
	GAPDH	0,7	0,47	-3,07	112
SET2	IL-10	0,15	0,10	-3,22	104
	IL-4	0,15	0,10	-3,28	102
	TNF- α	0,4	0,27	-3,59	90
	GAPDH	0,65	0,43	-3,66	88
SET3	IL-6	0,15	0,10	-3,21	105
	IL-18	0,6	0,40	-3,39	97
	IL-2	0,15	0,10	-3,29	101
	GAPDH	0,7	0,47	-3,33	100

Экспериментально подобранные условия проведения реакций приведены в разделе «Материалы и методы».

Далее при подобранных оптимальных условиях рассчитали эффективности ПЦР в мультиплексном (четыре пары праймеров) и моноплексном (одна пара праймеров) форматах. В качестве исходных кДНК также использовали смесь четырёх ампликонов. Полученные в результате эксперимента данные были сопоставимы друг с другом на протяжении пяти десятикратных разведений пробы, кривые накопления имели почти идентичные углы наклона, что свидетельствует об одинаковых эффективностях ПЦР (например, рис. 3.13).

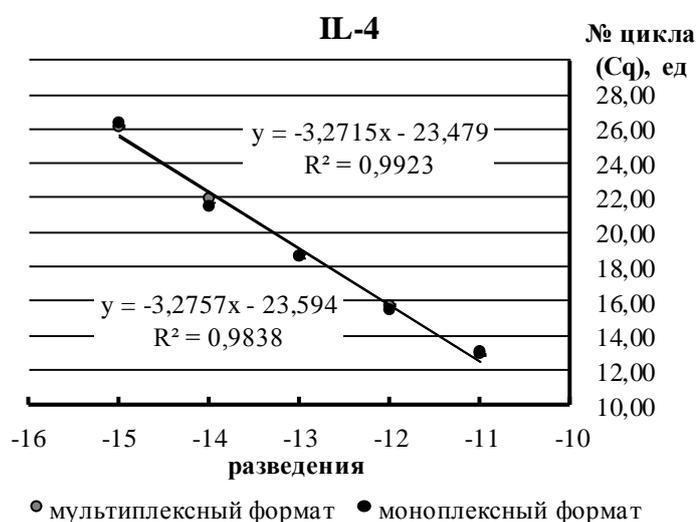


Рисунок 3.13 Кривые накопления, полученные для П-4 при постановке ПЦР в моноплексном и мультиплексном форматах. Каждая точка представляет собой среднее по трём репликам значение Cq для соответствующего разведения \pm О.С.

3.3.2 Проверка валидности системы мПЦР для оценки экспрессии цитокинов

Оценку валидности разработанной тест-системы мПЦР для оценки экспрессии цитокинов проводили по следующим критериям: эффективности амплификации специфических мишеней в мПЦР, чувствительность, динамический диапазон и воспроизводимость получаемых результатов.

На рис. 3.14 продемонстрировано, что эффективности амплификации находятся в пределах 90–100 % и отличаются друг от друга в каждой из мПЦР не более чем на 10 %. Данное значение является допустимой погрешностью при расчёте уровней экспрессии с использованием $\Delta\Delta C_t$ метода (Nolan et. al., 2006). Динамический диапазон разработанных наборов мПЦР составил 5–6 порядков.

Порог чувствительности (предел чувствительности) определяли как минимальную концентрацию молекул мишени, которую с заданной доверительной вероятностью можно обнаружить (но не измерить) в образце. Положительные результаты мПЦР получали при разбавлении исходных проб в 10^6 – 10^7 раз. Нижний предел чувствительности разрабатываемого метода в среднем составил менее чем 20 фМ для очищенных ПЦР фрагментов.

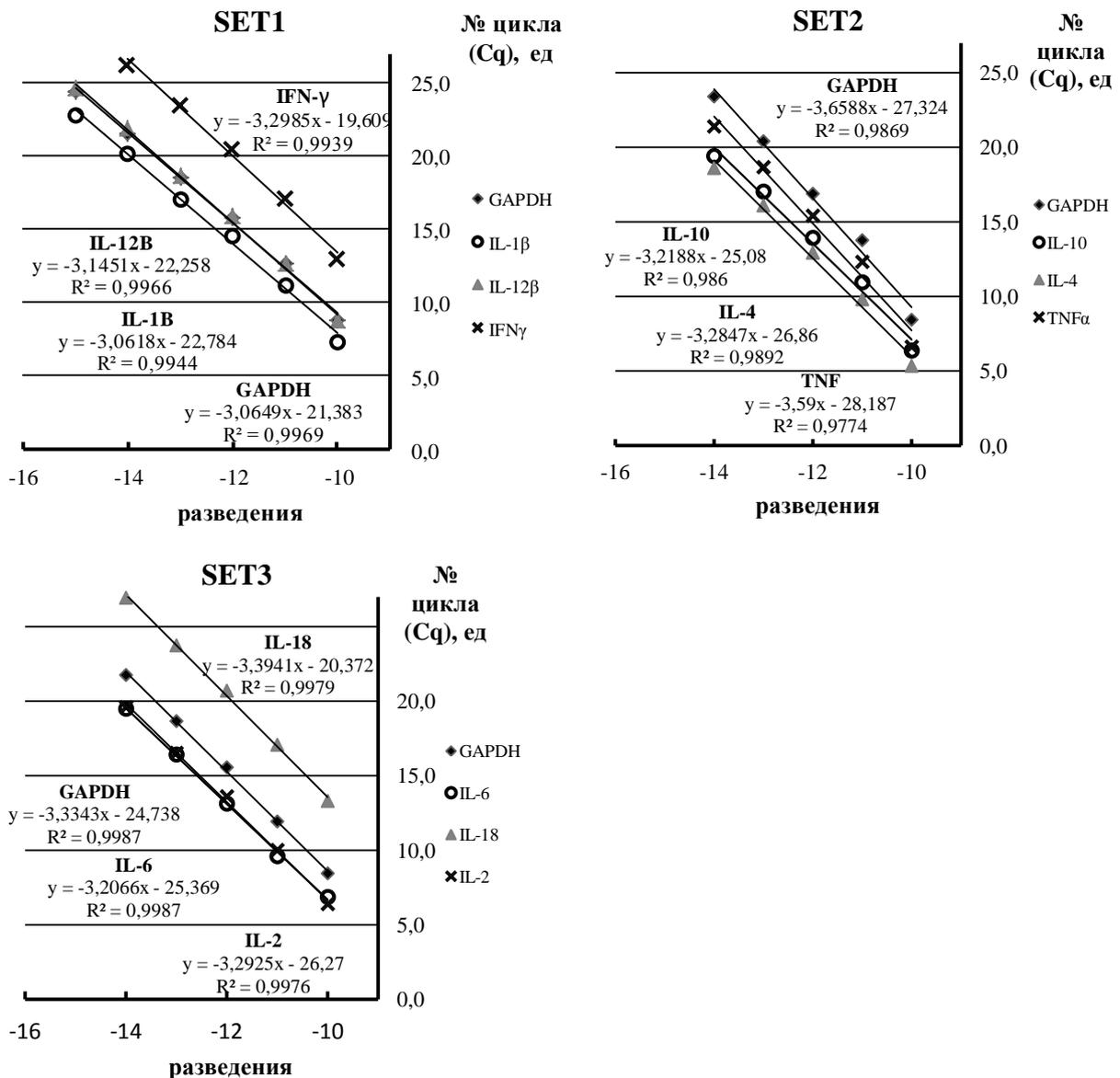


Рисунок 3.14 Кривые накопления целевых продуктов в разрабатываемых мПЦР

В работе определяли воспроизводимость только внутри системы. Сопоставления результатов, полученных с использованием разработанной мПЦР

и какой-либо иной системы, работающей по принципу мПЦР, не проводили. Анализ выполняли на пробах кДНК, полученных методом ОТ на матрицах тотальной РНК, выделенной из инфицированных ВГА клеток А549. Поскольку в этих клетках не выявили экспрессию мРНК IFN- γ и IL-2, воспроизводимость для этих цитокинов не рассчитывали.

Для оценки воспроизводимости определили коэффициенты вариации V (см. п. 2.5.4) значений C_q , измеренных в двух реакциях мПЦР, одновременно поставленных с одного образца кДНК.

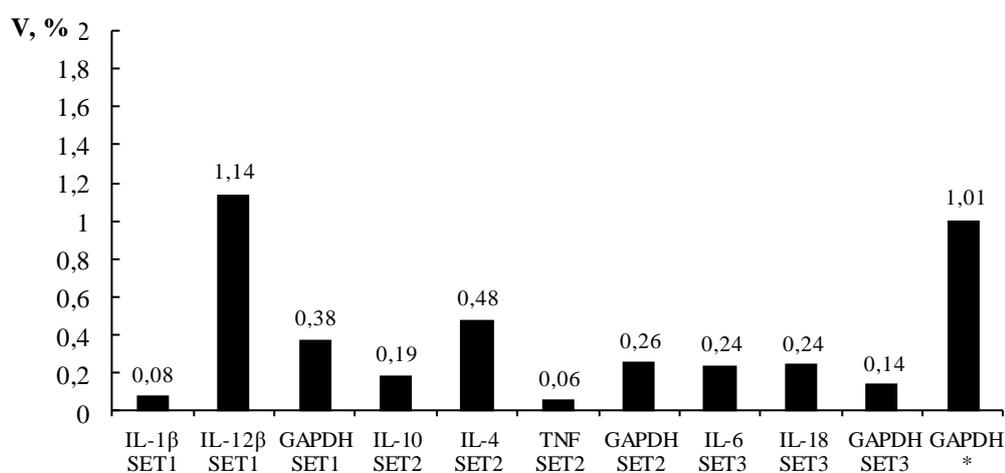


Рисунок 3.15 Рассчитанные коэффициенты вариаций значений C_q .

Коэффициенты вариаций значений C_q в репликах составили не более 1,5 % (рис. 3.15). Для эндогенного контроля GAPDH также рассчитали коэффициент вариаций значений C_q между реакциями (в SET1, SET2 и SET3), который составил 1,01 %. Воспроизводимость результатов при количественной детекции мРНК цитокинов составила не менее 98 %. Это означает, что мПЦР позволяет получать стабильные хорошо воспроизводимые результаты.

Таким образом, разработанная тест-система для количественной оценки мРНК цитокинов удовлетворяет всем необходимым требованиям для проведения анализа уровней экспрессии с использованием $\Delta\Delta C_t$ метода (п. 2.5.4). На следующем этапе мПЦР система была использована для анализа вирус-индуцированной экспрессии мРНК цитокинов в клетках А549.

3.4 Сравнение паттернов экспрессии мРНК цитокинов в клетках A549, инфицированных вирусами гриппа A/H1N1_{pdm09}, A/H3N2 и A/H5N1, методом мультиплексной ПЦР

Отдельный интерес представляет изучение спектров мРНК цитокинов при инфекциях, вызванных ВГА разных подтипов. В качестве модельных вирусов для определения профиля экспрессии 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). Для оценки динамики уровня мРНК цитокинов использовали клетки 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 клетках в среднем занимает 6-8 часов.

Методом ПЦР с использованием CDC праймеров было показано, что все три вируса реплицировались в клетках A549. При этом репликация геномной РНК вируса A/chicken/Kurgan/5/05 была в 10 раз снижена по сравнению с остальными штаммами (рис. 3.16). Этот факт может быть связан с различиями в рецепторной специфичности поверхностных гликопротеинов, а также видовых отличиях клеточных факторов, используемых вирусом в процессе репликации.

