

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

На правах рукописи

Усольцева Полина Сергеевна

**ОСОБЕННОСТИ РАННИХ ЭТАПОВ РЕПРОДУКЦИИ ЭХОВИРУСОВ С
РАЗЛИЧНОЙ РЕЦЕПТОРНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ**

03.02.02 – вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
к.м.н. Резайкин Алексей Васильевич

Новосибирск – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	7
ВВЕДЕНИЕ.....	10
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	21
1.1. Общая характеристика эховирусов: таксономическое положение, номенклатура, структура вирионов, организация генома, цикл репродукции....	21
1.2. Последовательность событий входа эховирусов в клетки	26
1.2.1. Клеточные рецепторы для эховирусов	26
1.2.2. Пути эндоцитоза вирус-рецепторных комплексов.....	30
1.2.3. Высвобождение и транслокация геномной РНК эховирусов.....	36
1.2.4. Гипотеза о существовании общего дезинтегрирующего капсид рецептора для эховирусов	38
1.3. Методы изучения кинетики дезинтеграции капсида с высвобождением РНК эховирусов в культурах клеток.....	40
1.4. Математическое моделирование изменения инфекционной активности вирусов в одиночном цикле репродукции.....	47
1.5. Заключение по обзору литературы	50
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	53
2.1. Материалы	53
2.1.1. Реактивы и материалы.....	53
2.1.2. Культуры клеток	54
2.1.3. Вирусы	55

2.2. Методы	56
2.2.1. Культивирование клеток	56
2.2.2. Оценка инфекционной активности вирусов	57
2.2.3. Оценка гемагглютинирующей активности вирусов	57
2.2.4. Исследование вирус-инактивирующего действия препаратов человеческого сывороточного альбумина.....	58
2.2.5. Непрямая иммунофлуоресцентная микроскопия	58
2.2.6. Исследование протективного эффекта человеческого сывороточного альбумина при заражении культур клеток RD энтеровирусами вида В.....	59
2.2.7. Исследование протективного эффекта поликлональных и моноклональных антител к hFcRn при заражении культур клеток RD энтеровирусами вида В	60
2.2.8. Изучение изменения инфекционной активности эховируса 11 в одиночном цикле репродукции на чувствительных клетках	61
2.2.9. Изучение влияния ингибиторов репродукции эховируса 11 на изменения инфекционной активности в одиночном цикле репродукции в культуре клеток RD	62
2.2.10. Статистические методы обработки результатов	63
2.2.11. Разработка математической модели, описывающей кинетику дезинтеграции капсида с высвобождением РНК и инкапсидации РНК эховирусов в одиночном цикле репродукции, и технического задания по реализации модели в виде программного обеспечения для ЭВМ.....	63
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	65

3.1. Определение роли неонатального рецептора Fc фрагмента иммуноглобулинов класса G человека в качестве общего дезинтегрирующего капсид рецептора для эховирусов и коксакивируса A9	65
3.1.1. Исследование протективного эффекта альбумина при заражении культур клеток RD энтеровирусами вида В	66
3.1.1.1. Отсутствие вирус-инактивирующего действия препарата сывороточного альбумина, очищенного от глобулинов.....	66
3.1.1.2. Протективный эффект альбумина при заражении культур клеток RD энтеровирусами вида В, имеющими различную рецепторную специфичность	68
3.1.2 Исследование протективной активности антител к hFcRn при заражении культур клеток RD энтеровирусами вида В.....	73
3.1.2.1. Подтверждение экспрессии hFcRn в культуре клеток RD методом непрямой иммунофлуоресцентной микроскопии	73
3.1.2.2. Отсутствие вируснейтрализующего действия поликлональных и моноклональных антител к hFcRn на эховирусы 11 типа	74
3.1.2.3. Протективная активность антител к hFcRn при заражении культур клеток RD различными типами энтеровирусов вида В	75
3.1.3. Доказательства роли hFcRn в качестве общего дезинтегрирующего капсид рецептора эховирусов, связывающегося с каньоном	80
3.1.4. Итоги изучения роли hFcRn в качестве общего дезинтегрирующего капсид рецептора для эховирусов и коксакивируса A9.....	81
3.2. Разработка математической модели, описывающей изменения инфекционной активности эховирусов в экспериментах с одиночным циклом репродукции.....	82

