

*На правах рукописи*

Усольцева Полина Сергеевна

**Особенности ранних этапов репродукции эховирусов  
с различной рецепторной специфичностью**

03.02.02 – вирусология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Кольцово – 2021

Работа выполнена в Екатеринбургском научно-исследовательском институте вирусных инфекций Федерального бюджетного учреждения науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

**Научный руководитель:** Резайкин Алексей Васильевич, кандидат медицинских наук, доцент кафедры медицинской физики, информатики и математики ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России

**Официальные оппоненты:** Рябчикова Елена Ивановна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, руководитель группы микроскопических исследований Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Извекова Ирина Яковлевна, доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России

#### **Ведущая организация**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН

Защита состоится "25" июня 2021 г. в 13-00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.020.02 при Федеральном бюджетном учреждении науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирской области, тел. (383) 336-60-10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора <http://www.vector.nsc.ru>

Автореферат разослан " \_\_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Непомнящих Т.С.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность темы исследования**

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) в 2018 году, наравне с аренавирусными геморрагическими лихорадками, лихорадкой Чикунгунья, тяжелой лихорадкой с синдромом тромбоцитопении и коронавирусными заболеваниями, вызываемыми высокопатогенными типами коронавируса, внесла, в качестве кандидата, в «Список приоритетных заболеваний» эмерджентные неполиомиелитные энтеровирусы, включая EVA71 и EVD68 [Mehand M.S. et al., 2018]. По мнению специалистов ВОЗ, эти заболевания представляют серьезную угрозу для здоровья населения и требуют дальнейших исследований в области эпидемиологического надзора и диагностики. В последнее десятилетие в России и в странах Европы регулярно регистрируются случаи энтеровирусного менингита и энтеровирусной инфекции с экзантематозным поражением слизистых оболочек и кожи, связанные с циркуляцией эховирусов 30 типа и коксакивирусов А6 типа [Лукашев А.Н. и др., 2018]. Клинические проявления инфекции, вызванной неполиомиелитными энтеровирусами, характеризуются широким спектром, включающим лихорадочное заболевание, конъюнктивит, инфекции верхних и нижних дыхательных путей, гастроэнтерит, менингит, энцефалит, энцефаломиелит и другие формы инфекции [Ворошилова М.К. 1979; Канаева О.И., 2014]. Способность энтеровирусов к репродукции в различных тканях и органах подразумевает использование различных клеточных рецепторов и путей эндоцитоза при инфицировании клеток.

Исследования ранних этапов входа энтеровирусов в чувствительные клетки не теряют своей актуальности уже более 50 лет [Helenius A., 2018], начиная с работ, выполненных на модели вируса полиомиелита в культуре клеток HeLa [Holland J.J. and McLaren L.C., 1959; Holland J.J., 1962]. Рецепторная специфичность энтеровирусов по отношению к связывающим рецепторам (рецепторам прикрепления) на плазматической мембране клеток определяет последовательность событий, составляющих конкретный путь входа вируса в клетку [Baggen J. et al., 2018], который заканчивается высвобождением геномной РНК и её перемещением через мембрану эндосомы в цитоплазму. Процесс входа энтеровирусов в клетку происходит поэтапно и сопровождается постепенной дезинтеграцией капсида («раздеванием») с высвобождением вирусной РНК под действием клеточных факторов.

Необходимым ключевым фактором высвобождения РНК у вирусов полиомиелита, некоторых коксакивирусов и риновирусов являются клеточные рецепторы, дезинтегрирующие вирусный капсид и вызывающие необратимый переход зрелых вирионов в А-частицы, которые предшествуют появлению пустых капсидов после высвобождения из них геномной вирусной РНК [Bergelson J.M. and Coyne C.B., 2013; Carson S.D. et al., 2011; Shafren D.R. et al., 1997; Zhang P. et al., 2008]. Однако, клеточный рецептор, дезинтегрирующий эховирусный капсид, до недавнего времени оставался неизвестным.

Высокий потенциал внутритиповой изменчивости эховирусов по признаку рецепторной специфичности [McLeish N.J. et al., 2012; Novoselov A.V. et al., 2012; Rezaikin A.V. et al., 2009], наряду с наблюдавшимся у эховирусов некоторых типов мультирецепторным тропизмом [Goodfellow I.G. et al., 2001], подразумевающим способность эховирусов использовать различные пути входа в клетки, обосновывают необходимость исследований кинетики событий репродуктивного цикла эховирусов в зависимости от их рецепторной специфичности и типа клеток. Исследования кинетики дезинтеграции капсида с высвобождением РНК эховирусов с известной рецепторной специфичностью позволяют сравнивать пропускную способность различных путей входа в клетки и определять преимущественный путь, используемый эховирусами с мультирецепторным тропизмом при заражении определённых типов клеток.

Изучение молекулярного механизма и кинетических особенностей цикла репродукции эховирусов с различной рецепторной специфичностью является актуальным направлением фундаментальных исследований в вирусологии, открывающим новые возможности для целенаправленного создания высокоэффективных противовирусных препаратов, для совершенствования терапевтических средств на основе эховирусных векторов в качестве онколитических вирусов и совершенствования невирусных векторов для доставки генов в клетки человека.

### **Степень разработанности темы исследования**

За последнее десятилетие был достигнут существенный прогресс в понимании структурно-функциональных аспектов взаимодействия энтеровирусов вида В (*Enterovirus B*), в том числе – эховирусов, с различными рецепторами при входе в клетку [Marjomaki V. et al., 2015].

Первоначально, для взаимодействия с плазматической мембраной клеток, вирионы используют связывающие рецепторы (рецепторы прикрепления). Эховирусы могут использовать в качестве связывающих клеточных рецепторов следующие виды молекул: фактор, ускоряющий распад комплемента – DAF [Kim C and Bergelson J.M., 2012; Sobo K. et al., 2011], протеогликаны гепарансульфата – HSPG [Goodfellow I.G. et al., 2001], интегрины –  $\alpha 2\beta 1$  [Jokinen J. et al., 2010] и  $\alpha V\beta 3$  [Ylipaasto P. et al., 2010].

Для отдельных представителей рода *Enterovirus* (коксакивирусов В3 и А21) было экспериментально доказано двухэтапное взаимодействие с клеточными рецепторами при входе в клетку. На втором этапе, после взаимодействия со связывающим рецептором, коксакивирусы В3 взаимодействуют с дезинтегрирующим капсид коксакивирусным-аденовирусным рецептором – CAR [Carson S.D. et al., 2011], а коксакивирусы А21 – с дезинтегрирующим рецептором ICAM-1 (молекула межклеточной адгезии типа 1) [Shafren D.R. et al., 1997].

Mbida A.D. et al. (1992) был выделен и предварительно охарактеризован в качестве предполагаемого общего клеточного рецептора для эховирусов гликопротеин с молекулярной массой 44 кДа – gp44. Моноклональные антитела к gp44 защищали культуру клеток P2002 от инфицирования практически всеми типами эховирусов и коксакивирусом А9, однако дальнейших исследований gp44

не проводилось. Ward T. et al. (1998) обнаружили защитный эффект антител к бета-2-микроглобулину (B2M) при заражении культуры клеток RD широким спектром типов эховирусов и коксакивирусом A9, но защитный эффект этих антител не проявлялся на других культурах клеток. Кроме того, Ward T. et al. (1999) было показано, что добавление бычьего (BCA) или человеческого сывороточного альбумина в среду поддержания культуры клеток RD предотвращало её инфицирование эховирусом 7, подавляя образование А-частиц, но не препятствовало связыванию вируса с клетками. Авторами исследования было сделано предположение о блокирующем действии человеческого сывороточного альбумина на вторичный (по отношению к DAF) не идентифицированный клеточный рецептор. Таким образом, дезинтегрирующий капсид рецептор для эховирусов оставался не идентифицированным.

В экспериментах с ингибиторами ранних событий репродуктивного цикла эховируса 7 (BCA и антителами к CD59) было показано [Ward T. et al., 1999; Goodfellow I.G. et al., 2000], что различия в форме начального участка графика изменения инфекционной активности в одиночном цикле репродукции были информативны в отношении скорости дезинтеграции капсида и высвобождения РНК этого вируса. Однако, отсутствие математической модели наблюдавшихся различий затрудняло количественное описание кинетики дезинтеграции капсида с высвобождением РНК эховирусов при варьировании экспериментальных условий.

Анализ актуальности и степени разработанности темы исследования позволил сформулировать следующие цель и задачи диссертационной работы.

### **Цель исследования**

Установить особенности ранних этапов репродукции эховирусов с различной рецепторной специфичностью.

### **Задачи исследования**

1. Проверка гипотезы о роли неонатального рецептора Fc фрагмента иммуноглобулинов класса G человека (hFcRn) в качестве рецептора дезинтегрирующего белковый капсид эховирусов и коксакивируса A9.
2. Разработка математической модели, описывающей процессы входа эховирусов в клетку и сборки вирусных частиц в одиночном цикле репродукции эховирусов, и технического задания по реализации модели в виде программного обеспечения для ЭВМ.
3. Сравнительное изучение кинетики ранних этапов взаимодействия с клеткой эховирусов, использующих различные связывающие рецептры и типы эндоцитоза.

### **Научная новизна результатов**

1. Впервые определена функция hFcRn в качестве общего дезинтегрирующего рецептора для эховирусов и коксакивируса A9 при репродукции в культуре клеток RD.