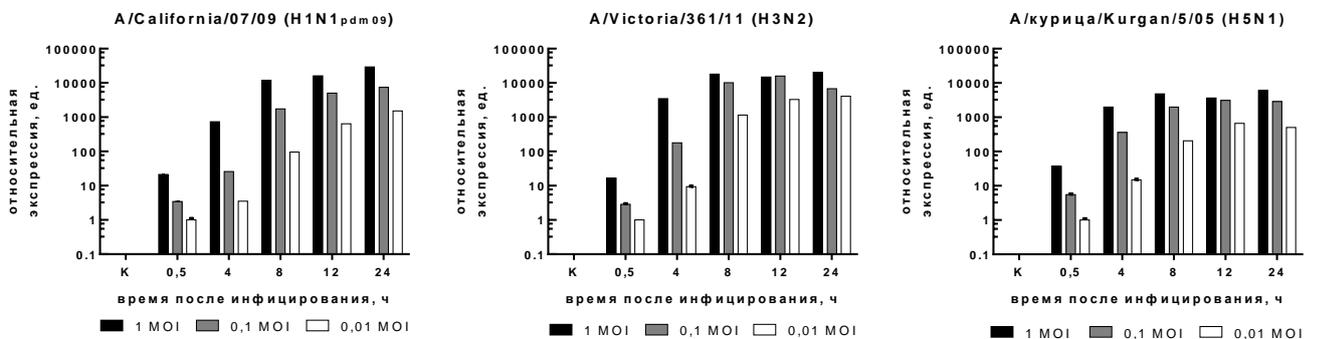


Рисунок 3.16 Репликация геномной РНК вирусов A/chicken/Kurgan/5/05 (H5N1), A/California/07/09 (H1N1_{pdm09}) и A/Victoria/361/11 (H3N2) в эпителиальных клетках A549

Динамика и спектр цитокинов при заражении разными подтипами ВГА отличались. Вирусы всех трёх подтипов индуцировали в клетках A549 экспрессию мРНК провоспалительных цитокинов острой фазы воспаления IL-1 β , TNF- α и IL-18, а также IL-6 (рис. 3.17, табл. 3.6). мРНК IL-1 β , IL-6 и IL-18, но не TNF- α обнаруживали также в контрольных клетках A549.

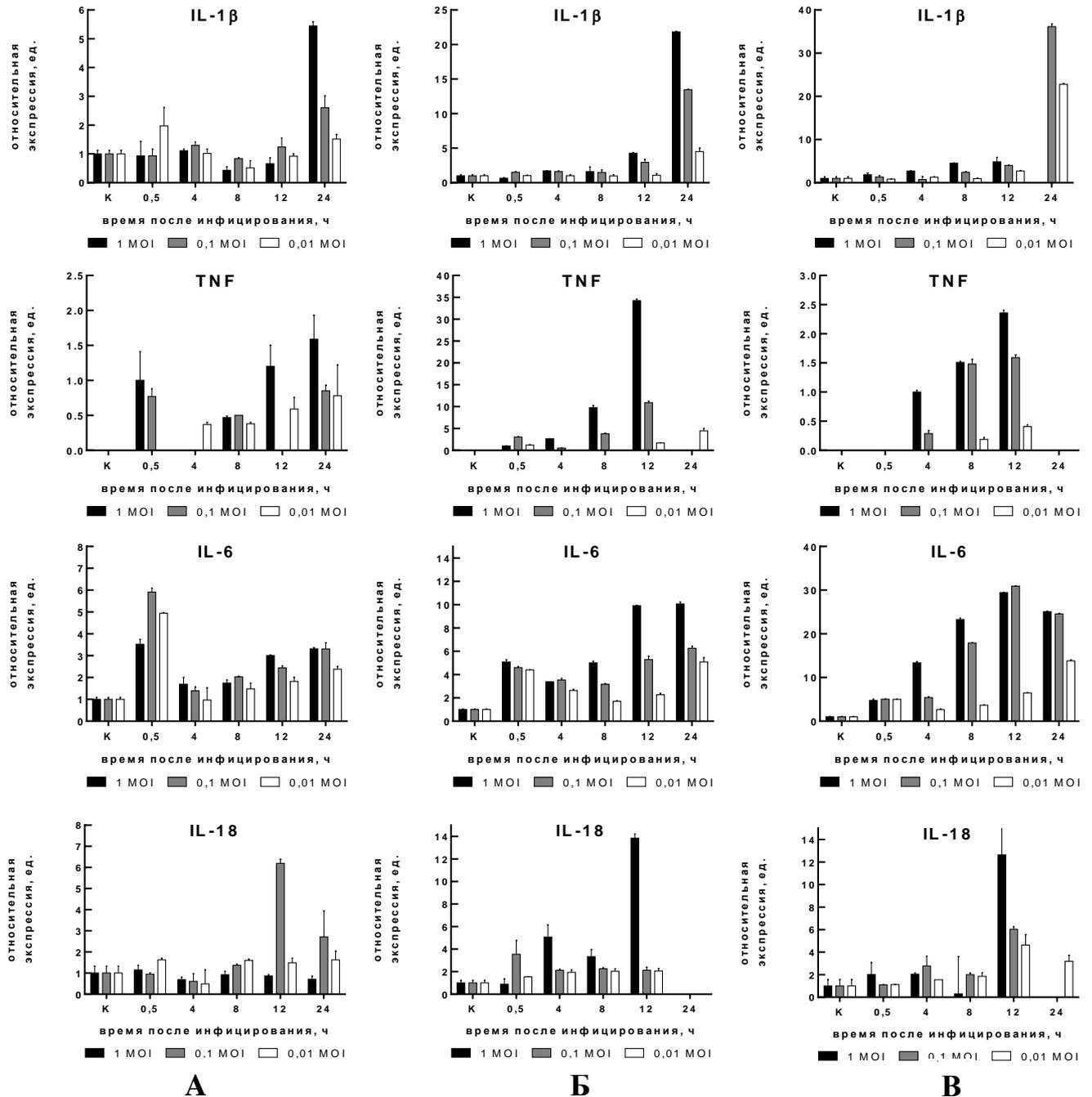


Рисунок 3.17 Динамика уровней цитокинов мРНК IL-1 β , TNF- α , IL-6 и IL-18 в клетках A549 при заражении вирусами гриппа A/California/07/09 (H1N1_{pdm09}) (А), A/Victoria/361/11 (H3N2) (Б) и A/chicken/Kurgan/5/05 (H5N1) (В)

Уровень мРНК IL-1 β в клетках, инфицированных вирусом A/California/07/09, оставался неизменным по сравнению с контрольными клетками вплоть до 24 часов после заражения, когда наблюдали его значимое увеличение при высоком и среднем значениях MOI. При заражении вирусами A/Victoria/361/11 и A/chicken/Kurgan/5/05 увеличение экспрессии IL-1 β наблюдали уже через 12 часов после инфицирования, причем по сравнению с вирусом H1N1_{pdm09} относительный уровень экспрессии IL-1 β был заметно выше, особенно для вируса A/chicken/Kurgan/5/05. Интересно, что через 24 часа после заражения клеток штаммом A/chicken/Kurgan/5/05 в дозе 1 MOI экспрессию IL-1 β уже не наблюдали.

Уровни экспрессии мРНК IL-18 при заражении всеми тремя вирусами значимо возрастали через 12 часов. Через 24 часа экспрессия IL-18 в клетках, инфицированных вирусами A/Victoria/361/11 и A/chicken/Kurgan/5/05 в высокой и средней дозах, была полностью подавлена.

Изменение уровня экспрессии мРНК TNF- α в клетках при заражении штаммами A/Victoria/361/11 и A/chicken/Kurgan/5/05 в целом коррелирует с данными по IL-18 (рис. 3.17). Экспрессия TNF- α возникает через 0,5 – 4 часа после инфицирования, возрастает в прямой зависимости от дозы заражения и практически полностью подавляется через 24 часа. Вирус гриппа A/California/07/09 также индуцировал экспрессию TNF- α в клетках уже через 30 минут после заражения, однако выявить временную зависимость в изменении уровня мРНК не удалось. Важно отметить, что при заражении клеток вирусами A/California/07/09 и A/chicken/Kurgan/5/05 разница в уровнях экспрессии мРНК TNF- α на разных сроках была значительно ниже по сравнению с A/Victoria/361/11, в случае которого уровень экспрессии TNF- α увеличивался на порядок. Возможно, это связано с большей патогенностью ВГА H5N1 и H1N1_{pdm09} и, вероятно, с усиленной супрессией ими иммунного ответа посредством ингибирования синтеза мРНК TNF- α . В пользу этого предположения свидетельствует и то, что экспрессию 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) (рис. 3.18).

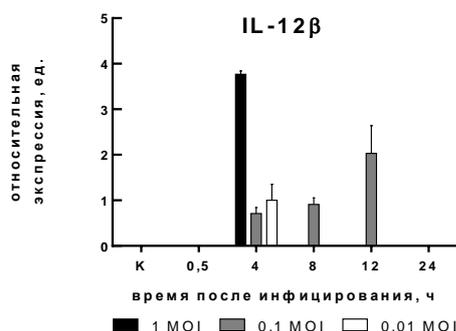


Рисунок 3.18 Индукция мРНК IL-12β в эпителиальных клетках A549 вирусом гриппа A/Victoria/361/11 (H3N2)

В клетках A549, инфицированных всеми тремя типами вирусов, через 30 минут после заражения резко возрастал уровень мРНК IL-6 (рис. 3.17), который может действовать как провоспалительный, так и как противовоспалительный цитокин. Далее наблюдали последовательное плавное возрастание уровня экспрессии мРНК IL-6 в клетках на сроках от 4 до 24 часов после инфицирования. Динамика возрастания экспрессии IL-6 при заражении клеток вирусом A/chicken/Kurgan/5/05 была значительно выше, чем для двух других вирусов, однако через 24 часа после инфицирования клеток этим штаммом в высокой и средней дозах уровень мРНК начинал снижаться.

Таблица 3.6
Экспрессия 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	экспрессия цитокинов интактными клетками 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-1β	+	++	++	+++
IL-2	-	-	-	-
IL-4	-	+	+	-
IL-6	+	++	++	+++
IL-10	-	-	-	-
IL-12β	-	-	+	-
IL-18	+	+	++	++
IFN-γ	-	-	-	-
TNF-α	-	+	++	+

Экспрессию провоспалительных цитокинов IL-2 и IFN γ в анализируемых контрольных и инфицированных ВГА клетках A549 не обнаружили, что было ожидаемо, поскольку продукция этих цитокинов характерна в основном для Т-лимфоцитов и NK-клеток (табл. 1.2).

В целом, было показано, что ВГА ожидаемо вызывают индукцию провоспалительных цитокинов в клетках A549. При этом для вируса H5N1 динамика уровней экспрессии мРНК IL-1 β и IL-6 была более значительной. Одним из механизмов регуляции воспаления является продукция противовоспалительных цитокинов. Так как баланс между про- и противовоспалительными цитокинами является критическим для поддержания иммунного гомеостаза в легких, вполне вероятно, что если один или несколько из этих регуляторных механизмов отсутствуют или отклоняются от нормальной регуляции, исход может приводить к цитокиновому шторму, следствием которого является острое повреждение легких. Именно такую картину и наблюдали при инфицировании людей вирусами гриппа A/H5N1.

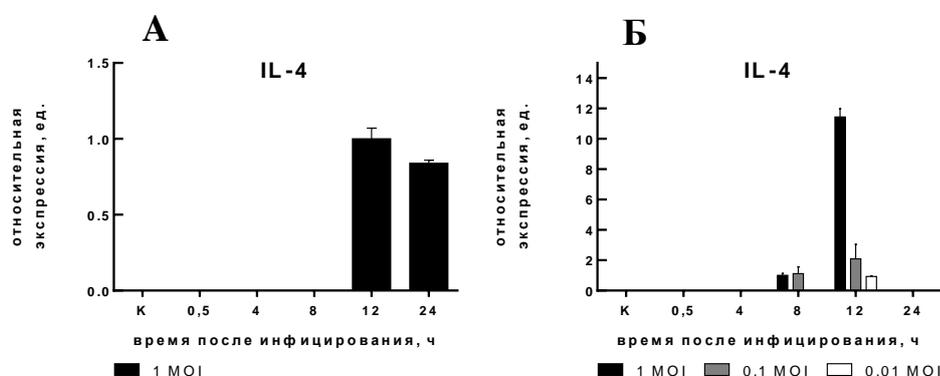


Рисунок 3.19 Динамика уровней мРНК IL-4 в клетках A549 при заражении вирусами гриппа A/California/07/09 (H1N1_{pdm09}) (А) и A/Victoria/361/11 (H3N2) (Б)

В представленном эксперименте нам удалось детектировать противовоспалительный цитокин IL-4. В клетках, инфицированных вирусом A/California/07/09, мРНК IL-4 обнаруживали через 12 и 24 часа после инфицирования и только при высокой заражающей дозе. Вирус A/Victoria/361/11 вызывал экспрессию мРНК IL-4 в клетках A549 только через 8 и 12 часов после заражения, причем через 12 часов после инфицирования высокой дозой вируса

уровень мРНК IL-4 был значительно выше, чем в случае заражения в средней и малой дозах (рис. 3.19). Вирус A/chicken/Kurgan/5/05 не индуцировал экспрессию мРНК IL-4 в клетках A549. Таким образом, противовоспалительный цитокин IL-4 экспрессировался в клетках A549, инфицированных только вирусами A/California/07/09 и A/Victoria/361/11 преимущественно в высоких дозах, но не штаммом A/chicken/Kurgan/5/05. мРНК IL-10 в клетках, инфицированных рассматриваемыми штаммами ВГА, не обнаружили.