3.2.1. Математическая модель объекта моделирования	82
3.2.2. Расчётные параметры математической модели.....	86
3.2.3. Постановка задачи математического моделирования.....	87
3.2.4. Значение количественного подхода к описанию формы графиков одиночного цикла репродукции	89
3.2.5. Итоги работ по созданию математической модели.....	91
3.3. Кинетические особенности одиночного цикла репродукции клонированных субтиповых вариантов эховируса 11 с различной рецепторной специфичностью	92
3.3.1. Кинетические особенности одиночного цикла репродукции <i>daf+</i> и <i>daf-</i> клонов эховируса 11 в культуре клеток RD.....	93
3.3.2. Кинетические особенности одиночного цикла репродукции <i>daf+</i> и <i>daf-</i> клонов эховируса 11 в культуре клеток Л-41 КД/84.....	97
3.3.3. Влияние химических ингибиторов репродукции эховирусов на кинетические параметры одиночного цикла репродукции <i>daf+</i> и <i>daf-</i> клонов эховируса 11 в культуре клеток RD	101
3.3.3.1. Влияние роданина на кинетические параметры одиночного цикла репродукции <i>daf+</i> и <i>daf-</i> клонов эховируса 11.....	101
3.3.3.2. Влияние нистатина на кинетические параметры одиночного цикла репродукции <i>daf+</i> и <i>daf-</i> клонов эховируса 11.....	106
3.3.3.3. Влияние нокодазола на кинетические параметры одиночного цикла репродукции <i>daf+</i> и <i>daf-</i> клонов эховируса 11.....	111
3.3.4. Итоги изучения особенностей одиночного цикла репродукции клонированных субтиповых вариантов эховируса 11 с различной рецепторной специфичностью	118

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	121
ВЫВОДЫ	128
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	130
Приложение 1. Протективное действие поликлональных антител к hFcRn в клетках RD, инфицированных различными энтеровирусами вида В.....	145
Приложение 2. Протективный эффект альбумина HSA-GF в клетках RD, инфицированных различными энтеровирусами вида В.....	147

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БСА	Бычий сывороточный альбумин
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ВСЖ	Вирусодержащая жидкость
ДМСО	Диметилсульфоксид
мАТ	Моноклональные антитела
ОЦР	Одиночный цикл репродукции
пАТ	Поликлональные антитела
ТЦД ₅₀	50-процентная тканевая цитопатогенная доза
УФО	Уральский федеральный округ
ФСБ	Фосфатно-солевой буфер
ЦПЭ	Цитопатический эффект
ЧСА	Человеческий сывороточный альбумин
ЭВИ	Энтеровирусная инфекция
ANOVA	Analysis of variance, Дисперсионный анализ
AP-2	Adaptor protein – 2, Адаптерный комплекс (белков) AP-2
Arf6	ADP-ribosylation factor 6, АДФ-рибозилирования фактор 6
B2M	Beta-2-microglobulin, Бета-2-микроглобулин
CAR	Coxsackievirus and adenovirus receptor, Коксакивирусный и аденовирусный рецептор
CDE	Clathrin-dependent endocytosis, Клатрин-зависимый эндоцитоз
CIE	Clathrin-independent endocytosis, Клатрин-независимый эндоцитоз
CLIC/GEEC	Clathrin-independent carrier / glycosylphosphatidylinositol (GPI) – anchored protein-enriched endosomal compartments, Клатрин-независимые носители / эндосомальные компартменты, обогащённые гликозилфосфатидилинозитол-заякоренными белками
COPI	Coatomer protein (complex) I, Коатомерный белковый комплекс I

CPE	Cytopathic effect, Цитопатический эффект
DAF	Decay accelerating factor, Фактор, ускоряющий распад (комплемента)
DAPI	4',6'-diamidino-2-phenylindole, 4',6'-Диамидино-2-фенилиндол
ERC	Endocytic recycling compartment, Эндоцитозный рециркулирующий компартмент
EEA1	Early endosome antigen 1, Антиген ранних эндосом
FCGRT	Fc fragment of IgG receptor and transporter, Рецептор и транспортер Fc фрагмента IgG.
FcRn	Neonatal Fc receptor, Неонатальный рецептор Fc фрагмента (IgG)
GPI-APs	glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins, гликозилфосфатидилинозитол-заякоренные белки
hFcRn	Human neonatal Fc receptor, Неонатальный рецептор Fc фрагмента (IgG) человека
HSPG	Heparan sulfate proteoglycans, Протеогликаны гепарансульфата
HSA-FF	Human serum albumin, fatty acids free, Человеческий сывороточный альбумин, свободный от жирных кислот (и глобулинов)
HSA-GF	Human serum albumin, globulin free, Человеческий сывороточный альбумин, свободный от глобулинов
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1, Молекула межклеточной адгезии типа 1
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses, Международный комитет по таксономии вирусов
IRES	Internal ribosome entry site, Внутренний участок для посадки рибосомы
LE	Late endosome, Поздняя эндосома
MBCD	Methyl-beta-cyclodextrin, Метил-бета-циклодекстрин
MHC I	Major histocompatibility complex class I, (Молекула) главного