2. Установлено, что в условиях неполного блокирования hFcRn с помощью альбумина и антител к hFcRn, длительность и выраженность защитного эффекта были меньше в отношении эховирусов, способных к связыванию с DAF, по сравнению с эховирусами, не взаимодействовавшими с DAF. Данное наблюдение подтверждает двухэтапную схему взаимодействия DAF-зависимых эховирусов с рецепторами при входе в клетку: сначала – со связывающим рецептором DAF, затем – с дезинтегрирующим капсид рецептором hFcRn.

3. Впервые разработана математическая модель, позволяющая количественно описывать изменение инфекционной активности энтеровирусов в одиночном цикле репродукции в культуре клеток с помощью двух логистических аппроксимирующих функций: убывающей функции – для процесса дезинтеграции капсида с высвобождением вирусной РНК и возрастающей функции – для процесса инкапсидации вирусной РНК.

4. Показано, что в культуре клеток RD механизм негативной селекции субтиповых вариантов эховирусов, не взаимодействующих с рецептором DAF, может быть обусловлен пониженной скоростью высвобождения и инкапсидации РНК по сравнению с DAF-зависимыми вариантами эховирусов.

5. Показано, что в культуре клеток Л-41 КД/84 механизм негативной селекции субтиповых DAF-зависимых вариантов эховирусов может быть обусловлен пониженным уровнем связывания таких вариантов с клетками, пониженной скоростью высвобождения и инкапсидации РНК по сравнению с вариантами эховирусов, не взаимодействующими с рецептором DAF.

6. Впервые показан избирательный эффект роданина в отношении субтиповых вариантов эховируса 11 в культуре клеток RD, проявлявшийся в зависимости от их рецепторной специфичности: снижение скорости дезинтеграции капсида с последующим высвобождением РНК наблюдалось у DAF-зависимого варианта эховируса 11 и не наблюдалось у варианта, не взаимодействовавшего с рецептором DAF.

7. Впервые показано, что общий механизм ингибирующего эффекта нистатина на репродукцию субтиповых вариантов эховируса 11 с различной рецепторной специфичностью не был связан с блокированием дезинтеграции капсида и высвобождения РНК, но проявлялся в задержке начала инкапсидации вирусной РНК и в снижении продуктивности инфекции.

8. Впервые выявлены различия эффектов нокодазола на репродукцию субтиповых вариантов эховируса 11 с различной рецепторной специфичностью, связанные с различной чувствительностью путей входа эховирусов в клетку к блокированию везикулярного транспорта, зависящего от микротрубочек.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

1. Идентификация hFcRn в качестве общего дезинтегрирующего рецептора для эховирусов и коксакивируса А9 открывает новые возможности для

изучения взаимосвязи экспрессии hFcRn в различных видах клеток и тканей человека с патогенезом заболеваний, вызываемых данными энтеровирусами.

2. Установление ключевой роли hFcRn в репродукции эховирусов позволяет использовать трансгенных мышей, экспрессирующих hFcRn, для исследований патогенеза эховирусных инфекций и доклинических испытаний противовирусных лекарственных средств.

3. Специфичность протективного действия альбумина и поликлональных антител к hFcRn в культуре клеток RD позволяет использовать эти реагенты для субвидовой классификации малоизученных и новых энтеровирусов.

4. Разработанная математическая модель и созданная на её основе компьютерная программа может быть использована как для фундаментальных исследований кинетических параметров репродукции энтеровирусов, так и для фармакологических исследований ингибиторов репродукции энтеровирусов в культурах клеток.

### **Методология и методы исследования**

Методология данной диссертационной работы основана на исследованиях кинетики процесса дезинтеграции капсида с высвобождением РНК эховирусов с разной рецепторной специфичностью, включая идентификацию общего дезинтегрирующего рецептора для эховирусов. Были применены вирусологические методы, молекулярно-биологические методы, метод математического моделирования и статистические методы обработки результатов.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Неонатальный рецептор Fc фрагмента иммуноглобулинов класса G человека (hFcRn) является общим дезинтегрирующим капсид рецептором для эховирусов и коксакивируса А9.

2. Изменения инфекционной активности эховирусов в одиночном цикле репродукции в культуре клеток статистически адекватно аппроксимируются двумя логистическими функциями: убывающей функцией – для процесса дезинтеграции капсида с высвобождением вирусной РНК и возрастающей функцией – для процесса инкапсидации вирусной РНК при сборке новых вирионов.

3. Субтипковые варианты эховируса 11, использующие различные связывающие клеточные рецепторы (DAF и hFcRn), характеризуются различной кинетикой высвобождения и инкапсидации вирусной РНК в культурах клеток RD и Л-41 КД/84, что объясняет механизм селекции субтипковых *daf+* и *daf-* вариантов эховирусов в данных культурах клеток.

4. Использование субтипковыми вариантами эховируса 11 различных связывающих клеточных рецепторов (DAF и hFcRn) и ассоциированных с ними путей входа эховирусов в клетки, обуславливает количественные различия эффектов химических ингибиторов (роданина – ингибитора дезинтеграции

капсида эховирусов; нистатина – ингибитора функции липидных плотов; и нокодазола – ингибитора полимеризации микротрубочек) на кинетику высвобождения и инкапсидации вирусной РНК.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Результаты работы представлены и обсуждены на следующих конференциях: Международная научно-практической конференция молодых ученых и студентов, IV форума медицинских и фармацевтических вузов России "За качественное образование" «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения» (г. Екатеринбург, 2019); VI Международная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов, вирусологов «OpenBio» (Наукоград Кольцово, 2019); Межрегиональная научно-практическая конференция с международным участием «Вирусные инфекции и общество: проблемные вопросы диагностики, лечения и профилактики» (г. Екатеринбург, 2018); X Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы» (г. Москва, 2018); V Международная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов, вирусологов «OpenBio» (Наукоград Кольцово, 2018); III Международная научно-практическая конференция молодых ученых и студентов, III форума медицинских и фармацевтических вузов России "За качественное образование" «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения» (г. Екатеринбург, 2018).

По материалам диссертации опубликовано 14 статей, из которых 6 опубликованы в журналах списка, рекомендованного ВАК Минобрнауки и науки РФ.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы и двух приложений. Работа изложена на 147 страницах, включает 24 рисунка, 15 таблиц. Список литературы включает 143 источника.

### **Личный вклад автора**

Обзор литературы, планирование экспериментов, выполнение вирусологических, молекулярно-биологических и молекулярно-генетических исследований (при типировании использованных в диссертационной работе штаммов энтеровирусов), статистическая обработка результатов исследований, анализ полученных данных были проведены лично автором под руководством к.м.н. Резайкина А.В. и научного консультанта к.м.н. Новосёлова А.В.

Помимо автора в создании программного обеспечения «Single Cycle Reproduction Parameters» («SCRП»), участвовали к.м.н. Новоселов А.В., к.м.н. Резайкин А.В. и Хозов А.В.



## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

**Культуры клеток.** Перевиваемая линия клеток рабдомиосаркомы человека RD была получена из ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области» Роспотребнадзора. Культура клеток почки собаки MDCK получена из ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Минздрава России. Перевиваемая клеточная культура Л-41 КД/84 (дериват линии J-96, выделенной из клеток крови больного острым моноцитарным лейкозом), получена из банка-музея клеточных культур "Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций" («ЕНИИВИ») ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

**Вирусы.** Штаммы и клоны энтеровирусов вида В, использованные в работе, представлены в таблице 1.

Таблица 1

Типы, штаммы и клоны энтеровирусов, использованные в экспериментах.

Тип энтеровируса (номенклатура и аббревиатура ICTV)	Номер штамма (клона)	Daf фенотип	Идентификатор нуклеотидной последовательности в GenBank (Accession number)
echovirus 3 (E3)	206	Daf+	MK962649, MK962655
echovirus 9 (E9)	8100	Daf-	MK962651, MK962657
echovirus 11 (E11)	(431-1)	Daf+	JF925116
	(431-6)	Daf-	JF925117
echovirus 30 (E30)	7500	Daf-	MK962648, MK962654
coxsackievirus A9 (CVA9)	3000	Daf-	MK962650, MK962656
coxsackievirus B4 (CVB4)	1000	Daf-	MK962653, MK962659
coxsackievirus B5 (CVB5)	3122	Daf-	MK962652, MK962658

Клонированные субтипные варианты 431-1 и 431-6 эховируса 11 типа (E11) были получены и охарактеризованы ранее [Novoselov A.V. et al., 2012]. Все остальные штаммы, перечисленные в таблице 1, были выделены и очищены на культуре клеток RD из ликвора больных энтеровирусным менингитом в «ЕНИИВИ» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Генотипирование изолятов проводилось по двум фрагментам структурной части генома энтеровирусов, кодирующим капсидные белки VP1 и VP4-VP2, в соответствии с описанными ранее методиками [Arola A. et al., 1996; Palacios G. et al., 2001] и патентом на изобретение RU 2701145 C1 [Резайкин А.В. и др., 2019].

**Антитела.** 1) Кроличьи поликлональные антитела (пАТ) класса IgG к гетеродимеру человеческого FCGR1 (альфа-цепь hFcRn) с B2M, (Sino Biological, КНР, кат.№ СТ009-T08). 2) Ослиные поликлональные анти-кроличьи IgG антитела, конъюгированные с Alexa Fluor®647 (Abcam, Великобритания, кат.№ ab150075).