3.5 Разработка белкового микрочипа для количественного выявления цитокинов

3.5.1 Выбор моноклональных антител и рекомбинантных цитокинов для использования в микрочипе

Наиболее распространённым методом количественного определения белков является ИФА. Стандартный ИФА в моноплексном и мультиплексном исполнениях имеет ряд недостатков, в основном связанных с продолжительностью анализа и большими затратами реагентов. Белковый микрочип, работающий по принципу «сэндвич»-метода твердофазного иммуноанализа, позволяет одновременно количественно выявлять несколько белков с минимальными затратами реагентов и сокращённым временем проведения анализа. Основной задачей данного этапа работы являлось создание аналитического белкового микрочипа для одновременного количественного определения цитокинов человека.

Ключевым фактором, определяющим чувствительность, воспроизводимость и достоверность системы детекции белков на основе микрочипов, является выбор пары первичных и детектирующих моноклональных антител (МКА). Важную роль также играют условия иммобилизации белков на чип и параметры инкубации.

Мы использовали коммерческие панели неконкурирующих МКА, обладающих разной эпитопной специфичностью, и соответствующие им рекомбинантные цитокины (табл. 3.7). К сожалению, мы не смогли подобрать

эффективно работающие в формате микрочипа пары МКА ко всем цитокинам, для выявления которых были разработаны олигонуклеотидный микрочип и мПЦР система. В итоге мы выбрали для создания белкового микрочипа следующие цитокины: IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IFN- γ и TNF- α .

Таблица 3.7
Используемые в работе рекомбинантные цитокины (IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IFN- γ и TNF- α) и соответствующие им МКА производства компании “BD Biosciences” (США)

№	цитокин	первые антитела, кат. №	рекомбинантные цитокины, кат. №	детектирующие антитела, кат. №
1	IL-2	555051	554603	555040
2	IL-4	554515	554605	554483
3	IL-8	554716	554609	554718
4	IL-10	554705	554611	554499
5	IFN- γ	551221	554616	554550
6	TNF- α	551220	554618	554511

Для детекции взаимодействий антиген-антитело использовали биотинилированные МКА и стрептавидин, конъюгированный с флуоресцентным цианиновым красителем Cy3 или Cy5. Методику проведения анализа с использованием белкового микрочипа оптимизировали исходя из принципов, лежащих в основе ИФА. Подробный протокол приведен в разделе 2.3.2.

3.5.2 Дизайн белкового биочипа для выявления IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IFN- γ и TNF- α человека.

С целью определения условий иммобилизации антител на поли-L-лизиновую подложку микрочипа нанесли МКА к IL-8 в диапазоне концентраций от 50 до 250 мкг/мл. Так как адсорбция иммуноглобулинов на поли-L-лизиновую подложку может проходить за счёт электростатических и гидрофобных взаимодействий (*Kusnezow&Hoheisel, 2003; Shannon et al., 2007*), иммобилизацию антител после печати проводили пассивно в течение 1 часа при комнатной температуре. Часть слайдов облучали ультрафиолетом дозами 0,090 и 0,120 Дж/см². Далее микрочипы инкубировали с рекомбинантным IL-8 и Milli-Q H₂O (отрицательный контроль) в различных блокирующих реагентах. Сравнительная оценка полученных в результате инкубации на микрочипе данных

показала, что интенсивность флуоресценция точек, содержащих иммобилизованные антитела к IL-8 в концентрациях 50 и 100 мкг/мл, не преодолевает пороговое значение флуоресценции, равное 900 единицам (рис. 3.20). Интенсивности флуоресценции точек, содержащих МКА в концентрациях 150, 200 и 250 мкг/мл, были выше порогового значения, однако наблюдаемые между ними различия являлись недостоверными. Можно предположить, что это связано с существованием критической сорбционной ёмкости спота. Принимая во внимание полученные данные, для печати на микрочип выбрали значение концентрации МКА, равное 200 мкг/мл. Между микрочипами, иммобилизацию антител на которые осуществляли пассивно и с использованием ультрафиолетового облучения, не выявили значимой разницы в сигналах флуоресценции (данные не представлены).

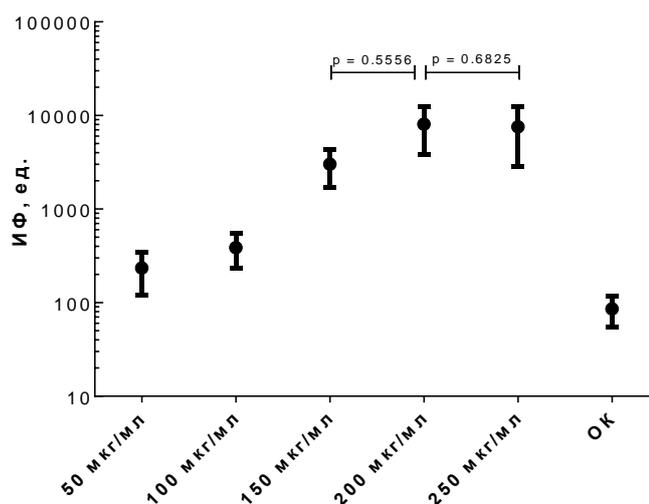


Рисунок 3.20 Интенсивность флуоресценции спотов при различных концентрациях сорбируемых антител. Инкубацию с микрочипом проводили в двух повторах при постоянной концентрации рекомбинантного IL-8. На рисунке представлены результаты одного репрезентативного эксперимента, данные – среднее пяти измерений медианного значения флуоресценции спота за вычетом фона (в относительных единицах) \pm О.С. $p > 0,05$ (достоверность оценивали относительно отрицательного контроля (ОК) с использованием критерия Манна-Уитни).

Далее оценили влияние различных блокирующих агентов – 1 % БСА, 5 % молока и 0,5 % желатина – на качество гибридизации. Для этого все этапы инкубации микрочипа проводили в присутствии блокирующего реагента, разведённого в PBS или PBST буферах. После инкубации определяли

специфический сигнал флуоресценции точек и значение флуоресценции фона. Среди представленных блокирующих реагентов наименьший фоновый сигнал наблюдали в случае 1 % БСА и 5 % молока. При использовании 0,5 % желатина уровень фонового сигнала был сопоставим с величиной флуоресценции фона при отсутствии блокировки. Специфический сигнал флуоресценции спотов был максимален при использовании 0,5 % желатина, и минимален в случае 5 % молока. Исходя из соображений, что блокирующий реагент должен обеспечивать максимальную интенсивность специфической флуоресценции спотов при минимальном значении фонового сигнала, в качестве блокирующего реагента выбрали 1 % БСА.

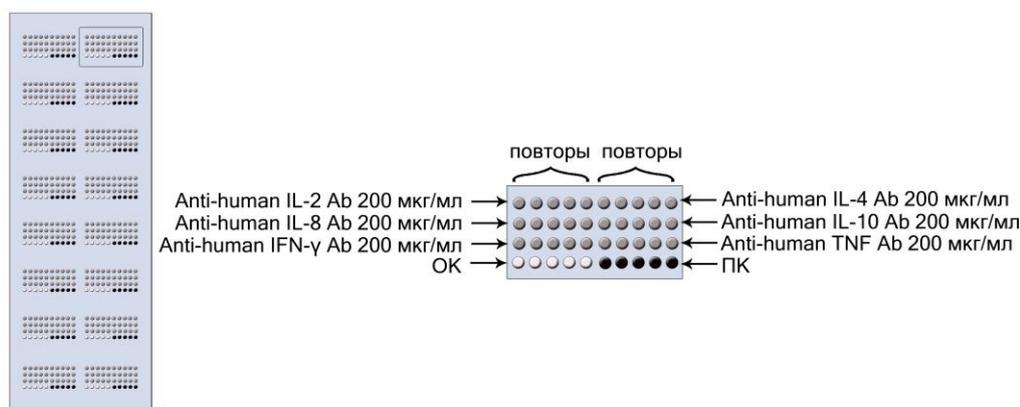


Рисунок 3.21 Схема лабораторного образца белкового микрочипа для определения IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IFN- γ и TNF- α человека. Первые антитела к цитокинам разбавлены в $1 \times$ PBS до концентрации 200 мкг/мл и нанесены в пяти повторах. Расстояние между спотами 300 мкм, средний диаметр спота – 200 мкм. Иммунизацию антител на поли-L-лизиновую подложку осуществляли пассивным способом.

С учётом полученных результатов сконструировали лабораторный образец белкового микрочипа, работающего в «сэндвич»-формате. Биочип состоял из 16 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. 3.21). В качестве положительного контроля наносили МКА козы к иммуноглобулинам мыши в концентрации 200 мкг/мл, в качестве отрицательного – МКА мыши к коровому белку вируса гепатита В (100 мкг/мл). Положительный контроль дополнительно можно использовать как маркер нормализации для оценки вариаций при сравнении результатов между разными эрреями или чипами.

3.5.3 Анализ специфичности и чувствительности белкового микрочипа с помощью рекомбинантных цитокинов

Измерение уровня цитокинов в формате биочипа предполагает мультиплексность, реализуемую путём использования смеси вторых детектирующих антител. В связи с этим оценили перекрёстную реактивность применяемых МКА. Для этого сравнили результаты инкубации микрочипа с каждым из цитокинов-стандартов при выявлении только специфическим биотинилированным МКА или их смесью. Показали, что каждая пара антител имеет строгую специфичность к своему антигену.

Дополнительно провели инкубацию микрочипа со смесью рекомбинантных цитокинов различных концентраций с последующей детекцией только специфическим биотинилированным МКА. Значения интенсивности флуоресценции, детектируемой от целевых точек на чипе, значительно превышали таковые от других спотов, уровень неспецифического связывания в которых был сопоставим с фоновым сигналом.

Далее определили пределы детекции антигенов и построили калибровочные кривые. В качестве стандартов использовали серию 2,5-кратных последовательных разведений каждого рекомбинантного цитокина в диапазоне от 4000 до 6,55 пг/мл. На основании полученных после инкубации значений флуоресценции провели нелинейный регрессионный анализ с использованием метода наименьших квадратов в программе GraphPad Prism. Рассчитанные параметры калибровочных кривых представлены в табл. 3.8, зависимости флуоресценции от концентрации антигенов отображены в графическом виде на рис. 3.22.

Максимальное значение флуоресценции, получаемое при сканировании микрочипа, составляет 65536 единиц (2^{16} , глубина цвета в 16-битном представлении цветов RGB) и определяет верхний порог детекции. Наибольшую определяемую концентрацию каждого цитокина рассчитывали экстраполяцией стандартной кривой до максимального измеряемого прибором значения флуоресценции. Чувствительность микрочипа, то есть наименьшую

детектируемую концентрацию антигена в пробе (Moran&Brown, 1997), определяли в пг/мл как величину, полученную при экстраполяции на стандартную кривую нижнего порогового значения флуоресценции. Пороговое значение вычисляли как флуоресценцию нулевого стандарта (Y_0 , средняя величина, измеренная при построении всех калибровочных кривых) плюс три стандартных отклонения. Пороговое значение составило приблизительно 900 единиц.