комплекса гистосовместимости I класса

PLA2G16 Group XVI phospholipase A2, Фосфолипаза A2 из группы XVI
p.i. post infection, после заражения
UTR Untranslated region, Нетранслируемая область

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) в 2018 году, наравне с аренавирусными геморрагическими лихорадками, лихорадкой Чикунгунья, высокопатогенными коронавирусными заболеваниями и тяжелой лихорадкой с синдромом тромбоцитопении, внесла в качестве кандидата в «Список приоритетных заболеваний» эмерджентные неполиомиелитные энтеровирусы (включая энтеровирусы А71(EVA71) и D68 (EVD68)) [70]. По мнению специалистов ВОЗ, эти заболевания представляют серьезную угрозу для здоровья населения и требуют дальнейших исследований в области эпидемиологического надзора и диагностики. За несколько последних десятилетий в мире регулярно регистрируются крупные вспышки энтеровирусного менингита и энтеровирусной инфекции (ЭВИ) с экзантематозным поражением слизистых оболочек и кожи. Описаны вспышки энтеровирусного (асептического) менингита во Франции (2002 г., 559 случаев, эховирусы 13, 20, 6), Японии (2001 г., более 100 заболевших, вирус E13), Испании (2000 г., 135 заболевших; E13), Германии (2001 г., EV70; CVB5), Турции. Наиболее крупные из описанных вспышек отмечались в 1998 и 2000 гг. на Тайване (около 3 тыс. человек; преобладали вирусы E13, 30 и EV71), в 2000 г. в Сингапуре (1 тыс. случаев, 4 смертельных исхода, EV71). В России наиболее крупные вспышки в последние годы наблюдались в Приморском крае (Хабаровск, 1997 г., преобладали CVB3, 4, 5; E6, 17, EV70) и Калмыкии (2002 г., 507 случаев, вирус E30). Были также вспышки на Украине (1998 г., 294 человека, CVB4) и в Казахстане. Вспышки острого энтеровирусного увеита в больницах Красноярска, Омска и Иркутска в 1980-1989 гг. с десятками и сотнями заболевших детей, потерявших зрение. EV70 вызвал пандемию геморрагического конъюнктивита, которая охватила десятки миллионов человек с большим количеством неврологических осложнений [130]. В 2019 г. в Уральском федеральном округе (УФО) и Западной Сибири суммарно был зарегистрирован

4321 случай ЭВИ; показатель заболеваемости составил 18,65 ‰ (на 100 тыс. населения), на 48% превысив общероссийский показатель (12,60 ‰) и на 16% – уровень 2018 г. (16,04 ‰). Эпидемиологическая ситуация в УФО характеризовалась как неблагополучная: было зарегистрировано 3504 случая ЭВИ, показатель заболеваемости составил 28,37 ‰, превысив общероссийский уровень заболеваемости в 2,3 раза и уровень 2018 г. (3046 случаев; 24,65 ‰) – на 15,1% [135].

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 [131, 143]. Это подразумевает способность энтеровирусов к репродукции в различных тканях и органах за счёт использования различных клеточных рецепторов при инфицировании клеток. Исследования ранних этапов входа энтеровирусов в чувствительные клетки не теряют своей актуальности уже более 50 лет [40], начиная с работ, выполненных на клетках HeLa с вирусом полиомиелита в 1960-е годы 20-го века [42, 43].

Последовательность ранних событий в цикле репродукции эховирусов начинается со специфического взаимодействия эховирусов с каким-либо связывающим рецептором на плазматической мембране клеток. Это взаимодействие запускает каскад событий, заканчивающийся высвобождением вирусной РНК из вириона и её перемещением (транслокацией) через мембрану эндосомы в цитоплазму клеток. Таким образом, рецепторная специфичность эховирусов по отношению к связывающим рецепторам на плазматической мембране клеток детерминирует последовательность событий, составляющих конкретный путь входа вируса в клетку [4]. Вирионы эховирусов достаточно устойчивы к факторам внешней среды, включая кислую среду желудка и протеазы кишечника, поэтому при входе в клетку высвобождение вирусной РНК происходит поэтапно, под действием клеточных сигналов. Важнейшим клеточным сигналом, обеспечивающим высвобождение РНК у родственных

эховирусам вирусов полиомиелита, некоторых типов коксакивирусов и некоторых типов риновирусов являются рецепторы дезинтеграции капсида, инициирующие превращение зрелых вирионов энтеровирусов 160S в 135S А-частицы, имеющие промежуточную структуру вириона в процессе дезинтеграции капсида с последующим высвобождением РНК. Однако, наличие общего дезинтегрирующего рецептора для эховирусов до недавнего времени являлось лишь гипотезой.