**Ингибиторы репродукции экзовирусов.** Использовались реактивы производства «Merck/Sigma-Aldrich» (Германия/США): 1) Человеческий сывороточный альбумин, очищенный от глобулинов (кат.№ А8763) (*HSA-GF*); 2) Человеческий сывороточный альбумин, очищенный от глобулинов и жирных кислот (кат.№ А3782) (*HSA-FF*); 3) Роданин (кат.№ 118192-25G); 4) Нистатин (кат.№ N6261); 5) Нокодазол (кат.№ M1404).

**Культивирование клеток.** Клетки выращивали в культуральных пластиковых флаконах (Corning, США, кат.№ REF3598), в 96-луночных (Corning, США, кат.№ 30048) и в 48-луночных (Corning, США, кат.№ 430639) планшетах при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> до образования плотного монослоя. Для клеток RD в качестве ростовой среды использовали среду Игла МЕМ (ПанЭко, РФ), для клеток MDCK и Л41 КД/84 – среду DMEM/F-12 (ПанЭко, РФ). В среды роста добавляли 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Biosera, Франция). В качестве среды поддержания использовали среду 199 (ПанЭко, РФ).

**Определение инфекционного титра** вирусосодержащих жидкостей (ВСЖ) проводилось методом конечных разведений на культурах клеток RD в 96-луночных планшетах. Для расчета титра применялась формула Спирмена-Кербера [Husson-van Vliet J. and Roussel Ph., 1988].

**Гемагглютинирующую активность** ВСЖ определяли микрометодом в 96-луночных планшетах с U-образным дном (Медполимер, РФ) по ранее описанной методике [Новоселов А.В., 1994].

**Непрямая иммунофлуоресцентная микроскопия.** Клетки RD и MDCK, выращенные в 48-луночных планшетах, фиксировали охлаждённым до –20°C ацетоном 30 мин при 4°C и пермеабелизовали 15 минут при 22°C в ФСБ (ПанЭко, РФ) с добавлением 0,5% Triton X-100 (Merck/Sigma-Aldrich, кат.№ T8787) и 1% БСА (Merck/Sigma-Aldrich, кат.№ 05470) в конечной концентрации. Затем клетки отмывали 3 раза ФСБ с 0,5% БСА и инкубировали в течение 18 часов при 4°C с первичными пАТ СТ009-T08 или мАТ СТ009-R110 в конечной концентрации 10 мкг/мл. По окончании инкубации клетки отмывали 3 раза ФСБ с 0,5% БСА и инкубировали 1 час при 22°C без доступа света со вторичными антителами ab150075 в конечной концентрации 2 мкг/мл. Клетки RD, обработанные только антителами ab150075, использовали для контроля фоновой флуоресценции. Клетки MDCK использовали в качестве негативного контроля отсутствия целевого антигена – hFcRn.

**Исследование вирус-инактивирующего действия растворов человеческого сывороточного альбумина.** К 100 мкл ВСЖ, содержащей 200 ТЦД<sub>50</sub> соответствующего вируса, добавляли 100 мкл 8% (вес/объем) раствора альбумина HSA-GF или HSA-FF в среде 199, перемешивали на вортексе и инкубировали 60 минут при 37°C. К контрольным пробам ВСЖ добавляли 100 мкл среды 199 без альбумина. После инкубации определяли остаточную инфекционную активность ВСЖ методом конечных разведений на клетках RD.

**Исследование протективного эффекта альбумина.** Использовали одинаковые заражающие дозы вирусов (100 ТЦД<sub>50</sub> на лунку 96-луночного планшета) и различные концентрации альбумина HSA-GF (4%, 2%, 1%, 0,5% и

0,25%). Клеточный монослой однократно промывали средой 199 и вносили в лунки по 100 мкл среды 199 с различными концентрациями HSA-GF. Через 60 минут инкубации при 37°C, вносили в лунки по 100 мкл ВСЖ, содержащей 100 ТЦД<sub>50</sub> соответствующего вируса. В контрольных лунках учитывали цитопатический эффект (ЦПЭ) вирусов, состояние клеточного монослоя без альбумина и с альбумином. Каждую концентрацию HSA-GF исследовали в 8 репликах в двух повторах эксперимента с каждым вирусом. ЦПЭ ежедневно оценивали с помощью инвертированного микроскопа, окончательный учет проводили на 5-е сутки. ЦПЭ оценивали по доле клеток в монослое с характерными для эховирусов признаками цитопатологии по условной 4-плюсовой шкале: “-” (0%); “1+” (<25%); “2+” (25% до <50%), “3+” (50% до <75%) и “4+” (75% до 100%). Затем вычисляли средние величины со стандартными отклонениями и обрабатывали статистическими методами.

**Исследование протективного эффекта пАТ к hFcRn.** Эксперименты с пАТ СТ009-Т08 к hFcRn были выполнены на культуре клеток RD в 96-луночных планшетах. Использовали одинаковые заражающие дозы вирусов (100 ТЦД<sub>50</sub> на лунку) и различные концентрации антител в среде 199 (10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,6 и 0,3 мкг/мл). Клеточный монослой однократно промывали средой 199, вносили в лунки по 50 мкл среды 199 с различными концентрациями антител и инкубировали 1 час при 37°C. Затем в каждую лунку с раствором антител вносили по 50 мкл ВСЖ, содержащей 100 ТЦД<sub>50</sub> соответствующего вируса. В контрольных лунках учитывали ЦПЭ вируса, отсутствие цитотоксичности антител и состояние клеточного монослоя. Каждую концентрацию антител тестировали в 8 репликах с каждым вирусом в двух независимых экспериментах. Учет ЦПЭ проводили как при исследовании протективного эффекта альбумина. Контроль отсутствия неспецифического вируснейтрализующего действия пАТ (10,0 мкг/мл) проводили по схеме эксперимента, аналогичной исследованию вирус-инактивирующего действия альбумина.

**Исследование кинетики инфекционной активности эховируса 11 в одиночном цикле репродукции (ОЦР) на чувствительных клетках.** Монослойные культуры клеток RD и Л-41 КД/84 выращивали в культуральных флаконах с площадью 25 см<sup>2</sup>. Для синхронизации начала инфекционного цикла, после замены среды роста на среду 199, клетки охлаждали 20 минут при температуре 4°C. Затем удаляли среду из флаконов и вносили по 400 мкл ВСЖ из расчета множественности заражения 10 БОЕ на клетку. Флаконы инкубировали на платформе покачивателя при 4°C 45 минут, затем тщательно удаляли инокулят и отмывали монослой от несвязавшегося вируса 3 раза по 15 мл охлажденной до 4°C средой 199. Вносили в каждый флакон по 5 мл среды 199 комнатной температуры и помещали в термостат при 37°C. Через 0, 30, 60, 120, 180, 210, 240, 300 и 420 минут инфекционный цикл останавливали, замораживая флаконы при -70°C. После трёхкратного замораживания и оттаивания флаконов с клетками и вирусом, перед определением инфекционной активности для солюбилизации белков и липидов к 315 мкл ВСЖ в пробирке добавляли 35 мкл 4% (объем/объем) Tween 80 (Merck/Sigma-Aldrich, кат.№ P1754). Пробирки встряхивали на вортексе

и помещали на 30 минут в шейкер с частотой вращения 60 об/мин, затем центрифугировали 10 минут при 3000g. Супернатант разводили средой 199 до конечной концентрации детергента 0,004%. В предварительных экспериментах данная концентрация Tween 80 была определена как нетоксичная для культуры клеток RD при наблюдении в течение 5 суток.

**Изучение влияния ингибиторов репродукции эховируса 11 на кинетику инфекционной активности в ОЦР в культуре клеток RD.** Исследуемые ингибиторы (роданин, нистатин, нокодазол) присутствовали в среде поддержания и в ВСЖ в максимальной нетоксичной концентрации на всех этапах эксперимента. Отсутствие цитотоксического действия различных концентраций ингибиторов определяли в предварительных экспериментах по оценке жизнеспособности клеток методом прижизненного окрашивания трипановым синим через 72 часа инкубации [Фрешни Р.Я., 2018]. Роданин растворяли в среде 199 и использовали в конечной концентрации 100 мкг/мл. Нистатин растворяли до концентрации 5 мг/мл в 99% ДМСО и использовали в конечной концентрации 25 мкг/мл. Нокодазол растворяли при нагревании в 99% ДМСО до концентрации 10 мг/мл и использовали в конечной концентрации 1,8 мкг/мл.

**Статистические методы обработки результатов.** Суммарную аналитическую погрешность определения инфекционного титра ВСЖ рассчитывали по методике [Husson-van Vliet J. and Roussel Ph., 1988]. Статистически достоверные различия между экспериментальными группами определяли методами дисперсионного анализа ANOVA [Wulff N.H. et al., 2012] или с помощью непараметрического U теста Манна-Уитни [Fay M.P et al., 2018]. Различия считали статистически значимыми при величинах  $p < 0,05$ .