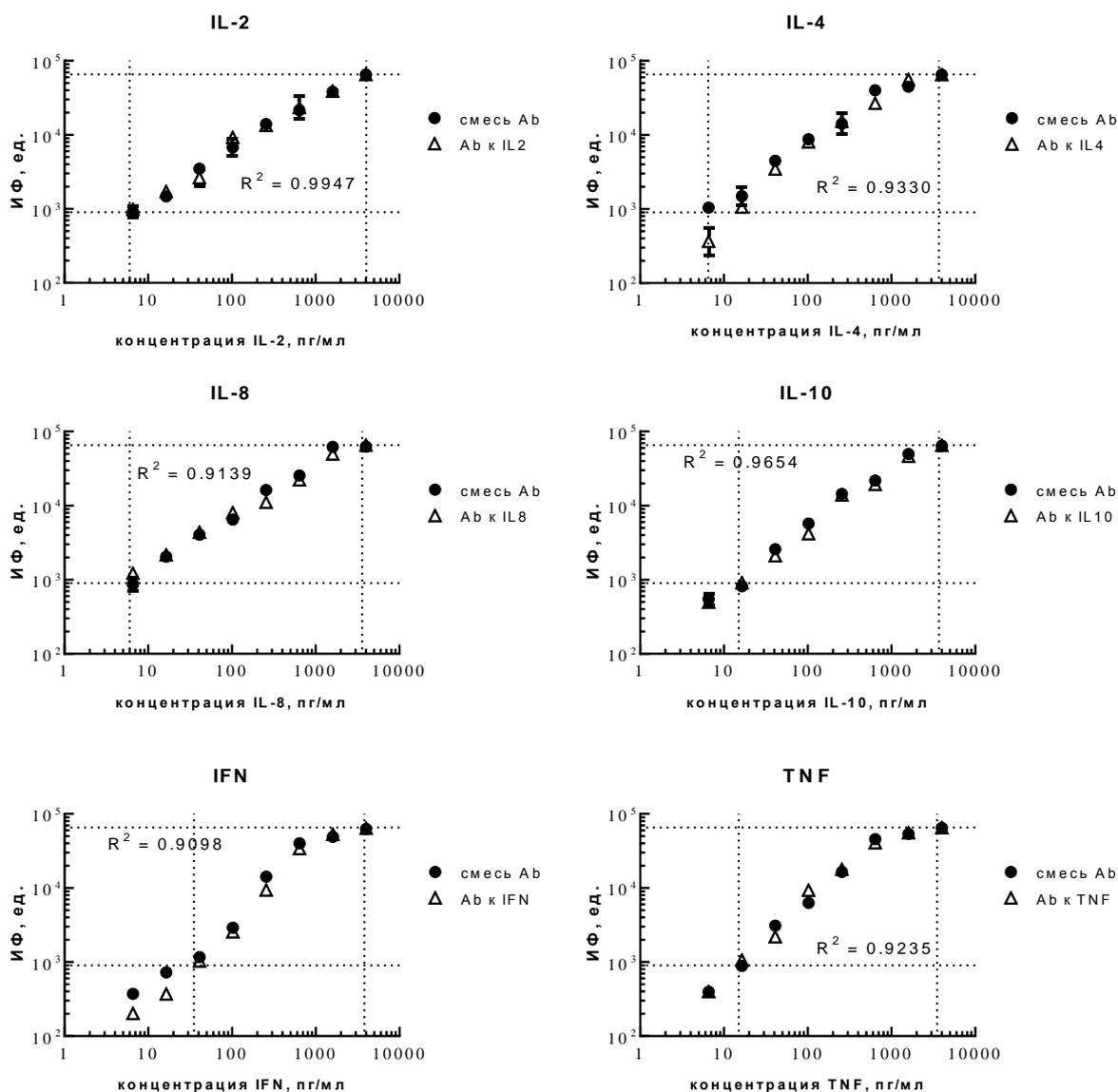


Рисунок 3.22 Стандартные кривые для IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IFN- γ и TNF- α , полученные в процессе «сэндвич»-иммуноанализа на микрочипе. Инкубацию с микрочипом проводили в двух и более (для некоторых цитокинов) повторях. ИФ – средние медианные значения флуоресценции спота за вычетом фона (в относительных единицах), вертикальными отрезками показаны величины О.С. Для удобства отображения график построен в логарифмической системе координат.

Таблица 3.8

Рассчитанные значения параметров стандартных калибровочных кривых и рабочие динамические диапазоны аналитического биочипа для определения IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IFN- γ и TNF- α человека

цитокин	Y_x , значение ИФ, полученное при нелинейном регрессионном анализе	$tg(\alpha)$, тангенс угла наклона,	Нижний предел детекции, пг/мл	Верхний предел детекции, пг/мл
IL-2	2,661	0,5981	6	4000
IL-4	3,127	0,473	6,5	3700
IL-8	3,027	0,5029	6	3600
IL-10	2,821	0,5582	15	3700
IFN- γ	3,054	0,4927	5	3800
TNF- α	3,129	0,4756	15	3500
$Y = 10^{(\alpha \cdot \log(X) + Y_x)}$				

Как и следовало ожидать, динамические диапазоны разработанной аналитической системы (табл. 3.8) варьировали для каждого цитокина. Это обусловлено индивидуальными значениями констант связывания между антигеном и соответствующим МКА. 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 4000 пг/мл для IL-2 до 3500 пг/мл для TNF- α . При концентрациях выше расчётного динамического диапазона происходит насыщение, и стандартные кривые теряют линейность.

Коэффициент вариации, значение которого определяли как отношение стандартного отклонения к средней величине флуоресцентного сигнала, выраженное в процентах, находился в интервале 8–15 % для различных концентраций каждого цитокина (результаты не представлены). При этом максимальные значения коэффициента вариации наблюдали исключительно для нижней границы динамического диапазона, что свидетельствовало о воспроизводимости метода.

Таким образом, динамические диапазоны разработанного аналитического микрочипа и аналогичных систем, основанных на методах флуоресцентного

ИФА, являются сопоставимыми. При этом разработанная система сохраняет основные преимущества микрочипов – мультиплексность и малый расход реагентов и биологического материала.

3.5.4 Анализ влияния гена NS1 вируса гриппа A/H5N1 на спектр цитокинов, секретируемых клетками МКПК методами биочипа и традиционного ИФА

С использованием биочипа измерили уровень цитокинов, секретируемых интактными мононуклеарными клетками периферической крови (МКПК) и МКПК через 9, 24 и 48 часов после заражения вирусами гриппа A/H5N1 wtNS и deltaNS (см. п. 2.1.2). Полученные значения концентраций цитокинов сопоставили с результатами, полученными традиционным методом ИФА. Для проведения ИФА использовали те же рекомбинантные цитокины и МКА, что и в микрочипе. Уровень цитокинов определили по внутренним калибровочным кривым, построенным в процессе эксперимента. Результаты, полученные с помощью микрочипа, были полностью подтверждены методом ИФА (рис. 3.23).

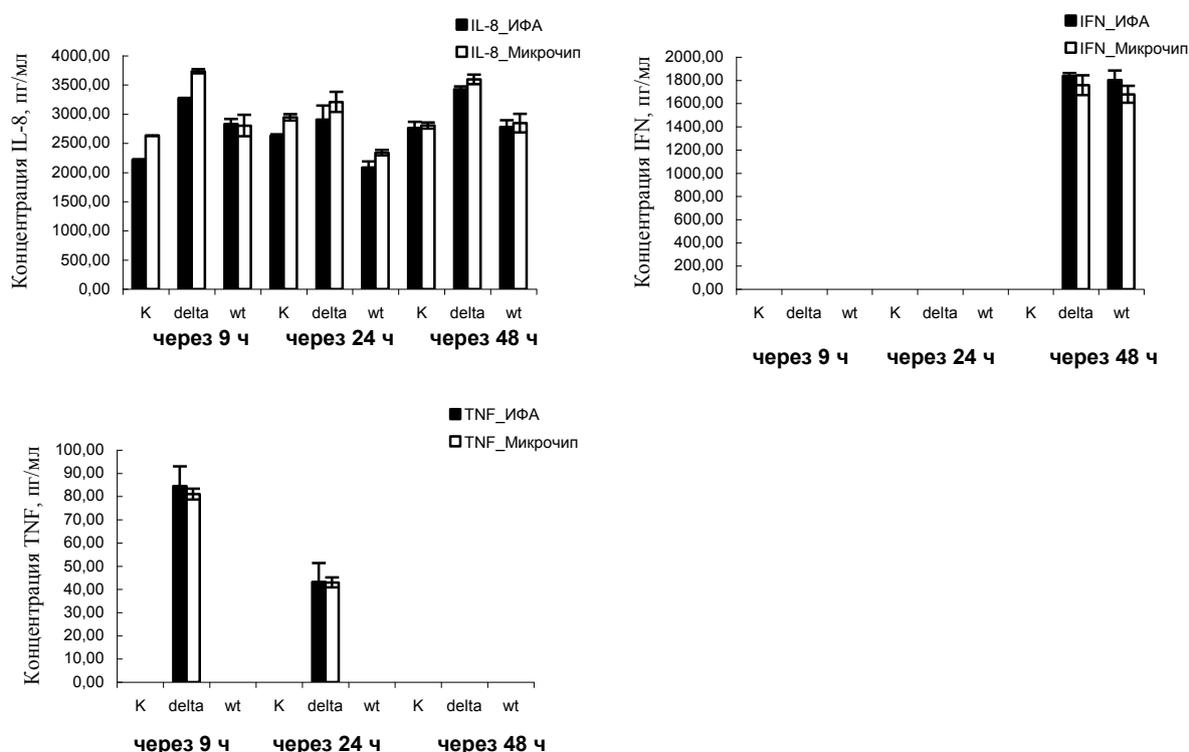


Рисунок 3.23 Продукция цитокинов МКПК, инфицированными вирусами гриппа H5N1 wtNS и deltaNS через 9, 24 и 48 часов после заражения. Каждая точка представляет собой среднее по трём биологическим репликам значение концентрации \pm О.С.

Во всех анализируемых образцах отметили стабильную продукцию IL-8, концентрация которого была значимо выше при инфицировании клеток вирусом deltaNS. 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 следует отметить, что общая динамика уровней цитокинов сохранялась вне зависимости от способа измерения.

Результаты вышеприведённых исследований позволяют заключить, что основные характеристики микрочипа для детекции цитокинов – воспроизводимость, валидность и чувствительность, – удовлетворяют общепринятым критериям проведения высокочувствительного иммуноанализа.

3.6 Анализ особенностей экспрессии цитокинов клетками A549 на уровне транскрипции и на уровне трансляции при заражении вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1_{pdm09})

В заключительной части исследования разработанные тест-системы применили для анализа экспрессии цитокинов в клетках A549, инфицированных вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1_{pdm09}) в дозе 1 MOI. Уровень 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 клетками 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 показаны).

С помощью олигонуклеотидного микрочипа в контрольных незаражённых клетках A549 выявили мРНК цитокинов IL-1 β , IL-6 и IL-18. Заражение клеток вирусом A/California/07/09 приводило к активации транскрипции генов IL-4, IL-10 и TNF- α (рис. 3.24).