Доставка вирусной РНК в цитоплазму клетки является критически важным процессом в цикле репродукции эховирусов и зависит от особенностей путей входа эховирусов в клетку. Различия в сроках начала отдельных событий и скорости процессов цикла репродукции эховирусов определяют особенности кинетики репродуктивного цикла эховирусов в различных типах клеток.

Изучение кинетических характеристик и молекулярных механизмов энтеровирусной инфекции на субклеточном уровне является одной из важнейших задач фундаментальной вирусологии, от решения которой зависят перспективы целенаправленного создания высокоэффективных противовирусных препаратов, новые возможности в совершенствовании терапевтических средств как на основе эховирусных векторов (в качестве онколитических вирусов), так и на основе 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 [66]. Для отдельных представителей рода *Enterovirus* (коксакивирусов В3 и А21) было экспериментально доказано двухэтапное взаимодействие с различными клеточными рецепторами при входе в клетку [6, 7, 95, 96].

На первом этапе связывающие рецепторы (рецепторы прикрепления) обеспечивают взаимодействие вирионов с плазматической мембраной клеток,

кластеризацию вирус-рецепторных комплексов, активацию путей трансмембранной передачи сигнала, а в поляризованных клетках – латеральное перемещение вирус-рецепторных комплексов по апикальной поверхности клеток в область плотных межклеточных контактов. Эховирусы могут использовать в качестве связывающих клеточных рецепторов следующие виды молекул: фактор, ускоряющий распад комплемента (DAF) [53, 101], протеогликаны гепарансульфата (HSPG) [35, 48, 69], интегрины $\alpha 2\beta 1$ и $\alpha V\beta 3$ [50, 125].

При двухэтапном взаимодействии с клеточными рецепторами, на втором этапе коксакивирусы В3 взаимодействуют с дезинтегрирующим капсид рецептором CAR, а коксакивирусы А21 – с дезинтегрирующим рецептором ICAM-1. Это взаимодействие вызывает необратимое превращение 160S вирионов в 135S А-частицы за счёт удаления из капсида нековалентно связанной молекулы жирной кислоты (покет-фактора), потери капсидного белка VP4 и пространственной реорганизации капсидного белка VP1 [7]. Mbida et al. [68] был выделен и предварительно охарактеризован в качестве предполагаемого общего клеточного рецептора для эховирусов гликопротеин с молекулярной массой 44 кДа – gr44. Моноклональные антитела к gr44 защищали культуру клеток P2002 от инфицирования практически всеми типами эховирусов и коксакивирусом А9 [67], однако дальнейших исследований gr44 не проводилось. Ward et al. [119] обнаружили защитный эффект антител к бета-2-микроглобулину при заражении клеток RD широким спектром типов эховирусов и коксакивирусом А9, но защитный эффект этих антител не проявлялся на других культурах клеток. Ward et al. [119] также было показано, что добавление бычьего или человеческого сывороточного альбумина в среду поддержания предотвращало инфицирование культуры клеток RD эховирусом 7, подавляя образование А-частиц, но не препятствовало связыванию вируса с клетками. Механизм защитного эффекта человеческого сывороточного альбумина остался невыясненным, хотя было сделано предположение о его блокирующем действии на вторичный (по отношению к DAF) не идентифицированный клеточный рецептор. Таким образом, рецептор дезинтегрирующий капсид эховирусов оставался неизвестным.

Процесс высвобождения геномной РНК эховирусов происходит поэтапно и сопряжён с ранними событиями репродуктивного цикла эховирусов, которые могут иметь различные сроки начала и скорость процессов. Было известно [119, 34], что различия в форме начального участка графика изменения инфекционной активности эховируса 7 в экспериментах с одиночным циклом репродукции (ОЦР) информативны в отношении скорости дезинтеграции капсида и высвобождения РНК этого эховируса. Однако отсутствие математической модели наблюдаемых процессов затрудняло количественный анализ кинетических параметров репродукции эховирусов. Работы, посвящённые математическому моделированию вклада отдельных стадий ОЦР в конечную продуктивность инфекции у других вирусов, были немногочисленными [123] и не учитывали возможность снижения инфекционной активности в начальной фазе ОЦР.

Анализ актуальности и степени разработанности темы исследования позволил поставить 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

1. Впервые определена функция hFcRn в качестве общего дезинтегрирующего рецептора для эховирусов и коксакивируса А9 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 согласуется с двухэтапной схемой 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 A9 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 ранних этапов взаимодействия с клеткой эховирусов с разной рецепторной специфичностью, включая идентификацию общего рецептора дезинтеграции капсида для эховирусов. Были применены вирусологические, молекулярно-биологические, статистические методы исследования и метод математического моделирования.