**Разработка математической модели, описывающей кинетику дезинтеграции капсида с высвобождением РНК и инкапсидации РНК эховирусов в ОЦР.** Для количественного описания процессов дезинтеграции капсида с высвобождением РНК и инкапсидации РНК эховирусов была разработана математическая модель, позволяющая аппроксимировать экспериментальный график изменения инфекционной активности в ОЦР суммой двух логистических (*S*-образных) функций, сумма значений которых приближалась бы к экспериментальным данным. Основными этапами разработки модели в рамках диссертационной работы являлись: 1) разработка математической модели; 2) математическая постановка задачи моделирования; 3) тестирование реализованной математической модели в виде программы для ЭВМ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Установление роли человеческого неонатального рецептора Fc фрагмента иммуноглобулинов класса G (hFcRn) в качестве общего дезинтегрирующего капсид рецептора для эховирусов и коксакивируса A9**

Учитывая физиологическую функцию hFcRn в качестве рецептора альбумина, наличие В2М в составе гетеродимера hFcRn, сходство молекулярной массы FCGRT (альфа-цепи hFcRn) и gp44, а также протективный эффект МАТ к

gp44 при заражении культуры клеток человека P2002 практически всеми типами эховирусов и CVA9, первой задачей диссертационной работы была проверка гипотезы о роли hFcRn в качестве общего рецептора, дезинтегрирующего капсид эховирусов.

В экспериментах с предварительной инкубацией вариантов E11 с препаратами альбумина было показано отсутствие вирус-инактивирующего действия HSA-GF (Таблица 2).

Таблица 2

Исследование инактивирующего действия препаратов человеческого сывороточного альбумина (HSA-GF и HSA-FF) в отношении вариантов E11 с разной рецепторной специфичностью

Клоны эховируса E11 ( <i>daf</i> генотип)	Инфекционная активность $lg(TЦД_{50})/мл$ ( $M \pm s$ ) <sup>1</sup>		
	Инкубация с 4% раствором HSA-GF	Инкубация с 4% раствором HSA-FF	Инкубация без альбумина
431-1 ( <i>daf</i> +)	2,7±0,24	0±0,0	2,7±0,21
431-6 ( <i>daf</i> -)	2,8±0,23	0±0,0	2,6±0,23

Примечание:

<sup>1</sup> M – средняя величина инфекционной активности; s – стандартная ошибка средней величины

Для подтверждения экспрессии hFcRn в культуре клеток RD и проверки функциональной активности антител к hFcRn, была использована непрямая иммунофлуоресцентная микроскопия с первичными пАТ к hFcRn и вторичными анти-IgG антителами, конъюгированными с флуорохромом.

Предварительная инкубация субтиповых вариантов E11 с первичными антителами к hFcRn перед заражением клеток показала отсутствие неспецифического вируснейтрализующего действия пАТ (таблица 3).

Таблица 3

Отсутствие вируснейтрализующего действия антител к hFcRn на *daf*+ и *daf*- клоны E11 с разной рецепторной специфичностью

Клоны вируса E11 ( <i>daf</i> генотип)	Инфекционная активность $lg(TЦД_{50})/мл$ ( $M \pm s$ ) <sup>1</sup>	
	Инкубация с пАТ к hFcRn (10 мкг/мл)	Инкубация без антител (контроль)
431-1 ( <i>daf</i> +)	6,9±0,21	6,8±0,24
431-6 ( <i>daf</i> -)	6,7±0,24	6,6±0,21

Примечание:

<sup>1</sup> M – средняя величина инфекционной активности; s – стандартная ошибка средней величины

Для подтверждения избирательности блокирующего действия HSA-GF по отношению к hFcRn, культуры клеток RD заражали CVB5, использующим дезинтегрирующий капсид рецептор CAR, с которым эховирусы не взаимодействуют [Renois F. et al., 2011]. Выраженность протективного эффекта

HSA-GF в зависимости от концентрации, времени после заражения (p.i.) культур клеток RD одинаковой инфицирующей дозой E3, E9, E11 (*daf*<sup>+</sup> и *daf*<sup>-</sup> клон), CVA9 и CVB5 показана на рисунке 1.

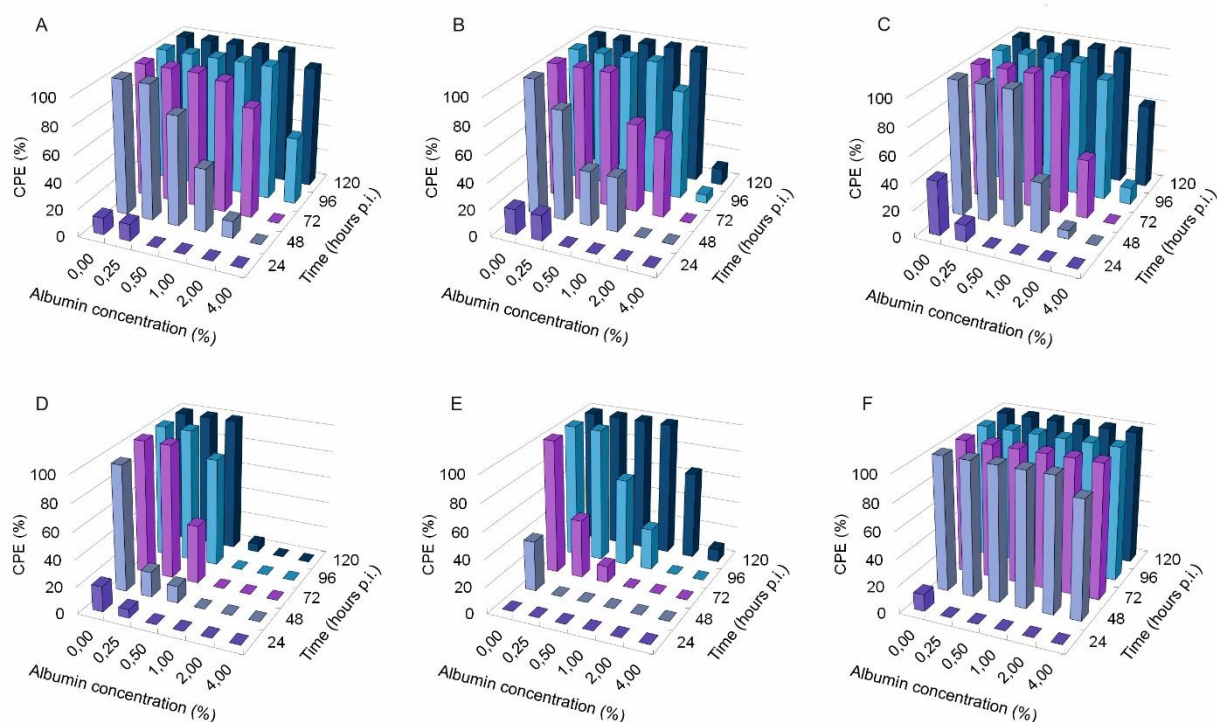


Рисунок 1. Зависимость протективного эффекта препарата альбумина HSA-GF от концентрации и времени после заражения культур клеток RD одинаковой инфицирующей дозой (100 ТЦД<sub>50</sub>) энтеровирусов вида В.

(А) Клон 431-1 E11. (В) Клон 431-6 E11. (С) Штамм 206 E3. (D) Штамм 8100 E9. (E) Штамм 3000 CVA9. (F) Штамм 3122 CVB5.

Примечание: По оси 0X указаны концентрации альбумина (HSA-GF) в процентах (вес/объём). По оси 0Y указаны средние величины ЦПЭ в процентах. По оси 0Z указано время учета ЦПЭ в часах после заражения клеток (hours p.i.).

Штамм CVB5 (Рис. 1F) демонстрировал развитие 100% ЦПЭ при всех концентрациях HSA-GF вплоть до 2%. При концентрации 4% HSA-GF снижение ЦПЭ не достигало статистически достоверного отличия от контрольных лунок без альбумина. При попарном сравнении, был выявлен более выраженный протективный эффект HSA-GF в отношении *daf*<sup>-</sup> клона 431-1 E11 и *Daf*<sup>-</sup> штамма E9, по сравнению с менее выраженным протективным эффектом HSA-GF в отношении *daf*<sup>+</sup> клона 431-6 E11 и *Daf*<sup>+</sup> штамма E3.

Зависимость протективного эффекта ПАТ к hFcRn от концентрации и времени после заражения культур клеток RD вирусами E3, E9, E11 (*daf*<sup>+</sup> и *daf*<sup>-</sup> клон), E30, CVA9, CVB4 и CVB5 показана на рисунке 2.