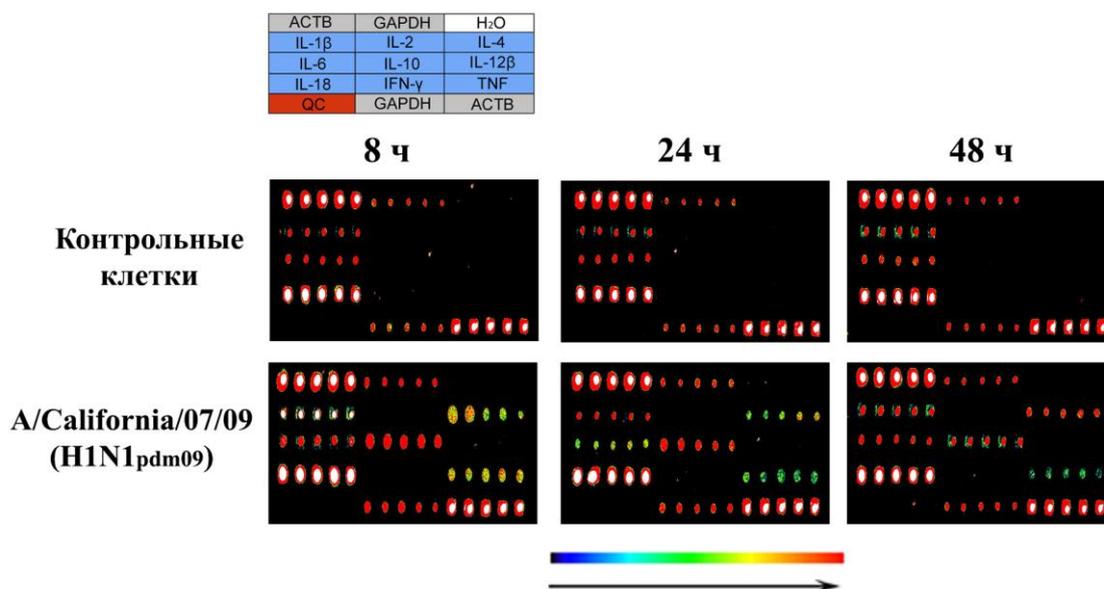


Рисунок 3.24 Продукция мРНК цитокинов в контрольных клетках A549 и клетках, инфицированных ВГА California/07/09 (H1N1_{pdm09}) через 8, 24 и 48 часов после заражения. Результаты гибридизации проб, подготовленных методом мультиплексной ОТ-ПЦР, с олигонуклеотидным микрочипом.

Для определения количественной динамики образования мРНК цитокинов на разных сроках после инфекции провели их анализ методом мПЦР (рис. 3.25). мРНК IL-1 β , IL-6 и IL-18 наблюдали как в инфицированных, так и в незаражённых клетках. Заражение клеток вирусом A/California/07/09 приводило к значительному увеличению числа транскриптов IL-1 β через 24 и 48 часов. На всех сроках после заражения клеток A549 вирусом наблюдали незначительное (в 2-3 раза) повышение уровня мРНК IL-6, уровень мРНК IL-18 не изменялся.

Вирус A/California/07/09 индуцировал в заражённых клетках A549 образование мРНК IL-4, IL-10 и TNF- α , не выявляемых 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 его экспрессии, а к 48 часам происходило снижение уровня мРНК.

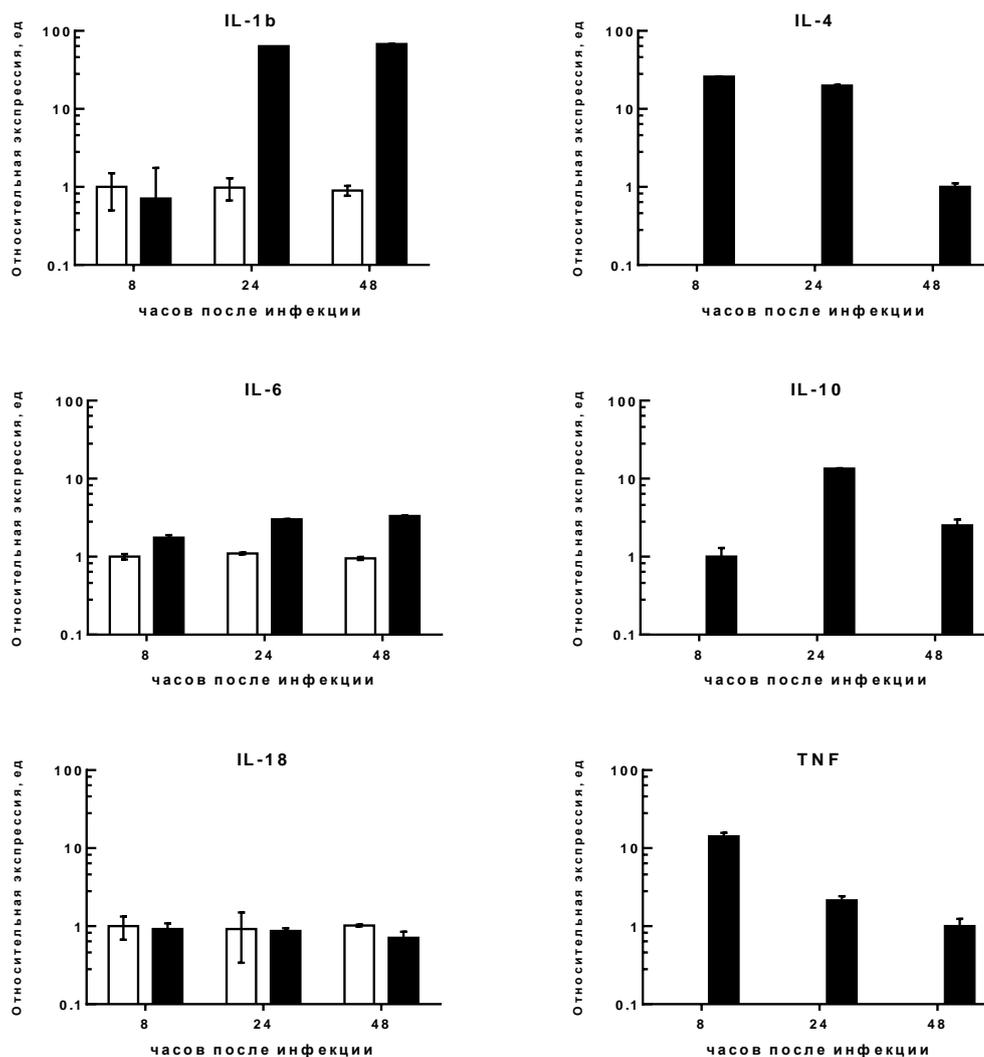


Рисунок 3.25 Уровни мРНК цитокинов в контрольных клетках A549 (□) и клетках, инфицированных ВГА California/07/09 (H1N1_{pdm09}) (■) через 8, 24 и 48 часов после заражения. На диаграмме представлены средние относительные уровни экспрессии, рассчитанные для трёх биологических повторов, ± О.С.

Уровни секретируемых клетками A549 цитокинов определили с использованием белкового микрочипа. Во внеклеточной среде выявляли только TNF- α и IL-8 (рис. 3.26). Секрецию IL-8 наблюдали как в случае контрольных, так и инфицированных вирусом клеток. При заражении наблюдали плавное двукратное повышение уровня IL-8 через 24 часа 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.

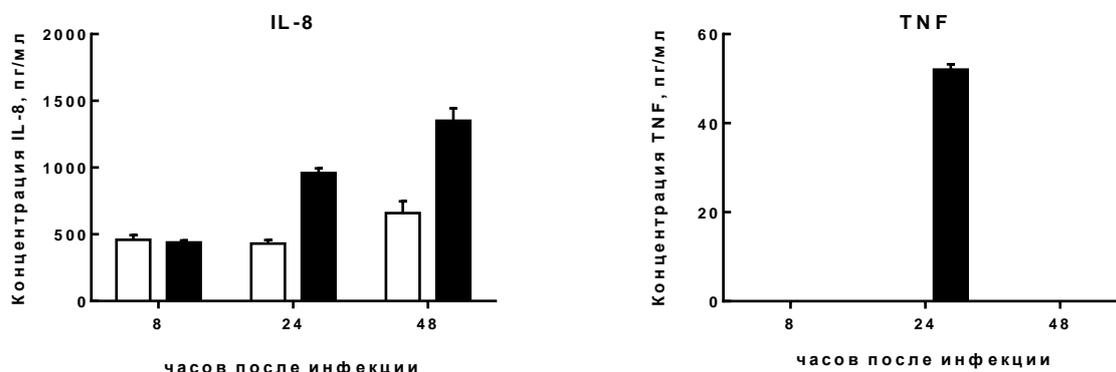


Рисунок 3.26 Индукция цитокинового ответа в незаражённых клетках (□) и клетках A549, инфицированных ВГА California/07/09 (H1N1_{pdm09}) (■) через 8, 24 и 48 часов после инфицирования. На диаграмме представлены средние значения концентраций по трём биологическим репликам ± О.С.

Через 24 часа после заражения вирусом 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.

Представленные данные дают основание полагать, что при заражении клеток A549 вирусом A/California/07/09 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. Мы не проводили измерение внутриклеточного уровня IL-4 и IL-10, поэтому нельзя точно сказать на какой из стадий происходит блокирование образования и транспорта цитокинов во внеклеточную среду.

Вместе с тем, исходя из общих данных по механизмам вирус-опосредованной регуляции экспрессии клеточных генов, можно предположить, что в случае цитокинов происходит именно блокирование трансляции. Одним из возможных механизмов выключения трансляции на матрицах мРНК вышеописанных цитокинов может являться связывание вирусного белка NS1 с

клеточным фактором расщепления и специфического полиаденилирования CPSF30. С помощью CPSF30 происходит 3'-концевой процессинг клеточных пре-мРНК, абсолютно необходимый для созревания мРНК и их экспорта из ядра в цитоплазму (Киселев, 2011). Вирусный белок NS1 связывается с фактором CPSF30 и модулирует активность ядерной поры, что приводит к избирательному транспорту в цитоплазму к местам трансляции только тех мРНК, которые необходимы для функционирования программы вирусной репродукции. Те же клеточные мРНК, которые могут кодировать белки, обладающие противовирусной активностью, наоборот, задерживаются в ядре. В частности, анализ индивидуальных классов мРНК, заблокированных в ядре действием белка NS1, показал, что среди них преобладают транскрипты генов, индуцируемых интерферонами I типа (Киселев, 2011).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе выполнения диссертационного исследования разработали три лабораторных образца тест-систем для определения экспрессии цитокинов человека.

Создан олигонуклеотидный микрочип для выявления мРНК IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 β , IL-18, IFN- γ и TNF- α человека. Рассмотрели несколько способов подготовки флуоресцентно меченых проб для анализа на микрочипе. Результаты, сопоставимые по специфичности и чувствительности с данными, получаемыми традиционным методом ОТ-ПЦР, были получены только при использовании для встраивания флуоресцентной метки метода амплификации нуклеиновых кислот путем мультиплексной ОТ-ПЦР. К сожалению, данный метод позволяет получать только качественные результаты.

С использованием разработанного микрочипа провели анализ роли гена NS1 в индукции мРНК цитокинов в клетках A549 при заражении вирусом гриппа. Показали, что рекомбинантный вирус гриппа A/Kurgan/5/05 с удаленным геном NS1 по сравнению с аналогичным вирусом дикого типа, содержащим

полноценный ген NS1, в клетках A549 индуцирует синтез мРНК IL-1 β , IL-6, IL-10 и TNF- α и ингибирует синтез мРНК противовоспалительного цитокина IL-4.

Для проведения точной количественной оценки мРНК IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 β , IL-18, IFN- γ и TNF- α человека в клетках разработали систему на основе мультиплексной ПЦР в режиме реального времени. Данная система позволяет проводить мультиплексный анализ мРНК цитокинов с чувствительностью от 20 фМ, что соответствует современным требованиям, предъявляемым к такого рода системам. Следует отметить, что разработанный метод в мультиплексном исполнении не имеет прямых коммерческих аналогов.

С использованием предложенного метода оценили спектр цитокинов в клетках A549, инфицированных филогенетически удаленными вирусами, имеющими различную степень патогенности: вирусом сезонного гриппа A/Victoria/361/11 (H3N2), пандемическим вирусом 2009 года A/California/07/09 (H1N1_{pdm}), и высоко патогенным вирусом гриппа птиц A/chicken/Kurgan/5/05 (H5N1). Показали, что все три вирусных штамма индуцируют в клетках A549 экспрессию мРНК провоспалительных цитокинов IL-1 β , TNF- α и IL-18, и мРНК IL-6, который может выполнять как про-, так и противовоспалительные функции. При этом существуют штамм-специфические различия в уровне мРНК цитокинов в клетках A549. В частности, показали, что вирус гриппа птиц A/chicken/Kurgan/5/05 вызывает более мощный провоспалительный ответ, чем другие вирусы. Заражение вирусами A/Victoria/361/11 и A/California/07/09, но не вирусом A/chicken/Kurgan/5/05, активирует образование мРНК противовоспалительного цитокина IL-4. Появление мРНК IL-12 β , ключевого цитокина, усиливающего клеточно-опосредованный иммунный ответ, наблюдается только в случае заражения клеток сезонным вирусом A/Victoria/361/11.