Для изучения особенностей процессов высвобождения и инкапсидации геномной РНК энтеровирусов проводилось численное моделирование кинетики этих процессов в экспериментах с одиночным циклом репродукции вирусов, включавших использование вариантов эховирусов с различной рецепторной специфичностью, различных культур клеток и различных химических ингибиторов репродукции энтеровирусов.

Для идентификации общего рецептора дезинтеграции капсида эховирусов применялись вирусологические методы исследования с применением энтеровирусов, имевших различную рецепторную специфичность (эховирусы нескольких типов, субтипичные варианты эховируса одного типа и коксакивирусы нескольких типов); молекулярно-биологические методы исследования с применением различных препаратов человеческого сывороточного альбумина, поликлональных и моноклональных антител; иммунофлуоресцентный метод исследования культур клеток.

Положения, выносимые на защиту

1. Неонатальный рецептор Fc фрагмента иммуноглобулинов класса G человека (hFcRn) является общим дезинтегрирующим капсид рецептором для эховирусов и коксакивируса A9.

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. Субтиповые 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 субтипových *daf+* и *daf-* вариантов эховирусов в данных культурах клеток.

4. Использование субтипowymi 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 Международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов, вирусологов «Open Bio» (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 «Open Bio» (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; зарегистрирована 1 программа для ЭВМ.

Структура и объём 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.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю к.м.н. Резайкину А.В. за осуществление общего руководства, а также активную поддержку в планировании, проведении и интерпретации результатов исследования.

Особую благодарность автор выражает научному консультанту к.м.н. Новосёлову А.В. за оказанную помощь в планировании экспериментов, интерпретации полученных результатов и написании диссертационной работы.

Автор благодарит Хозова А. В. за реализацию математической модели в виде программы для ЭВМ

Автор благодарит своих коллег лаборатории энтеральных вирусных инфекций и Урало-Сибирского регионального научно-методического Центра по

изучению энтеровирусной инфекции, в плодотворном сотрудничестве с которыми была выполнена диссертационная работа.

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 А.В. Хозов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общая характеристика эховирусов: таксономическое положение, номенклатура, структура вирионов, организация генома, цикл репродукции

Согласно современной классификации Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses), все эховирусы относятся к виду (species) *Enterovirus B*, роду (genus) *Enterovirus*, семейству (family) *Picornaviridae*, порядку (order) *Picornavirales*, классу (class) *Pisoniviricetes*, филуму (phylum) *Pisuviricota*, царству (kingdom) *Orthornavirae*, домену (realm) *Riboviria* [32]. Современная классификация энтеровирусов базируется на сравнении их геномных нуклеотидных последовательностей, в отличие от использовавшихся ранее антигенных различий и биологических свойств. Замена критерия классификации и метода идентификации отдельных представителей энтеровирусов с серологического на молекулярно-генетический привела к изменениям в их номенклатуре [98]. В частности, названия известных групп энтеровирусов, таких как вирусы ЕСНО и вирусы Коксаки, в настоящее время пишутся слитно, со строчной буквы, без курсива – эховирус, коксакивирус (echovirus, coxsackievirus); из названий типов эховирусов удалено прилагательное *человеческий* (human); термин *serotip* (serotype) заменен на *tip* (type); сокращённые названия типов пишутся без дефиса: например, echovirus 11 – E11; coxsackievirus A9 – CVA9. Полный перечень эховирусов включает следующие типы: с E1 по E7, E9, с E11 по E21, с E24 по E27, с E29 по E33.

Общие биологические свойства эховирусов определяются их принадлежностью к семейству *Picornaviridae* и к роду *Enterovirus*, классификационные характеристики которых представлены в соответствующих докладах ICTV [32, 47, 76, 126]. К семейству *Picornaviridae* относятся небольшие (30 – 32 нм в диаметре) вирусы без оболочки, с икосаэдральным типом симметрии

вириона, состоящего из 60 протомеров, каждый из которых включает четыре капсидных белка (рисунок 1.1).