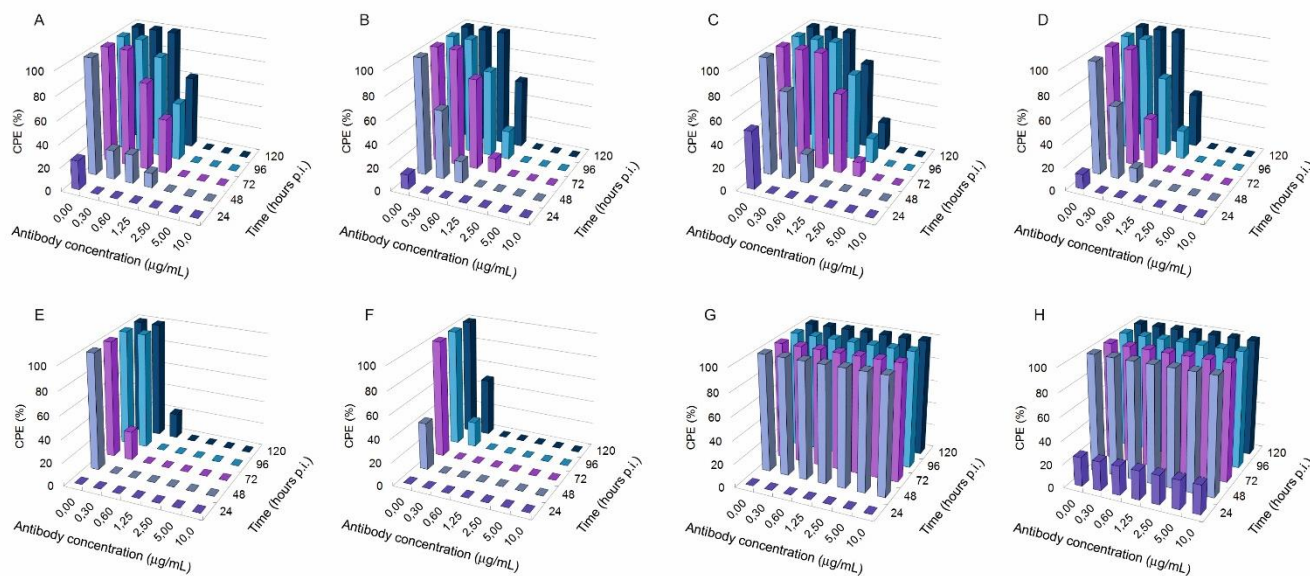


Рисунок 2. Зависимость протективного эффекта пАТ к hFcRn от концентрации и времени после заражения культур клеток RD одинаковой инфицирующей дозой (100 ТЦД<sub>50</sub>) энтеровирусов вида В.

(А) Клон 431-1 E11. (В) Клон 431-6 E11. (С) Штамм 206 E3. (D) Штамм 8100 E9. (Е) Штамм 7500 E30. (F) Штамм 3000 CVA9. (G) Штамм 1000 CVB4. (H) Штамм 3122 CVB5.

Примечание: По оси OX указаны концентрации пАТ к hFcRn (мкг/мл). По оси OY указаны средние величины ЦПЭ в процентах. По оси OZ указано время учета ЦПЭ в часах после заражения клеток (hours p.i.).

Все использованные концентрации пАТ к hFcRn не проявляли защитного эффекта при заражении культур клеток RD вирусами CVB4 (Рис. 2 G) и CVB5 (Рис. 2 H), использующими депротенинирующий рецептор CAR. Более выраженная протективная активность пАТ к FcRn наблюдалась при использовании штаммов E9 и E30, не взаимодействовавших с DAF, в отличие от Daf<sup>+</sup> штамма вируса E3.

Спектр протективной активности HSA-GF и пАТ к hFcRn соответствовал спектру протективной активности описанных ранее МАТ к gp44 [Mbida A.D et al., 1992]. Поскольку МАТ к gp44 ингибировали репродукцию практически всех типов эховирусов, а gp44 идентичен FCGRT (альфа-цепи hFcRn), то полученные нами результаты можно было экстраполировать на всю группу эховирусов.

Отличительной функцией дезинтегрирующих капсид рецепторов энтеровирусов является их способность трансформировать полные вирионы в А-частицы в результате взаимодействия с поверхностью вирионов в области каньона. Объединение доказательств прямого взаимодействия рекомбинантной молекулы rFcRn-B2M с вирионами E11 [Morosky S. et al., 2019], приводившего к снижению их инфекционной активности, с данными о снижении продукции А-частиц и блокировании процесса дезинтеграции капсида с высвобождением РНК E11 в культуре клеток RD с помощью МАТ к B2M [Chevaliez S. et al., 2008; Novoselov A.V. et al., 2012], с результатами исследований [Rezaikin A.V. et al., 2009; Novoselov A.V. et al., 2012] по картированию сайта связывания

альтернативного по отношению к DAF клеточного рецептора на поверхности вириона E11 в области каньона, позволило сделать вывод о роли hFcRn в качестве каньон-связывающего дезинтегрирующего капсид рецептора для вируса E11 в культуре клеток RD.

Обнаружение защитного эффекта HSA-GF и антител к hFcRn при заражении клеток RD CVA9, в совокупности с известными данными [Mbida A.D et al, 1992; Heikkila O. et al., 2010], подтвердило роль hFcRn в качестве дезинтегрирующего капсид рецептора для CVA9.

### **Разработка математической модели, описывающей изменения инфекционной активности эховирусов в экспериментах с одиночным циклом репродукции**

В ОЦР энтеровирусов различают две последовательные фазы: *фаза эклипса* и *фаза созревания* [Flint S.J. et al., 2015]. В фазе эклипса происходит более или менее выраженное снижение инфекционной активности в экспериментальной системе как за счёт событий конверсии полных вирионов в А-частицы (инфекционная активность А-частиц значительно ниже, чем полных вирионов), так и за счёт последующих событий высвобождения вирусной геномной РНК из А-частиц с образованием пустых капсидов.

**Задачей** математической модели являлся подбор двух логистических (S-образных) функций, сумма значений которых приближалась бы к экспериментальным данным. Убывающая логистическая функция соответствовала процессу снижения инфекционной активности в фазе эклипса за счёт дезинтеграции капсида исходных (родительских) вирионов. Возрастающая логистическая функция соответствовала процессу сборки новых вирионов (потомства). Абстрактный график изменения инфекционной активности энтеровирусов в экспериментах с ОЦР в культуре клеток и две логистические функции показаны на рисунке 3.

Математическая модель обеспечивает расчёт значений следующих **параметров репродукции** эховирусов в ОЦР:

*Tlag* – длительность возможной задержки во времени (может отсутствовать) до начала явного убывания инфекционной активности. Рассчитывается по убывающей функции.

*Tmin* – момент времени, когда итоговая (общая) расчетная функция достигает минимального значения *Imin*. Рассчитывается по итоговой функции.

*Vu* – средняя скорость дезинтеграции капсида исходных вирионов. Рассчитывается по убывающей функции на интервале от *Tlag* (или от *T<sub>0</sub>* при отсутствии *Tlag*) до *Tmin*. Если убывающий участок на графике отсутствует, то *Vu* не рассчитывается.

*Tover* – момент времени начала явного роста инфекционной активности. Рассчитывается по возрастающей функции как превышение фонового уровня инфекционной активности (*Ibg*) на заданную относительную величину.



$V_a$  – средняя скорость инкапсидации вирусной РНК при сборке новых вирионов. Рассчитывается по возрастающей функции на интервале явного роста от  $T_{over}$  до  $T_{max}$ .

$T_{max}$  – момент времени, когда достигается максимальная инфекционная активность за период наблюдения. Рассчитывается по возрастающей функции.

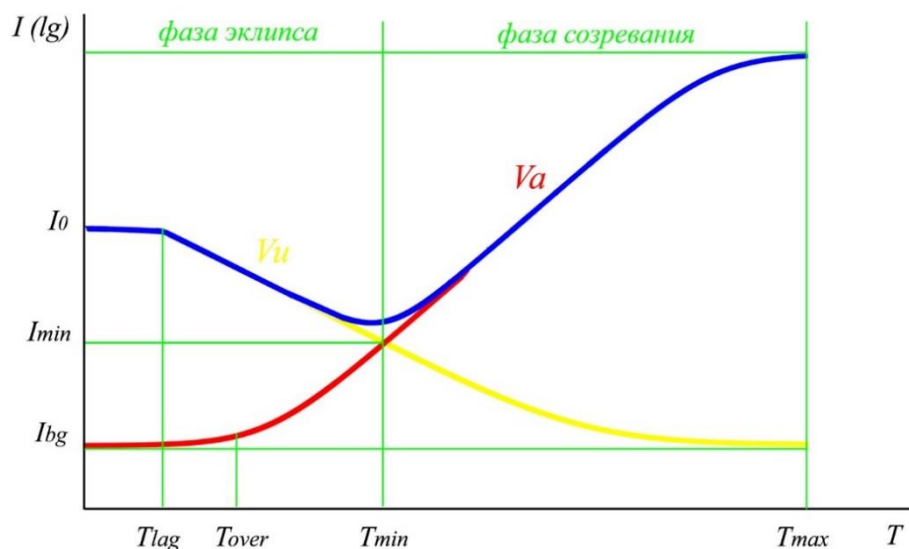


Рисунок 3. Абстрактный график изменения инфекционной активности энтеровирусов в экспериментах с одиночным циклом репродукции в культуре клеток. Экспериментальный график показан синим цветом; кривая снижения инфекционной активности исходных (родительских) вирусов показана желтым цветом; кривая роста инфекционной активности новых вирусов (потомства) показана красным цветом.

### Постановка задачи математического моделирования.

Математическая задача состояла в том, чтобы аппроксимировать набор точек суммой двух логистических функций. Общий вид уравнения логистической функции имеет следующий вид:

$$f(x) = \frac{K \cdot P \cdot e^{rx}}{K + P \cdot (e^{rx} - 1)}, \quad (1)$$

где  $K$  – это максимальное значение, к которому стремится значение функции при  $x$ , стремящемся к бесконечности,  $P$  – значение функции в точке 0,  $r$  – параметр, характеризующий наклон функции на участке роста (при  $r < 0$ , функция будет убывающей).