Хорошо известно, что наличие в клетках мРНК не обязательно свидетельствует о наличии соответствующего белка. С целью проведения анализа секретлируемых клетками растворимых цитокинов в биологических жидкостях разработали белковый микрочип, который 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. Сравнение технических характеристик разработанного биочипа показало, что они находятся на уровне аналогичных тест-систем, предлагаемых ведущими мировыми производителями.

На заключительном этапе работы применили все три предложенных метода для оценки цитокинового статуса в клетках A549 при инфицировании вирусом A/California/07/09. Показали, что в ответ на заражение ВГА в клетках активируется продукция мРНК IL-4, IL-10 и TNF- α , при этом во внеклеточной среде выявляется только TNF- α . Полученные результаты позволяют заключить, что только комбинированный анализ экспрессии цитокинов на уровне мРНК и на уровне белка может дать полную картину связанных с цитокинами аспектов протекания инфекционного процесса, вызываемого ВГА.

В заключении следует отметить, что хотя предложенные методы были разработаны для оценки цитокинового статуса при гриппе, они могут быть применены при проведении более широкого круга биологических и медицинских исследований.

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 гена NS1 в вирусе гриппа A/Kurgan/5/05 приводит к повышению уровней мРНК IL-1 β , IL-6, IL-10 и TNF- α и ингибирует синтез мРНК IL-4 в инфицированных клетках A549 по сравнению с вирусом дикого типа.
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 уровне этих мРНК. Заражение вирусами A/Victoria/361/11 и A/California/07/09, но не вирусом A/chicken/Kurgan/5/05, активизирует образование мРНК противовоспалительного цитокина IL-4. Появление мРНК IL-12 β наблюдается только в случае заражения клеток вирусом A/Victoria/361/11.
6. Вирус 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АПК - антиген презентирующая клетка
ВГА - вирус гриппа типа А
дцРНК - двухцепочечная РНК
ИФ – интенсивность флуоресценции
ИФА – иммуноферментный анализ
кДНК – ДНК, комплементарная мРНК
МКА – моноклональное антитело
МКПК - мононуклеарные клетки периферической крови
мПЦР - мультиплексная полимеразная реакция с детекцией в режиме реального времени
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
МФА - метод флуоресцирующих антител
НК – нуклеиновые кислоты
О.С. - ошибка среднего
ОТ-IVT - реакция обратной транскрипции с последующей *in vitro* транскрипцией
ОТ-ПЦР – обратная транскрипция с полимеразной цепной реакцией
оцРНК - одноцепочечная РНК
C_q – пороговый цикл ПЦР
NLR - патоген распознающие рецепторы семейства NOD-подобных
NS1 – неструктурный белок вируса гриппа типа А
RLR - патоген распознающие рецепторы семейства RIG-подобных
TLR - патоген распознающие рецепторы семейства толл-подобных

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абелев, Г. И. Взаимодействие врожденного и приобретенного иммунитета в защите организма от инфекции / Г. И. Абелев // Соросовский Образовательный журнал. — 1998. — № 2. — С. 53–58.
2. ВОЗ // Fact sheet №211. — 2014
3. Галактионов, В.Г. Иммунология / В.Г. Галактионов. — М.: Изд-во МГУ, 1998. — 480 с.
4. Кадагидзе, З.Г. Цитокины / З.Г. Кадагидзе // Практическая онкология. — 2003. — 4(№3). — С. 131-139.
5. Киселев, О.И. Геном пандемического вируса гриппа А/Н1N1_{pdm2009} / О.И. Киселев. — СПб.: Димитрейд График Групп, 2011. — 168 с.
6. Киселев, О.И. Грипп птиц: происхождение инфекционных биокатастроф / О.И. Киселев, под ред. В. И. Покровского. — СПб.: Росток, 2012. — 304 с.
7. Маркелов, М.Л. Технологии микрочипов – новые возможности в диагностике болезней человека / М.Л. Маркелов, Г.А. Шипулин, В.И. Покровский // Терапевтический архив. — 2008. — №4. — С. 79-85.
8. Мирзабеков, А.Д. Применение матричных биочипов с иммобилизованной ДНК в биологии и медицине / А.Д. Мирзабеков, Д.В. Прокопенко, В.Р. Четкин // Информационные медико-биологические технологии. — 2002. — М.: ГЭОТАР-МЕД.
9. Мордвинов, В.А. Цитокины: биологические свойства и регуляция экспрессии гена интерлейкина-5 человека / Мордвинов В.А., Фурман Д.П. // Вестник ВОГиС. — 2009. — 13(№1). — С. 53-67.
10. Наседкина, Т.В. Анализ генетических изменений у человека в норме и при различных заболеваниях с использованием биологических микрочипов: автореф. дис. д-ра биол. наук: 03.00.03; 03.00.15 / Наседкина Татьяна Васильевна. — М., 2009. — 50 с.
11. Ройт, А. Иммунология / А. Ройт, Д. Бростофф, Д. Мейл. — М.: Мир, 2000 — 592 с.
12. Симбирцев, А.С. Цитокины – новая система регуляции защитных реакций организма/ А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. — 2002. — №1. — С. 9-16.
13. Симбирцев, А.С. Цитокины: классификация и биологические функции / А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. — 2004. — 3(№2). — С. 16-23.
14. Фрейдлин, И.С. Иммунная система и её дефекты / И.С. Фрейдлин — СПб.: НТФФ "Полисан", 1998.— 160 с.
15. Ярилин, А.А. Учебник «Основы иммунологии» / А.А. Ярилин — М.: Медицина, 1999.— 608 с.
16. Abbas, A.K. Cellular and molecular immunology / A.K. Abbas, A.H. Lichtman, S. Pillai — 7th Edition. — Elsevier Health Sciences, 2011. — 560 p.
17. Ank, N. IFN-lambda: novel antiviral cytokines / N. Ank, H. West, S.R. Paludan // J. Interferon&Cytokine Research. — 2006. — №26. — P. 373-379.
18. Becker, S. Three-dimensional structure of the Stat3b homodimer bound to DNA / S. Becker, B. Groner, C.W. Muller // Nature. — 1998. — №394. — P. 145 – 151.

19. Brazma, A. Minimum information about a microarray experiment (MIAME) / A. Brazma, P. Hingamp, J. Quackenbush et al. // 2001. — Nature Publishing Group.
20. Bruckbauer, A. Multicomponent submicron features of biomolecules created by voltage controlled deposition from a nanopipet / A. Bruckbauer, D. Zhou, L. Ying et al. // *J. Am. Chem. Soc.* — 2003 — №125 — 9834–9839.
21. Bussfeld, D. Differential mononuclear leukocyte attracting chemokine production after stimulation with active and inactivated influenza A virus / D. Bussfeld, A. Kaufmann, R.G. Meyer et al. // *Cell Immunol.* — 1998. — №186. — P. 1–7.
22. Causton, H. Microarray gene expression data analysis: a beginner's guide / H. Causton, J. Quackenbush., A. Brazma — Blackwell Science Ltd, 2003.
23. Chan, M.C.W. Proinflammatory cytokine responses induced by influenza A (H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells / M.C.W. Chan, C.Y. Cheung, W.H. Chui et al. // *Respiratory Research.* — 2005. — №6. — P. 135.
24. Chen, W. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death / W. Chen., P.A. Calvo, D. Malide et al. // *Nature medicine.* — 2001. — №7. — P. 1306-1312.
25. Clifford, M. Evidence for a novel gene associated with human influenza A viruses / M. Clifford, J. Twigg, C. Upton // *Virology Journal.* — 2009. — №6. — P. 198.
26. Cohen S. Commentary. Similarities of T cell function in cell-mediated immunity and antibody production / S. Cohen, P.E. Bigazzi, T. Yoshida // *Cell Immunol.* — 1974. — 12(№1). — P. 150-159.
27. de Jager, W. Prerequisites for cytokine measurements in clinical trials with multiplex immunoassays / W. de Jager, K. Bourcier, G.T. Rijkers et al. // *BMC.Immunol.* — 2009. — №10. — P. 52.
28. D'Elia, R.V. Targeting the “Cytokine Storm” for Therapeutic Benefit / R.V. D'Elia, K. Harrison, P.C. Oyston et al. // *Clin. Vaccine Immunol.*—2013. — 20(№3). — P. 319-27.
29. Fainboim, L. Cytokines and chronic liver disease / L. Fainboim., A. Chernavsky, N. Paladino // *Cytokine Growth Factor Rev.* — 2007. — 18. — P. 143–157.
30. Feldmann, M. The role of cytokines in normal and pathological situations / M. Feldmann, S. Dower, F.M. Brennan // *Cytokines in Autoimmunity.* — 2000. — Austin: Landes Bioscience. — 295 p.
31. Feldmann, M. Introduction to the Role of Cytokines in Innate Host Defense and Adaptive Immunity / M. Feldmann, J. Oppenheim — Academic Press, 2000. — 2000 p.
32. Ferko, B. Immunogenicity and protection efficacy of replication-deficient influenza A viruses with altered NS1 genes / B. Ferko, J. Stasakova, J. Romanova et al. // *J Virol.* — 2004. — 78(№23). — P. 13037-45.
33. Fernandez-Sesma, A. Influenza virus evades innate and adaptive immunity via the NS1 protein / A. Fernandez-Sesma, S. Marukian, B.J. Ebersole et al. // *J. Virol.* — 2006. — 80(№13). — P. 6295-304.
34. Ferrara, J.L. Cytokine storm of graft-versus-host disease: a critical effector role for interleukin-1 / J.L. Ferrara, S. Abhyankar, D.G. Gilliland // *Transplant Proc.* — 2(№25). — P. 1216–1217.

35. Fischereder, M. Chemokines and chemokine receptors in renal transplantation – from bench to bedside / M. Fischereder // *Acta Physiol. Hung.* — 2007. — №94. — P. 67–81.
36. Fodor, S.P. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis / S.P. Fodor, J.L. Read, M.C. Pirrung et al. // 1991. — *Science.* — №251. — P. 67-773.
37. Gadina, M. Signaling by type I and II cytokine receptors: ten years after / M. Gadina, D. Hilton, J.A. Johnston et al. // *Curr. Opin. Immunol.* — 2001. — №3. — P. 363–373.
38. Ginsberg, S.D. RNA amplification strategies for small sample populations / S.D. Ginsberg // *Methods.* — 2005. — 37(№3). — P. 229-237.
39. Goldsby, R.A. Immunology / R.A. Goldsby, T.K. Kindt, B.A. Osborne et al. — 5th Edition. — New York: W.H. Freeman and Company, 2003.— 350 p.
40. Goodbourn, S. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures / S. Goodbourn, L. Didcock, R.E. Randall // *J. of Gen. Vir.* — 2000. — №81. — P. 2341–2364.
41. Hale, B.G. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses / B.G. Hale, R.E. Randall, J. Ortin et al. // *Journal of General Virology.* — 2008. — № 89. — P. 2359–2376.
42. Hamelinck, D. Optimised normalization for antibody microarrays and application to serum-protein profiling / D. Hamelinck, H. Zhou, L. Li et al. // *Mol. Cell Proteomics.* — 2005. — №4. — P. 773–784.
43. Han, M.V. PhyloXML: XML for evolutionary biology and comparative genomics / M.V. Han, C.M. Zmasek // *BMC Bioinformatics.* — 2009. — 10. — P. 356.
44. Hidary, K.I. Influenza virus utilizes N-linked sialoglycans as receptors in A549 cells / K.I. Hidary, M. Yamaguchi, F. Ueno et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2013. — 436(№3). — P. 394-9.
45. Huang, J. Finding new components of the target of rapamycin (TOR) signaling network through chemical genetics and proteome chips / J. Huang, H. Zhu, S.J. Haggarty et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2004. — №101. — P. 16594–16599.
46. Huang, R-P. Simultaneous detection of multiple cytokines from conditioned media and patient's sera by an antibody-based protein array system / R-P. Huang, R. Huang, Y. Fan et al. // *Analytical Biochemistry.* — 2001. — № 294. — P. 55–62.
47. Jones, R.B. A quantitative protein interaction network for the ErbB receptors using protein microarrays / R.B. Jones, A. Gordus, J.A. Krall et al. // *Nature.* — 2006. — №439. — P. 168–174.
48. Julkunen, I. Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression / I. Julkunen, T. Sareneva, J. Pirhonen et al. // *Cytokine & Growth Factor Reviews.* — 2001. — №12. — P. 171–180.
49. Kalendar, R. Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis / R. Kalendar, D. Lee, A.H. Schulman // *Genomics.* — 2011. — 98(№2). — P. 137-144.
50. Khrapko, K.R. An oligonucleotide hybridization approach to DNA sequencing / K.R. Khrapko, Yu.P. Lysov, A.A. Khorlyk et al. // *FEBS letters.* — 1989. — 256(№1,2). — P. 118-122.