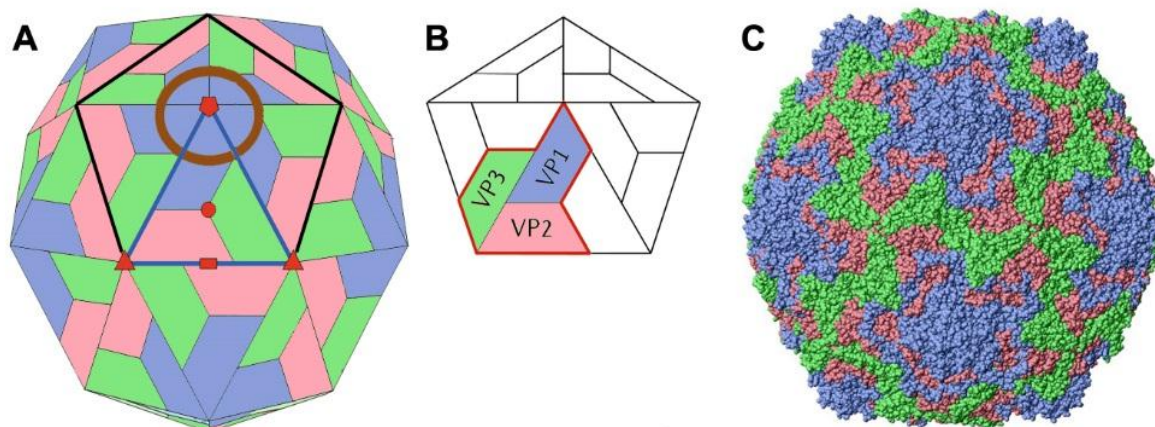


Рисунок 1.1. Вирион эховируса 11 (структурная схема и модель).

(А) Структурная схема расположения поверхностных белков капсида [4, 32]. (В) Расположение капсидных белков в пентамере и в протомере [4, 32]. (С) Трёхмерная модель вириона, построенная по результатам рентгеноструктурного анализа с разрешением 0,29 нм (PDB: 1H8T [87, 105]) в JSmol 3D viewer [87].

Примечание: капсидные белки обозначены цветом (VP1 – синим, VP2 – розовым; VP3 – зелёным); граница пентамера выделена чёрным контуром; граница протомера – красным; место расположения каньона показано коричневой окружностью; ось симметрии пятого порядка отмечена красным пятиугольником; оси симметрии третьего порядка – красными треугольниками; ось симметрии квази-третьего порядка – красным кругом; ось симметрии второго порядка – красным прямоугольником.

Геном пикорнавирусов представлен однонитевой несегментированной РНК позитивной полярности (геномная РНК способна инициировать трансляцию вирусного белка), которая имеет 3'-концевой гомополимер, состоящий из адениновых нуклеотидов. Общими для всех представителей семейства являются следующие свойства: а) наличие трёх поверхностных капсидных белков, имеющих структурную основу в виде 8-цепочечных бета-баррелей; б) протеолитическое расщепление вирусного полипротеина-предшественника вирусной цистеиновой протеазой (или протеазами); в) репликация генома РНК-зависимой-РНК-полимеразой, имеющей консервативную аминокислотную

последовательность активного центра YGDD. У пикорнавирусов, имеющих четыре капсидных белка (в частности, у представителей рода *Enterovirus*), три белка являются поверхностными – 1B (VP2), 1C (VP3) и 1D (VP1), один белок 1A (VP4) – внутренним, причём он образуется в результате протеолитического расщепления предшественника 1AB (VP0) в процессе созревания 150S провирионов в 160S вирионы.

К настоящему времени методами *рентгеноструктурного анализа* (x-ray diffraction) и *криоэлектронной микроскопии* (cryo-electron microscopy) получены и депонированы в открытых базах данных трёхмерные (3D) модели структуры вирионов многих эховирусов с разрешением 0,2 – 0,4 нм. Например, в базе данных RCSB PDB – Protein Data Bank [87] представлены структуры полных вирионов для следующих типов эховирусов: 1 тип (идентификатор в PDB: 1EV1 и др.), 3 тип (PDB: 7C9X), 6 тип (PDB: 6ILP и др.), 7 тип (PDB: 2X5I и др.), 11 тип (PDB: 6LA3 и др.), 18 тип (PDB: 6HNG и др.), 30 тип (PDB: 7C9S и др.). У некоторых эховирусов известны 3D структуры полных (F, *full*), пустых (E, *empty*), открытых (O, *open*) вирионов, А-частиц (A, *altered particles*), а также 3D структуры комплексов вириона с каким-либо клеточным рецептором (DAF; FcRn), в том числе – при различной кислотности среды (pH 5,5; pH 7,4).

Отличительной морфологической характеристикой энтеровирусов человека, относящихся к роду *Enterovirus*, является выраженный рельеф поверхности вирионов, имеющих приподнятую площадку вокруг каждой из осей симметрии 5-го порядка, окружённую впадиной, имеющей глубину приблизительно 2,5 нм и называемой *каньон* (canyon).