В рамках решаемой задачи можно рассматривать данную функцию, как функцию от четырех переменных:  $f(K, P, r, x)$ . Так как итоговая функция представляет собой сумму возрастающей и убывающей логистических функций, то итоговую функцию можно представить следующим образом:

$$F_{total} = f(K_a, P_a, r_a, x) + f(K_d, P_d, r_d, x), \quad (2)$$

где  $F_{total}$  – итоговая функция, значение которой приближается к экспериментальным данным в момент времени  $x$ ;  $f(K_a, P_a, r_a, x)$  – значение возрастающей функции в момент времени  $x$ ;  $f(K_d, P_d, r_d, x)$  – значение убывающей функции в момент времени  $x$ . Получаем итоговую функцию с шестью параметрами:  $K_a, P_a, r_a, K_d, P_d, r_d$ .

График логистической функции можно условно разделить на три части: левое плато, участок роста (или убывания), правое плато. В программной реализации модели использовалось модифицированное уравнение логистической функции:

$$f(x) = \frac{K \cdot e^{L/d \cdot (x-s-d/2)}}{1 + e^{L/d \cdot (x-s-d/2)}}, \quad (3)$$

где коэффициент  $s$  определяет начало участка роста (или убывания),  $d$  - длину участка роста (убывания),  $K$  - максимальное значение, к которому стремится значение функции на бесконечности. Значение параметра  $L$  является постоянным. Для данной задачи он был выбран таким, чтобы на участке явного роста (убывания) функция изменялась от  $0,05 \cdot K$  до  $0,95 \cdot K$ .

Для поиска коэффициентов итоговой функции в модели используется метод *роя частиц* (particle swarm optimization) [Kennedy J. et al., 2001]. Качество аппроксимации оценивалось по значению коэффициента расхождения Г. Тейла (Henri Theil), приемлемая величина которого в биомедицинских исследованиях не должна превышать 5% [Лисицын Е.Н. и др., 1987].

#### **Итоги работ по созданию математической модели.**

1. Разработана математическая модель объекта моделирования – процесса изменения инфекционной активности эховирусов в экспериментах с одиночным циклом репродукции в культуре клеток. Определены расчетные кинетические параметры модели и их интерпретация с учетом биологических событий в цикле репродукции энтеровирусов.

2. Выполнена математическая постановка задачи моделирования. Определены параметры уравнения модифицированной логистической функции для модели. Выбрана оптимизация приближения теоретической функции к экспериментальной кривой численным методом роя частиц с расчетом коэффициента расхождения Тейла.

3. Сформулированы требования к пользовательскому интерфейсу компьютерной программы, реализующей математическую модель, и проведено тестирование программы в процессе её разработки.

4. Проведена государственная регистрация программы для ЭВМ в Федеральной службе интеллектуальной собственности: номер регистрации (свидетельства) – 2020660270.

#### **Кинетические особенности одиночного цикла репродукции клонированных субтиповых вариантов эховируса E11 с различной рецепторной специфичностью**

Идентификация общего дезинтегрирующего капсид рецептора для эховирусов и создание математической модели для количественного описания фазы эклипса и фазы созревания эховирусов в ОЦР, позволили перейти к изучению особенностей входа в клетки эховирусов с различной рецепторной специфичностью.

Использование клеточных культур RD и Л-41 КД/84 с различными селективными свойствами в отношении субтиповых вариантов E11 с отличающимся Daf-фенотипом [Новоселов А.В., 1994], а также клонированных

*daf+* и *daf-* вариантов E11 с известной рецепторной специфичностью, обеспечило возможность сравнения кинетических параметров различных путей входа вариантов E11 в двух культурах клеток. Значения расчетных параметров модели по результатам ОЦР *daf+* и *daf-* клона E11 в культурах клеток RD и Л41 КД/84 представлены в таблице 4. Графики аппроксимирующих функций представлены на рисунке 4А и 4В.

Таблица 4

Расчетные параметры моделей ОЦР для *daf+* клона 431-1 и *daf-* клона 431-6 эховируса 11 в культуре клеток RD и Л-41 КД/84

Культура клеток	Клоны	Параметры модели					
		<i>T<sub>min</sub></i>	<i>V<sub>u</sub></i>	<i>T<sub>over</sub></i>	<i>V<sub>a</sub></i>	<i>T<sub>max</sub></i>	Кэфф. Тейла
		Единицы измерения					
		мин	(ТЦД <sub>50</sub> /мл) / мин	мин	(ТЦД <sub>50</sub> /мл) / мин	мин	%
RD	Клон 431-1 ( <i>daf+</i> )	100	$3,116 \times 10^4$ (0-202) <sup>(1)</sup>	11,619	$3,237 \times 10^6$ (12-305) <sup>(1)</sup>	305,015	2,231
	Клон 431-6 ( <i>daf-</i> )	119	$9,467 \times 10^3$ (0-420) <sup>(1)</sup>	0	$2,503 \times 10^6$ (0-308) <sup>(1)</sup>	379,516	1,351
Л41 КД/84	Клон 431-1 ( <i>daf+</i> )	100	3,408 (0-420) <sup>(1)</sup>	87,318	$6,392 \times 10^5$ (87-420) <sup>(1)</sup>	420,000	2,617
	Клон 431-6 ( <i>daf-</i> )	217	$4,571 \times 10^3$ (0-420) <sup>(1)</sup>	160,346	$2,287 \times 10^6$ (160-326) <sup>(1)</sup>	325,728	0,812

Примечание:

<sup>1</sup> Расчётный временной интервал процесса (минуты от начала ОЦР).

В культуре клеток RD средняя скорость дезинтеграции капсида у *daf+* клона 431-1 была в 3,2 раза выше, чем у *daf-* клона 431-6, что указывало на более высокую пропускную способность пути входа в клетки, используемого DAF-зависимым вариантом E11. Таким образом, в клетках RD более высокой пропускной способностью характеризовался путь входа в клетки, инициируемый рецептором DAF. Скорость инкапсидации РНК у *daf+* клона 431-1 была в 1,2 раза выше и время достижения максимальной расчётной инфекционной активности за период наблюдения было в 1,25 раза короче, чем у *daf-* клона 431-6.

В культуре клеток Л-41 КД/84 средняя скорость дезинтеграции капсида *daf+* клона 431-1 была в 1341 раз ниже, чем у *daf-* клона 431-6, что указывало на низкую пропускную способность пути входа в клетки Л-41 КД/84, используемого DAF-зависимым клоном, а относительно низкий уровень инфекционной активности в начале ОЦР указывал на низкий уровень экспрессии DAF на клетках Л-41 КД/84 в условиях эксперимента. Таким образом, в клетках Л-41 КД/84 более высокой пропускной способностью характеризовался путь входа в клетки, инициируемый рецептором hFcRn. Скорость инкапсидации РНК у *daf-* клона 431-6 была в клетках Л-41 КД/84 в 3,6 раза выше, чем у *daf+* клона 431-1, что позволило *daf-* клону достичь максимальной расчётной инфекционной активности за период наблюдения раньше, чем *daf+* клону.