51. Kittel, C. Generation of an influenza A virus vector expressing biologically active human interleukin-2 from the NS gene segment / C. Kittel, B. Ferko, M. Kurz et al. // *J. Virol.* — 2005. — 79(№16). — P. 10672-7.
52. Koj, A. From the obscure and mysterious acute phase response to toll-like receptors and the cytokine network / A. Koj // *Current Immunology Reviews.* — 2008. — №4. — P. 199-214.
53. Koltai, H. Specificity of DNA microarray hybridization: characterization, effectors and approaches for data correction / H. Koltai, C. Weingarten-Baror // *Nucleic Acids Res.* — 2008. — 36(№7). — P. 2395-2405.
54. Kopf, E. Antibody arrays – an emerging tool in cancer proteomics / E. Kopf, D. Zharhary // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* — 2007. — №39. — P. 1305–1317.
55. Kricka, L.J. Current perspectives in protein array technology / L.J. Kricka, S.R. Master, T.O. Joos et al. // *Ann. Clin. Biochem.* — 2006. — №43. — P. 457–467.
56. Kulesh, D.A. Identification of interferon-modulated proliferation-related cDNA sequences / D.A. Kulesh, D.R. Clive, D.S. Zarlenga et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1987. — 84(№23). — P. 8453-7.
57. Kumagai, Y. Pathogen recognition by innate receptors / Y. Kumagai, O. Takeuchi, S. Akira // *J. Infect. Chemother.* — 2008. — 14 (№2). — P. 86–92.
58. Kunkel, S.L. Prostaglandin E2 regulates macro-phage-derived tumor necrosis factor gene expression / S.L. Kunkel, M. Spengler, M.A. May et al. // *J. Biol.Chem.* — 1988. — №263. — P. 5380-5384.
59. Kusnezow, W. Solid supports for microarray immunoassay / W. Kusnezow, J.D. Hoheisel // *Journal of Molecular Recognition.* — 2003. — №16. — P. 165-176.
60. Lee, N.L.S. Role of cytokines and chemokines in severe and complicated influenza infections / N.L.S. Lee // *Hong Kong Med J.* — 2009. — №15(Suppl. 8). —P. 38-41.
61. Leng, S.X. ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging / S.X. Leng, J.E. McElhaney, J.D. Walston et al. // *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med.* — 2008. — №63. —P. 879–884.
62. Lester, S.N. Toll-Like Receptors in Antiviral Innate Immunity / S.N. Lester, K. Li // *J. Mol. Biol.* — 2014. — 426(№6). — P. 1246-1264.
63. Levine, S.J. Mechanisms of soluble cytokine receptor generation / S.J. Levine // *J. Immunol.* — 2004. — 173(№9). — P. 5343-8.
64. Long, J.X. Virulence of H5N1 avian influenza virus enhanced by a 15-nucleotide deletion in the viral nonstructural gene / J.X. Long, D.X. Peng, Y.L. Liu et al. // *Virus genes.* – 2008. – T. 36. – №. 3. – C. 471-478.
65. Lu, Y. The influenza virus NS1 protein: a novel inhibitor of pre-mRNA splicing / Y. Lu, X.Y. Quan, R.M. Krug // *Genes Dev.* — 1994. — №8. —P. 1817-28.
66. Lucey, D.R. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory / D.R. Lucey, M. Clerici, G.M. Shearer // *Clin Microbiol Rev.* — 1996. — 9(№4). — P. 532-562.
67. Lysov, Y. A new method to determine the nucleotide sequence by hybridizing DNA with oligonucleotides / Y. Lysov, V. Florentiev, A. Khorlin et al. // *Proc. Acad. Sci.*

USSR. — 1988. — №303. — P. 1508-1511.

68. Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction / M. Zuker // *Nucleic Acids Res.* 31 (13), 3406-3415, 2003.
69. Maskos, U. Oligonucleotide hybridizations on glass supports: a novel linker for oligonucleotide synthesis and hybridization properties of oligonucleotides synthesised in situ / U. Maskos, E.M. Southern // *Nucleic Acids Res.* — 1992. — 20(№7). — P. 1679–84.
70. McAdams, T.A. Ex vivo expansion of primitive hematopoietic cells for cellular therapies: An overview / T.A. McAdams, C.E. Sandstrom, W.M. Miller et al. // *Cytotechnology.* — 1995. — 18(№1-2). — P. 133-46.
71. McGinnis, S. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools / S. McGinnis, T. L. Madden // *Nucleic Acids Res.* — 2004. — №32 (Web Server issue). — P. 20–25.
72. *Microarray Handbook* // Amersham Biosciences. — 2002. — code number 63-0048-49.
73. Moran, R.F. The smallest concentration / R.F. Moran, E.N. Brown // *Clin. Chem.* — 1997. — 43(№5). — P. 856-857
74. Mossman, B.T. Cellular and molecular mechanisms of asbestosis / B.T. Mossman, R. Gilbert, J. Donerty et al. // *Chest.*— 1986.— P. 161
75. Nakaya, H.I. Concepts on microarray design for genome and transcriptome analyses / H.I. Nakaya, E.M. Reis, S. Verjovski-Almeida // *Nucleic Acids Hybridization Modern Applications.* — 2007.
76. Nakayama, N. Colony-stimulating factors, cytokines and hematopoiesis / N. Nakayama, K. Hatake, A. Miyajima et al. // *Curr Opin Immunol.* — 1989. — 2(№1). — P. 68-77.
77. Nardone, L.L. Cell line A549 as a model of the type II pneumocyte. Phospholipid biosynthesis from native and organometallic precursors / L.L. Nardone, S.B. Andrews // *Biochim Biophys Acta.* — 1979. — 573(№2). — P. 276-95.
78. Neuman de Vegvar, H.E. Microarray profiling of antibody responses against simian-human immunodeficiency virus: postchallenge convergence of reactivities independent of host histocompatibility type and vaccine regimen / H.E. Neuman de Vegvar, R.R. Amara, L. Steinman et al. // *J Virol.* —2003. — 77(№20). — P. 11125-38.
79. Nolan, T Quantification of mRNA using real-time RT-PCR / T. Nolan, R.E Hands, S.A. Bustin // *Nature protocols.* — 2006. — 1(№ 3). — P. 1559-1582.
80. Obenauer, J.C. Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates / J.C. Obenauer, J. Denson, P.K. Mehta et al. // *Science.* – 2006. – T. 311. – №. 5767. – C. 1576-1580.
81. Oslund, K.L. Influenza-induced innate immunity: regulators of viral replication, respiratory tract pathology & adaptive immunity / K.L. Oslund, N. Baumgarth // *Future Virol.* — 2011. — 6(№8). — P. 951–962.
82. Ptacek, J. Global analysis of protein phosphorylation in yeast / J. Ptacek, G. Devgan, G. Michaud et al. // *Nature.* — 2005. — №438. — P. 679–684.
83. Quackenbush, J. Computational analysis of microarray data / J. Quackenbush // *Nature Reviews Genetics.* — 2001. — №2. — P. 418-427.

84. Rao, A. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function / A. Rao, C. Luo, P.G. Hogan // *Annu. Rev. Immunol.* — 1997. — №15. — P. 707-747.
85. Reed, L.J A simple method of estimating fifty per cent endpoints / L.J. Reed, H. Muench // *The American Journal of Hygiene.* — 1938. — 27. — P. 493–497.
86. Robert, C. Microarray analysis of gene expression during early development: a cautionary overview / C. Robert // *Reproduction.* — 2010. — 140(№6). — P. 787-801.
87. Romanova J. Preclinical evaluation of a replication-deficient intranasal ΔNS1 H5N1 influenza vaccine / J. Romanova, B.M. Krenn, M. Wolschek et al. // *PLoS One.* — 2009. — 4(№6). — P. 5984.
88. Rot, A. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells / A. Rot, U.H. von Andrian // *Annu. Rev. Immunol.* — 2004. — №22. — P. 891-928.
89. Rozen, S. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers / S. Rozen, H.J. Skaletsky // *Bioinformatics: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology).* — Humana Press, 2000.
90. Rudensky, A.Y. FOXP3 and NFAT: partners in tolerance / A.Y. Rudensky, M. Gavin, Y. Zheng // *Cell.* — 2006. — №126. — P. 253–256.
91. Samuel, C. Antiviral Actions of Interferons / C. Samuel // *Clinical. Microbiol. Rev.* — 2001. — 14(№4). — P. 778-809.
92. Sanchez-Carbayo, M. Antibody Arrays: Technical Considerations and Clinical Applications in Cancer / M. Sanchez-Carbayo // *Clinical Chemistry.* — 2006. — 52(№9). — P. 1651–1659.
93. Seder, R.A. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice / R.A. Seder, W.E. Paul, M.M. Davis et al. // *J. Experimental. Med.* — 1992. — №176. — P. 1091-1098.
94. Shaw, G. A conserved AU sequence from the 3'-untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation / G. Shaw, R. Kamen // *Cell.* — 1986. — №46. — P. 659.
95. Shchepinov, M.S. Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays / M.S. Shchepinov, S.C. Case-Green, E.M. Southern // *Nucleic Acids Research.* — 1997. — 25(№6). — P. 1155–1161.
96. Shin, D.S. Automated maskless photolithography system for peptide microarray synthesis on a chip / D.S. Shin, K.N. Lee, B.W. Yoo et al. // *J. Comb. Chem.* — 2010. — 12(№4). — P. 463-71.
97. Smith, C.A. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation and death / C.A. Smith, T. Farrah, R.G. Goodwin // *Cell.* — 1994. — №76. — P. 959-962.
98. Smyth, G.K. Statistical Issues in cDNA Microarray Data Analysis / G.K. Smyth, Y.H. Yang, T. Speed // *Methods in Molecular Biology.* — 2003. — №224. — P. 111-36.
99. Spurrier, B. Protein and lysate array technologies in cancer research / B. Spurrier, P. Honkanen, A. Holway et al. // *Biotechnology Advances.* — 2008. — №26. — P. 361–369.
100. Starr, R. A family of cytokine-inducible inhibitors of signaling / R. Starr, T.A.

Wilson, E.M. Viney et al. // *Nature*. — 1997. — V.387. — P. 917-921.

101. Stamatakis, A. RAxML-III: a fast program for maximum likelihood-based inference of large phylogenetic trees / A. Stamatakis, T. Ludwig, H. Meier // *Bioinformatics*. — 2005. — 21(№4). — P. 456-463.

102. Stasakova, J. Influenza A mutant viruses with altered NS1 protein function provoke caspase-1 activation in primary human macrophages, resulting in fast apoptosis and release of high levels of interleukins 1beta and 18 / J. Stasakova, B. Ferko, C. Kittel et al. // *The Journal of general virology*. — 2005. — №86. — P. 185-195.