Внутри капсидного белка 1D (VP1), непосредственно под дном каньона, находится гидрофобный карман, в котором обнаруживается электронная плотность, получившая название *покет-фактор* (pocket factor) и соответствующая молекуле жирной кислоты. В 3D моделях эховирусов 3 типа (PDB: 7C9X), 6 типа (PDB: 6ILP) и 30 типа (PDB: 7C9S) покет-фактор интерпретирован как *сфингозин* – алифатический спирт с углеродной цепью из 18 атомов (C18). В одной из 3D моделей эховируса 7 типа (PDB: 3IYP) покет-фактор

интерпретирован как *лауриновая кислота* (C12), в другой модели (PDB: 6ILN) – как *сфингозин* (C18). В 3D моделях эховируса 1 типа (PDB: 1EV1, 6RJF) и эховируса 18 типа (PDB: 6HBG) – как *пальмитиновая кислота* (C16). В одной 3D модели эховируса 11 типа (PDB: 1H8T) покет-фактор интерпретирован как *12-амино-лауриновая кислота* (C12), в другой модели (PDB: 6LA3) – как *сфингозин* (C18).

Кроме нековалентно связанного покет-фактора, липиды в составе вирионов энтеровирусов представлены *миристиновой кислотой* (C14), которая ковалентно связана с N-терминальным глицином белка 1A (VP4) [11].

Организация генома эховирусов представлена в виде схемы на рисунке 1.2.

VPg+5'-UTR-[1A-1B-1C-1D / 2A-2B-2C / 3A-3B-3C-3D]-3'UTR-poly(A)

Рисунок 1.2. Организация генома энтеровирусов [126].

Примечание:

VPg – белок 3В, ковалентно связанный с геномной РНК; 5'-UTR и 3'-UTR – нетранслируемые области (последовательности); в квадратных скобках заключена последовательность открытой рамки считывания, кодирующей полипротеин-предшественник; символом «/» указаны сайты первичного протеолитического расщепления полипротеина; символом «-» указаны сайты финального протеолитического расщепления; цифрами 1, 2 и 3 обозначены области генома, кодирующие фрагменты полипротеина P1, P2 и P3; poly(A) – 3'-концевой гомополимер, состоящий из адениновых нуклеотидов.

Геном эховируса 11 типа [12] имеет длину 7438 нуклеотидов и его организация аналогична таковой у других энтеровирусов, относящихся к виду *Enterovirus B*. Нетранслируемая 5'-UTR последовательность имеет длину 751 нуклеотид и содержит внутренний участок для посадки рибосомы – *IRES* (internal ribosome entry site) I типа [33], который обеспечивает кэп-независимую инициацию трансляции. Единственная открытая рамка считывания кодирует полипротеин-предшественник, состоящий из 2195 аминокислот, который автокаталитически расщепляется вирусными протеазами 2A^{pro} и 3C^{pro}.

Нетранслируемая 3'-UTR последовательность имеет длину 102 нуклеотида, переходящую в poly(A) гомополимер переменной длины.

Стадии репродуктивного цикла эховирусов соответствуют таковым у представителей семейства *Picornaviridae* [29, 82]. Первая стадия – *прикрепление* (attachment, адсорбция) вириона к рецептору на плазматической мембране клетки. Вторая стадия – *вход* (entry) вируса в клетку объединяет несколько событий [39]: *интернализацию* (internalization), то есть перемещение вируса с плазматической мембраны внутрь клетки в результате эндоцитоза; *внутриклеточный трафик* (trafficking, везикулярный транспорт) вируса; *дезинтеграции капсида* (uncoating, «раздевание») с *высвобождением* геномной РНК (RNA release); *транслокацию* (translocation) геномной РНК [82] из просвета эндосомы через эндосомальную мембрану в цитозоль. Термин *проникновение* (penetration), обозначающий одно из событий входа вируса в клетку, а именно: «перенос вируса или капсида через мембрану в цитозоль» [41], в настоящее время по отношению к энтеровирусам не применяется. Термин *транслокация* геномной РНК исключает неопределённость понимания термина *проникновение* вируса или капсида, так как у энтеровирусов геномная РНК проникает в цитозоль в результате её транслокации через мембрану эндосомы: либо в результате непосредственного взаимодействия вириона с мембраной, либо в результате высвобождения РНК из вириона в просвет эндосомы и последующего разрушения мембраны эндосомы клеточными механизмами. Третья стадия цикла – *трансляция* вирусной РНК. Рибосомы присоединяются к 5'-UTR области вирусного генома за счёт IRES-структуры вирусной РНК и синтезируют полипротеин-предшественник, который автокаталитически расщепляется вирусными протеазами на структурные и неструктурные вирусные белки. Одним из неструктурных белков является РНК-зависимая-РНК-полимераза, которая осуществляет четвёртую стадию цикла – *репликацию* вирусных РНК, то есть синтез минус- и плюс-нитей РНК. Пятая стадия цикла – *сборка* (assembly, морфогенез) вирионов включает следующие события: сборку капсида провириона, *инкапсидацию* (encapsidation, упаковка) плюс-нити вирусной геномной РНК и *созревание* (maturation) провириона в