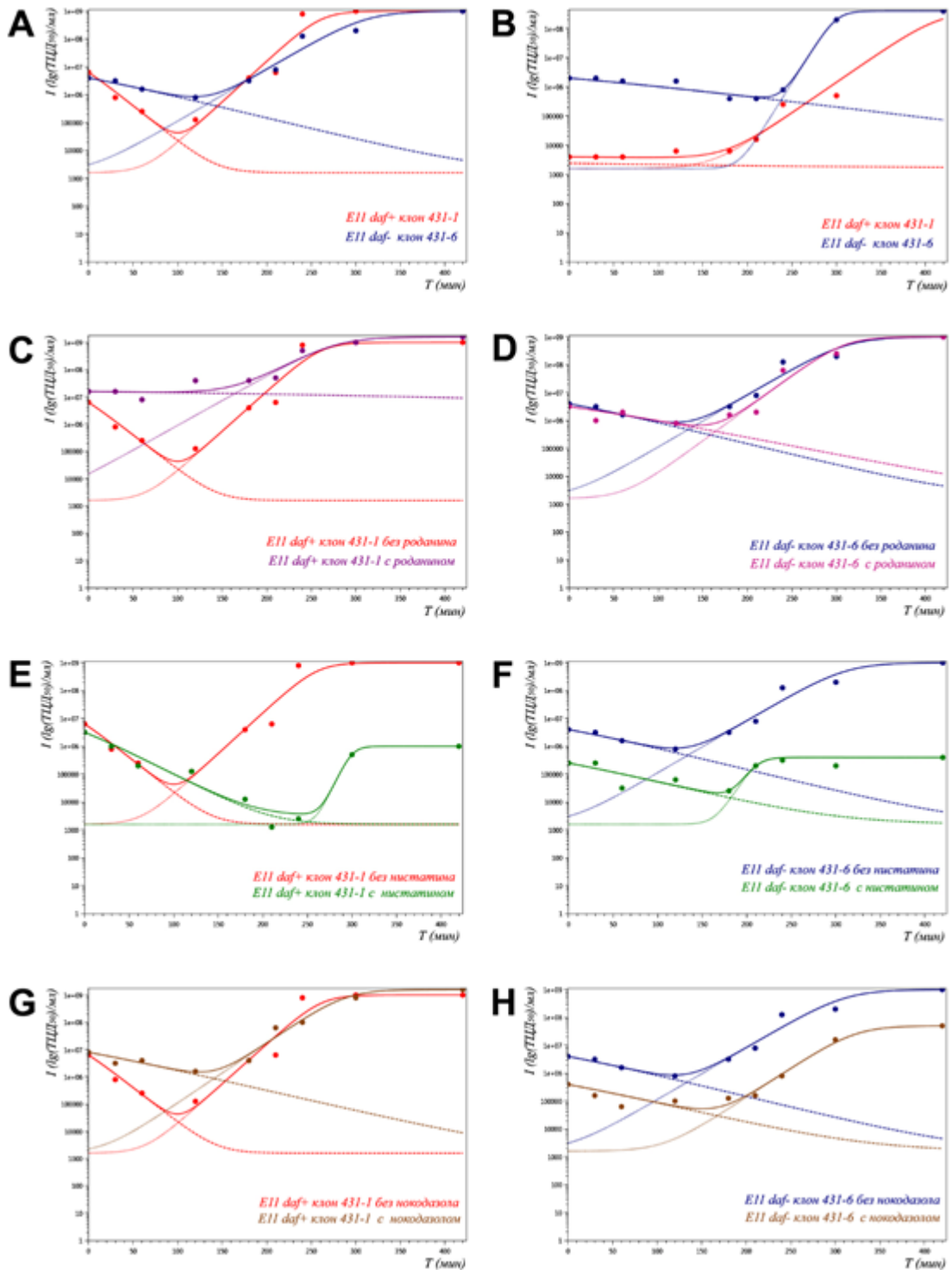


Рисунок 4. Моделирование изменений инфекционной активности в ОЦР для *daf*<sup>+</sup> клона 431-1 и *daf*<sup>-</sup> клона 431-6 E11. (А) Оба клона в культуре клеток RD. (В) Оба клона в культуре клеток Л-41 КД/84. (С) Клон 431-1 в культуре клеток RD с роданином и без него. (D) Клон 431-6 в культуре клеток RD с роданином и без него. (Е) Клон 431-1 в культуре клеток RD с нистатином и без него. (F) Клон 431-6 в культуре клеток RD с нистатином и без него. (G) Клон 431-1 в культуре клеток RD с нокодазолом и без него. (H) Клон 431-6 в культуре клеток RD с нокодазолом и без него.

Примечание: По оси  $Ox$  – время в минутах; по оси  $Oy$  – инфекционная активность в  $lg(TCD_{50})/мл$ . Сплошные линии – итоговые функции; штриховые линии – убывающие функции (дезинтеграция капсида с высвобождением РНК); пунктирные линии – возрастающие функции (инкапсидация РНК).

## Влияние химических ингибиторов репродукции эховирусов на кинетические параметры одиночного цикла репродукции *daf+* и *daf-* клонов эховируса 11 в культуре клеток RD

Для проверки возможности применения разработанной математической модели в исследованиях влияния химических ингибиторов репродукции эховирусов на параметры ОЦР, в частности – на скорость дезинтеграции капсида с высвобождением РНК, были проведены эксперименты с использованием роданина, нистатина и нокодазола. Расчетные параметры моделей для ОЦР *daf+* клона 431-1 и *daf-* клона 431-6 E11 в культуре клеток RD в присутствии ингибиторов и без них представлены в таблице 5. Графики аппроксимирующих функций представлены на рисунке 4 (С, D, E, F, G, H).

Таблица 5  
Результаты определения инфекционной активности в экспериментах с ОЦР *daf+* клона 431-1 и *daf-* клона 431-6 эховируса 11 в культуре клеток RD в присутствии ингибиторов и без них

Клоны	Ингибиторы	Параметры модели					
		<i>T<sub>min</sub></i>	<i>V<sub>u</sub></i>	<i>T<sub>over</sub></i>	<i>V<sub>a</sub></i>	<i>T<sub>max</sub></i>	Кэфф. Тейла
		Единицы изменения					
		мин	(ТЦД <sub>50</sub> /мл)/мин	мин	(ТЦД <sub>50</sub> /мл)/мин	мин	%
431-1	без роданина	100	$3,116 \times 10^4$ (0-202) <sup>1</sup>	11,61	$3,237 \times 10^6$ (12-305) <sup>1</sup>	305,01	2,231
	с роданином	79	$1,602 \times 10^4$ (0-420) <sup>1</sup>	0	$4,328 \times 10^6$ (0-348) <sup>1</sup>	347,88	1,308
	без нистатина	100	$3,116 \times 10^4$ (0-202) <sup>1</sup>	11,61	$3,238 \times 10^6$ (12-305) <sup>1</sup>	305,01	2,231
	с нистатином	246	$1,013 \times 10^4$ (0-311) <sup>1</sup>	87,31	$1,235 \times 10^4$ (241-317) <sup>1</sup>	368,75	2,408
	без нокодазола	100	$3,116 \times 10^4$ (0-202) <sup>1</sup>	11,61	$3,238 \times 10^6$ (12-305) <sup>1</sup>	305,01	2,231
	с нокодазолом	125	$1,881 \times 10^4$ (0-420) <sup>1</sup>	0	$4,351 \times 10^6$ (0-346) <sup>1</sup>	346,03	1,091
431-6	без роданина	119	$9,467 \times 10^3$ (0-420) <sup>1</sup>	0	$2,503 \times 10^6$ (0-308) <sup>1</sup>	379,51	1,351
	с роданином	144	$7,448 \times 10^3$ (0-420) <sup>1</sup>	7,46	$2,675 \times 10^6$ (0-363) <sup>1</sup>	362,59	1,699
	без нистатина	119	$9,467 \times 10^3$ (0-420) <sup>1</sup>	0	$2,503 \times 10^6$ (0-380) <sup>1</sup>	379,51	1, 351
	с нистатином	168	$5,905 \times 10^2$ (0-420) <sup>1</sup>	134,3	$2,623 \times 10^3$ (134-236) <sup>1</sup>	236,22	2,125
	без нокодазола	119	$9,467 \times 10^3$ (0-420) <sup>1</sup>	0	$2,503 \times 10^6$ (0-308) <sup>1</sup>	379,51	1,351
	с нокодазолом	152	$9,315 \times 10^2$ (0-420) <sup>1</sup>	35,84	$1,369 \times 10^5$ (36-384) <sup>1</sup>	383,73	1,662

Примечание:

<sup>1</sup> Расчетный временной интервал процесса (минуты от начала ОЦР).

### **Влияние роданина на кинетические параметры одиночного цикла репродукции *daf+* и *daf-* клонов эховируса 11.**

Роданин ( $C_3H_3NOS_2$ ) является ингибитором дезинтеграции капсида эховирусов 7 и 12 типа [De Palma A.M. et al., 2008, Ward T. et al., 1999]. Влияние роданина на параметры ОЦР *daf+* клона E11 проявилось в снижении скорости дезинтеграции капсида в 1,95 раза по сравнению с исходной, в сокращении расчетного интервала времени до начала явного роста инфекционной активности (с 11,62 до 0 минут), а также в повышении скорости инкапсидации РНК в 1,34 раза в присутствии роданина. Влияние роданина на параметры ОЦР *daf-* клона E11 было менее выраженным и проявилось в снижении скорости дезинтеграции капсида в 1,27 раза по сравнению с исходной, в задержке расчетного срока начала явного роста инфекционной активности (с 0 до 7,46 мин), а также в незначительном повышении скорости инкапсидации РНК в 1,07 раза в присутствии роданина.

Графики аппроксимирующих функций показаны на рисунках 4С и 4D.

### **Влияние нистатина на кинетические параметры одиночного цикла репродукции *daf+* и *daf-* клонов эховируса 11.**

Нистатин ( $C_{47}H_{75}NO_{17}$ ) – полиеновый противогрибковый антибиотик, обладающий высоким сродством к стеролам клеточных мембран – эргостеролу в клетках грибов и холестеролу (холестерину) в клетках животных [Jokhadar S.Z. et al., 2016]. В исследованиях эховирусов нистатин применялся как реагент, нарушающий функции липидных плотов (lipid rafts, рафты) плазматических мембран [Leveque N. et al., 2007].

Влияние нистатина на параметры ОЦР *daf+* клона E11 проявилось в снижении скорости дезинтеграции капсида в 3,08 раза по сравнению с исходной, в удлинении расчетного интервала времени до начала явного роста инфекционной активности (с 11,62 до 87,3 минут), а также в снижении скорости инкапсидации РНК в 262,2 раза в присутствии нистатина. Влияние нистатина на параметры ОЦР *daf-* клона E11 также проявилось в снижении скорости дезинтеграции капсида в 16,0 раз по сравнению с исходной, в удлинении расчетного интервала времени до начала явного роста инфекционной активности (с 0 до 134,3 мин), а также в снижении скорости инкапсидации РНК в 954,3 раза в присутствии нистатина.

Графики аппроксимирующих функций показаны на рисунках 4Е и 4F.

### **Влияние нокодазола на кинетические параметры одиночного цикла репродукции *daf+* и *daf-* клонов эховируса 11.**

Нокодазол ( $C_{14}H_{11}N_3O_3S$ ) является ингибитором полимеризации микротрубочек в цитоплазме клеток [Vasquez R.J. et al., 1997]. Деполимеризация микротрубочек приводит к блокированию внутриклеточного транспорта везикул, зависящего от микротрубочек, к диссоциации комплекса Гольджи и к остановке деления клеток из-за нарушения функции веретена деления [Storrie V. et al., 1998].