103. Swain, S.L. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors / S.L. Swain, A.D. Weinberg, M.E. English et al. // *J. Immunol.* — 1990. — №145. — P. 3796-3806.

104. Takeda, K. Toll-like receptors in innate immunity / K. Takeda, S. Akira // *Int. Immunol.* — 2005. — 17(№1). — P. 1-14.

105. Takeuchi, O. Innate immunity to virus infection / O. Takeuchi, S. Akira // *Immunological Reviews*. — 2009. — V. 227. — P. 75–86.

106. Tam, S.W. Simultaneous analysis of eight human Th1/Th2 cytokines using microarrays / S.W. Tam, R. Wiese, S. Lee et al. // *Journal of Immunological Methods*. — 2002. — № 261. — P. 157–165.

107. Tarrant, J.M. Blood cytokines as biomarkers of in vivo toxicity in preclinical safety assessment: considerations for their use / J.M. Tarrant // *Toxicological sciences*. — 2010. — 117(№1). — P. 4–16.

108. Taubenberger, J.K. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation / J.K. Taubenberger, J.C. Kash // *Cell Host Microbe*. — 2010. — №7(6). — P. 440-451.

109. Thavasu, P.W. Measuring cytokine levels in blood. Importance of anticoagulants, processing, and storage conditions / P.W. Thavasu, S. Longhurst, S.P. Joel et al. // *J.Immunol.Methods*. — 1992. — №153. — P. 115–124.

110. Thellin, O. Housekeeping genes as internal standards: use and limits / O. Thellin, W. Zorzi, B. Lakaye et al. // *Journal of Biotechnology*. — 1999. — №75. — P. 291–295.

111. Tisoncik, J.R. Into the eye of the cytokine storm / J.R. Tisoncik, M.J. Korth, C.P. Simmons et al. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 2012. — 76(№ 1). — P. 16–32

112. Todt S. Immobilization chemistries / S. Todt, D.H. Blohm // *Methods Mol. Biol.* — 2009. — №529 — P. 81-100.

113. Tsuruta, L. Transcriptional control of cytokine genes / L. Tsuruta, N. Arai, K. Arai // *Int. Rev. Immunol.* — 1998. — №16. — P. 581-616.

114. Tuimala, J. DNA Microarray Data Analysis / J. Tuimala, M. Lain. — Helsinki: CSC, 2003. — 242 p.

115. Utz, P.J. Protein arrays for studying blood cells and their secreted products / P.J. Utz // *Immunol. Rev.* — 2005. — № 204. — P. 264-282.

116. van Gelder, R.N. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA / R.N. van Gelder, M.E. von Zastrow, A. Yool et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1990. — № 87. — P. 1663–1667.

117. van Reeth, K. Cytokines in the pathogenesis of influenza / K. van Reeth // *Vet*

Microbiol. — 2000. — 74(№1-2). — P. 109-16.

118. 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 et al. // *Virus Research*. — 2014. — № 185. — P. 53–63

119. Vilcek, J. Interferons and other cytokines / J. Vilcek, G. Sen *Virology*, Edited by Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. — Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996.

120. Wang, C.C. Array-based multiplexed screening and quantitation of human cytokines and chemokines / C.C. Wang, R.P. Huang, M. Sommer et al. // *J. Proteome Res.* — 2002. — № 1(4). — P. 337-43.

121. Warren, J.L. Cytokines and immunodeficiency diseases / J.L. Warren // *Nature reviews Immunology*. — 2001. — V.1. — P. 200-208

122. Wernersson, R. Probe selection for DNA microarrays using OligoWiz / R. Wernersson, A.S. Junker, H.B. Nielsen // *Nat Protoc.* — 2007. — 2(№11). — P. 2677-91.

123. Whiteside, T.L. Cytokines and Cytokine measurements in a clinical laboratory / T.L. Whiteside // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* — 1994. — 1(№3). — P. 257-260.

124. Wise, H.M. A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA / H.M. Wise, A. Foeglein, J. Sun et al. // *J Virol.* — 2009. — №83. — P. 8021-8031.

125. Witte, K.L. Recent applications of protein arrays in target identification and disease monitoring / K.L. Witte, S. Nock // *Drug Discovery Today: Technologies*. — 2004. — 1(№1). — P. 35-40.

126. Wong, H.L. Reproducibility and correlation of multiplex cytokine levels in asymptomatic persons / H.L. Wong, R.M. Pfeiffer, T.R. Fears et al. // *Cancer epidemiol. Biomarkers Prev.* — 2008. — №17. — P. 3450-3456.

127. Yang, Y.H. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation / Y.H. Yang, S. Dudoit, P. Luu et al. // *Nucleic Acids Res.* — 2002. — 30(№4). — P. 15.

128. Yang, Y.H. Analysis of cDNA microarray images / Y.H. Yang, M.J. Buckley, T.P. Speed // *Brief. Bioinform.* — 2001. — 2(№4). — P. 341-349.

129. Yoshimura, A. A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH-2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukine 3 and erythropoietin receptors / A. Yoshimura, T. Ohkubo, T. Kiguchi et al. // *EMBO J.* — 1995. — V.14. — P. 2816-2826.

130. Zhang, J. Influenza A virus M1 blocks the classical complement pathway through interacting with C1qA / J. Zhang, G. Li, X. Liu et al. // *J. Gen. Virol.* — 2009. — 90(№11). — P. 2751-8.

131. Zhou, X. Conceptual and methodological issues relevant to cytokine and inflammatory marker measurements in clinical research / X. Zhou, M.S. Fragala, J.E. McElhaney et al. // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* — 2010. — 13(№5). — P. 541–547.

132. Zhu, B. An evaluation of linear RNA amplification in cDNA microarray gene expression analysis / B. Zhu, F. Xu, Y. Baba // *Molecular Genetics and Metabolism*. — 2006. — №87. — P. 71–79.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Перечень рисунков:

Рисунок 1.1 Рецепторы цитокинов и их лиганды	16
Рисунок 1.2 Схема пути внутриклеточной передачи сигнала от цитокина к соответствующему гену-мишени.	18
Рисунок 1.3 Три класса паттерн-распознающих рецепторов, обеспечивающих иммунный ответ на РНК-содержащие вирусы.	20
Рисунок 1.4 Функции цитокинов при иммунном ответе.	21
Рисунок 1.5 Стимуляция Th1 и Th2 иммунных ответов.	25
Рисунок 1.6 Продукция цитокинов эпителиальными клетками и макрофагами, инфицированными ВГА	28
Рисунок 1.7 Технологии производства микрочипов.....	36
Рисунок 1.8 Основные стадии проведения анализа с применением биологических микрочипов.....	37
Рисунок 1.9 Способы получения флуоресцентно меченой пробы для гибридизации с микрочипом.	39
Рисунок 1.10 Схемы проведения анализа с использованием белковых микрочипов.....	40
Рисунок 3.1 Схема филогенетического дерева белка NS1 вирусов гриппа А человека, построенного методом максимального правдоподобия по алгоритму RaхML.	60
Рисунок 3.2 Выравнивание аминокислотных последовательностей белка NS1 вирусов гриппа А/BrevigMission/1/1918 (H1N1), А/Puerto Rico/8/34 (H1N1), А/Victoria/361/11 (H3N2), А/California/07/09 (H1N1 _{pdm09}) и А/chicken/Kurgan/05 (H5N1).	61
Рисунок 3.3 Схематическое представление функциональных доменов белка NS1 вируса гриппа	61
Рисунок 3.4 Схема лабораторного образца олигонуклеотидного микрочипа для анализа уровня экспрессии цитокинов IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 β , IL-18, IFN- γ и TNF- α человека.....	66
Рисунок 3.5 Результаты гибридизации микрочипа с контрольной пробой Су3-QС* при использовании различных блокирующих реагентов.	69
Рисунок 3.6 Стандартная кривая, полученная при гибридизации микрочипа с зондом Су3-QС*.	70
Рисунок 3.7 Схемы подготовки флуоресцентно меченых проб для проведения анализа на олигонуклеотидном микрочипе.....	72
Рисунок 3.8 Подготовка флуоресцентно меченых проб для гибридизации.....	73
Рисунок 3.9 Экспрессия цитокинов клетками А549, инфицированными рекомбинантными вирусами гриппа А/Kurgan/5/05 (H5N1)	76
Рисунок 3.10 Результаты гибридизации микрочипа с флуоресцентно мечеными продуктами, полученными методом ОТ-ПЦР.	76
Рисунок 3.11 Диаграммы зависимости пороговых циклов C _q для исследуемых генов-мишеней.....	80
Рисунок 3.12 Кривые накопления продуктов в зависимости от температуры отжига и эндогенного контроля.	81
Рисунок 3.13 Кривые накопления, полученные для IL-4 при постановке ПЦР в моноплексном и мультиплексном форматах.	83
Рисунок 3.14 Кривые накопления целевых продуктов в разрабатываемых мПЦР	84
Рисунок 3.15 Рассчитанные коэффициенты вариаций значений C _q	85
Рисунок 3.16 Репликация геномной РНК вирусов А/chicken/Kurgan/5/05 (H5N1), А/California/07/09 (H1N1 _{pdm09}) и А/Victoria/361/11 (H3N2) в эпителиальных клетках А549.....	86

Рисунок 3.17 Динамика уровней цитокинов мРНК IL-1 β , TNF- α , IL-6 и IL-18 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).....	87
Рисунок 3.18 Индукция мРНК IL-12 β в эпителиальных клетках A549 вирусом гриппа A/Victoria/361/11 (H3N2)	89
Рисунок 3.19 Динамика уровней мРНК IL-4 в клетках A549 при заражении вирусами гриппа A/California/07/09 (H1N1 _{pdm09}) и A/Victoria/361/11 (H3N2).....	90
Рисунок 3.20 Интенсивность флуоресценции спотов при различных концентрациях сорбируемых антител.....	93
Рисунок 3.21 Схема лабораторного образца белкового микрочипа для определения IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IFN- γ и TNF- α человека.....	94
Рисунок 3.22 Стандартные кривые для IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IFN- γ и TNF- α , полученные в процессе «сэндвич»-иммуноанализа на микрочипе.	96
Рисунок 3.23 Продукция цитокинов МКПК, инфицированными вирусами гриппа H5N1 wtNS и deltaNS через 9, 24 и 48 часов после заражения.....	98
Рисунок 3.24 Продукция мРНК цитокинов в контрольных клетках A549 и клетках, инфицированных ВГА California/07/09 (H1N1 _{pdm09}) через 8, 24 и 48 часов после заражения....	100
Рисунок 3.25 Уровни мРНК цитокинов в контрольных клетках A549 и клетках, инфицированных ВГА California/07/09 (H1N1 _{pdm09}) через 8, 24 и 48 часов после заражения....	101
Рисунок 3.26 Индукция цитокинового ответа в незаражённых клетках и клетках A549, инфицированных ВГА California/07/09 (H1N1 _{pdm09}) через 8, 24 и 48 часов после инфицирования.	102

Перечень таблиц:

Таблица 1.1 Основные клетки-продуценты цитокинов	13
Таблица 1.2 Основные цитокины, участвующие в иммунном ответе	23
Таблица 3.1 Характеристика ВГА, используемых в работе	62
Таблица 3.2 Олигонуклеотидные зонды и праймеры для выявления 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 биочипа.....	67
Таблица 3.3 Результаты исследования профиля цитокинов в клетках A549, инфицированных вирусами гриппа с полноценным и делетированным NS1 геном	77
Таблица 3.4 Последовательности TaqMan зондов и праймеров для определения экспрессии цитокинов методом мПЦР.....	78
Таблица 3.5 Оптимальные концентрации праймеров и зондов в мПЦР, а также рассчитанные значения эффективностей реакции.....	82
Таблица 3.6 Экспрессия мРНК цитокинов в клетках A549 при заражении вирусами гриппа....	89
Таблица 3.7 Используемые в работе рекомбинантные цитокины (IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IFN- γ и TNF- α) и соответствующие им МКА производства компании “BD Biosciences” (США).....	92
Таблица 3.8 Рассчитанные значения параметров стандартных калибровочных в кривых и рабочие	97