Влияние нокодазола на параметры ОЦР *daf+* клона E11 проявилось в снижении скорости дезинтеграции капсида в 1,66 раза по сравнению с исходной, в

удлинении фазы эклипса (со 100 до 125 минут), в сокращении расчётного интервала времени до начала явного роста инфекционной активности (с 11,62 до 0 минут), в повышении скорости инкапсидации РНК в 1,34 раза в присутствии нокодазола и в задержке выхода на максимальную инфекционную активность за период наблюдения (с 305,0 до 346,0 минут). Влияние нокодазола на параметры ОЦР *daf*- клона E11 также проявилось в снижении скорости дезинтеграции капсида в 10,2 раза по сравнению с исходной, в удлинении расчетного интервала времени до начала явного роста инфекционной активности (с 0 до 35,8 мин), в снижении скорости инкапсидации РНК в 34,3 раза в присутствии нокодазола.

Графики аппроксимирующих функций показаны на рисунках 4G и 4H.

Таким образом, эксперименты с варьируемыми условиями ОЦР (разные культуры клеток, воздействие ингибиторов репродукции эховирусов), в сочетании с разработанной математической моделью позволили провести сравнительный анализ особенностей кинетики дезинтеграции капсида с высвобождением вирусной РНК и инкапсидации РНК эховирусов с различной рецепторной специфичностью, что позволило выяснить количественные различия пропускной способности путей входа эховирусов в клетки, инициируемых различными рецепторами.

## Выводы

1. Клеточный рецептор hFcRn является общим рецептором для эховирусов и коксакивируса A9, вызывающим дезинтеграцию капсидных белков с последующим высвобождением геномной вирусной РНК при репродукции в культуре клеток RD.

2. Субтиповые варианты эховирусов могут проникать в клетку, используя либо двухэтапное взаимодействие с клеточными рецепторами – сначала со связывающим рецептором DAF, затем с hFcRn – рецептором вызывающим дезинтеграцию капсидных белков, либо одноэтапное взаимодействие с рецептором hFcRn, используя его как для связывания с клеткой, так и для дезинтеграции белкового капсида с последующим выходом геномной РНК вирусов.

3. Разработанная математическая модель позволяет статистически адекватно рассчитывать количественные параметры, характеризующие процессы входа вируса в клетку и сборки новых вирионов эховирусов в экспериментах с одиночным циклом репродукции.

4. В одиночном цикле репродукции вариантов echovirus 11 с различной рецепторной специфичностью в культуре клеток RD более высокую пропускную способность имеет путь входа, инициируемый рецептором DAF. В культуре клеток Л-41 КД/84 более высокую пропускную способность имеет транспортный путь, инициируемый рецептором hFcRn.

5. В одиночном цикле репродукции вариантов echovirus 11 с различной рецепторной специфичностью обнаружена одинаковая направленность ингибирующего эффекта нистатина, связанная с задержкой начала инкапсидации

вирусной РНК и со снижением продуктивности инфекции. Количественное сравнение выявило более выраженные эффекты в отношении *daf*<sup>-</sup> варианта echovirus 11 .

6. Ингибирующее действие нокодазола на репродукцию *daf*<sup>+</sup> варианта echovirus 11 проявлялось в выраженном снижении скорости высвобождения геномной РНК вирусов. При репродукции *daf*<sup>-</sup> варианта echovirus 11 в присутствии нокодазола также наблюдалось снижение начального уровня связывания вируса с клетками, снижение скорости инкапсидации вирусной РНК, снижение максимального уровня инфекционной активности, достигнутого за период наблюдения.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи

1. **Усольцева П.С.** Механизмы интернализации энтеровирусов вида В / П. С. Усольцева, А.В. Новоселов, А.В. Резайкин, А.Г. Сергеев, А.В. Алимов // Вестник уральской медицинской академической науки – 2018. – № 3 (Т. 15). – С. 455-469.

2. **Усольцева П.С.** Ингибирующее действие роданина на депротенинизацию эховируса 11 и интерпретация формы графиков одиночного цикла репродукции с использованием динамической модели / П.С. Усольцева, А.В. Новоселов, А.В. Резайкин, А.Г. Сергеев, А.В. Алимов // Естественные и технические науки - 2018. – № 4 (Т. 118). – С. 44-51.

3. Алимов А.В. Эпидемиологические особенности групповой заболеваемости энтеровирусной инфекцией в Уральском федеральном округе и Западной Сибири в 2017 году / А.В. Алимов, А.В. Резайкин, Ю.Ю. Бурцева, **П.С. Усольцева**, С.В. Шарабрин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии - 2018. – № 6. – С. 49-55.

4. **Усольцева П.С.** Роль неонатального Fc рецептора в депротенинизации вирусов ЕСНО и Коксаки А9 / П.С. Усольцева, А.В. Алимов, А.В. Резайкин, А.Г. Сергеев, А.В. Новоселов // Вопросы вирусологии - 2019. - № 3 (Т. 64). - С. 132-139.

5. **Усольцева П.С.** Влияние нокодазола на кинетику депротенинизации вариантов эховируса 11, использующих Arf6-ассоциированный и клатрин-зависимый пути интернализации в культуре клеток RD / П.С. Усольцева, А.В. Новоселов, А.В. Резайкин, А.Г. Сергеев, А.В. Алимов // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и Технические Науки. – 2020. – №03/2. – С. 36-43.

6. Чалапа В.И. Энтеровирусная инфекция в Уральском федеральном округе и Западной Сибири: результаты эпидемиологического наблюдения с применением молекулярно-генетических методов / Чалапа В.И., Резайкин А.В., **Усольцева П.С.**, Алимов А.В. // Медицинский алфавит. – 2020. – № 19. – С. 38-43.

### Тезисы

1. **Усольцева П.С.** Рецепторная специфичность и скорость интернализации неполиомиелитных энтеровирусов / П.С. Усольцева, А.Г. Сергеев, А.В. Резайкин, Ф.А. Фадеев, А.В. Алимов // Инфекционные болезни – 2016. – № s1 (Т. 14). – С. 289.

2. **Усольцева П.С.** Молекулярная эпидемиология вируса Коксаки А9 – возбудителя серозного менингита на территории г. Екатеринбурга и Свердловской области в период с 2008 по 2016 гг. / П.С. Усольцева, А.В. Резайкин, А.Г. Сергеев, А.В. Устюжанин, А.В. Алимов // Инфекционные болезни – 2017. – № S1 (Т. 15). – С. 287-288.

3. **Усольцева П.С.** Роль бета-2-микроглобулина в интернализации энтеровирусов вида В / Усольцева П.С., Резайкин А.В., Новоселов А.В., Сергеев А.Г., Алимов А.В. // Материалы X Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с



международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы» (26–28 февраля). – Москва, 2018. – С.231.

4. **Усольцева П.С.** Неонатальный рецептор для Fc фрагмента иммуноглобулина G человека (FcRn)-общий депротеинизирующий рецептор для вирусов ЕСНО / П.С. Усольцева, А.В. Новоселов, А.В. Резайкин // В сборнике: Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения. Материалы IV международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов, IV форума медицинских и фармацевтических вузов России "За качественное образование" – 2019. – С. 144-148.

5. **Усольцева П.С.** Влияние нистатина на процесс интернализации близкородственных клонов вируса ЕСНО11 имеющих различную рецепторную специфичность / П.С. Усольцева, А.В. Резайкин, А.В. Алимов // Вирусные инфекции и общество: проблемные вопросы диагностики, лечения и профилактики: сборник тезисов межрегиональной научно-практической конференции с международным участием (17-18 октября) Екатеринбург – 2018. – С.103.

6. **Усольцева П.С.** Механизмы селекции вируса ЕСНО11 при адаптации к культурам клеток RD и Л-41 КД/81 / П. С. Усольцева, А.В. Резайкин, А.В. Новоселов // Сборник тезисов V Международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов, вирусологов – 2018 – АНО "Инновационный центр Кольцово" – Новосибирск. – 2018. – С.217-220.

7. **Усольцева П.С.** Влияние нистатина на процесс интернализации близкородственных клонов вируса ЕСНО11, имеющих различную рецепторную специфичность / П.С. Усольцева, А.В. Резайкин, А.В. Алимов // Вирусные инфекции и общество: проблемные вопросы диагностики, лечения и профилактики: сборник тезисов межрегиональной научно-практической конференции с международным участием (17-18 октября) Екатеринбург – 2018. – С.103.

8. **Усольцева П.С.** Влияние неионных детергентов на определение инфекционной активности эховируса методом конечных разведений / П.С. Усольцева, А.Г. Сергеев // В сборнике: актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения. Материалы III международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов, III форума медицинских и фармацевтических вузов России "За качественное образование" – 2018. – С. 168-173.

#### **Патент**

1. Резайкин А.В., Шарабрин С.В., **Усольцева П.С.**, Алимов А.В. / Способ генотипирования энтеровирусов методом секвенирования 1А-1В участка генома. Патент на изобретение RU 2701145 С1, 25.09.2019. Заявка № 2019121521 от 10.07.2019.

#### **Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ**

1. **Усольцева П.С.**, Резайкин А.В., Новоселов А.В., Хозов А.В. / SCRP – Single Cycle Reproduction Parameters // Номер регистрации (свидетельства) 2020660270. Опубликовано 01.09.2020.