инфекционный вирион. Каждые три белка 1AB (VP0), 1C (VP3) и 1D (VP1) в результате самосборки образуют 5S протомер, каждые 5 протомеров образуют 14S пентамер, 12 пентамеров объединяются в пустой 80S капсид, причем самосборка пустого капсида может происходить *in vivo* и *in vitro*. Согласно одной из гипотез, 150S провирион появляется в результате инкапсидации плюс-нити вирусной РНК в пустой капсид. Согласно другой гипотезе, инкапсидация происходит путем объединения пентамеров вокруг вирусной РНК, что приводит к появлению 150S провириона. После инкапсидации вирусной РНК, капсидный белок 1AB (VP0) расщепляется внутри провириона на два белка – 1A (VP4) и 1B (VP2), в результате чего 150S провирион созревает, то есть превращается в зрелый инфекционный 160S вирион. Шестая стадия цикла – *выход* зрелых вирионов из клетки – может происходить как при разрушении (лизисе) клетки, так и с помощью экзоцитоза при персистирующей инфекции.

1.2. Последовательность событий входа эховирусов в клетки

1.2.1. Клеточные рецепторы для эховирусов

В соответствии с выполняемой функцией, различают два основных типа клеточных рецепторов для энтеровирусов: *связывающие рецепторы* (binding receptors), также известные как *рецепторы прикрепления* (attachment receptors), и *дезинтегрирующие рецепторы* (uncoating receptors), также известные как *рецепторы входа* (entry receptors) вируса в клетку. Jolly and Sattentau [51] была предложена следующая формулировка: «Полезно различать рецепторы прикрепления, которые просто позволяют вирусам зацепиться на плазматической мембране клетки, и рецепторы входа в клетку, которые опосредуют доставку вирусного генома в цитоплазму». Для обозначения *рецепторов прикрепления* также использовался менее удачный термин – *факторы прикрепления* (attachment factors) [40], подразумевавший меньшую специфичность взаимодействия лигандов с *факторами* в отличие от *рецепторов*. Установление роли молекулы в

качестве рецептора для какого-либо лиганда подразумевает наличие определённых характеристик их взаимодействия, а именно – специфичности, насыщенности и конкурентности [108]. Термин *связывающий рецептор* исключает неоднозначность в толковании факторов прикрепления и рецепторов прикрепления, поэтому является более предпочтительным в данном контексте. Термин *дезинтегрирующий рецептор* является более предпочтительным для описания превращения полных вирионов эховирусов в А-частицы, чем термин *рецептор входа* эховирусов в клетку. Вход эховирусов в клетку объединяет несколько событий. Например, событие интернализации эховирусов с плазматической мембраны внутрь клетки может выполняться только связывающим рецептором, без участия дезинтегрирующего рецептора [101]. Кроме того, существует модель события транслокации вирусной РНК в цитозоль без непосредственного участия дезинтегрирующего рецептора – модель лизиса мембраны эндосомы клеточными молекулярными механизмами [101].

Для отдельных представителей рода *Enterovirus* (коксакивирусов В3 и А21) было экспериментально доказано двухэтапное взаимодействие с различными клеточными рецепторами при входе вирусов в клетку [8, 16, 94, 96]. На первом этапе связывающие рецепторы обеспечивали взаимодействие вирионов с плазматической мембраной клеток, кластеризацию вирус-рецепторных комплексов, активацию путей трансмембранной передачи сигнала, а в поляризованных клетках – перемещение вирус-рецепторных комплексов с апикальной поверхности в область *плотных межклеточных контактов* (tight junctions, замыкающие контакты). На втором этапе происходило взаимодействие энтеровирусов с дезинтегрирующими рецепторами (коксакивируса В3 – с CAR; коксакивируса А21 – с ICAM-1), которые вызывают необратимую конверсию 160S вирионов в 135S А-частицы вследствие потери покет-фактора и капсидного белка VP4 с последующей структурной реорганизацией капсидного белка VP1 [7]. Если дезинтегрирующий рецептор экспрессирован на плазматической мембране клеток, то он может выполнять функции как связывающего, так и дезинтегрирующего рецептора. Это подтверждается спонтанной *элюцией* А-

частиц вируса полиомиелита в поддерживающую среду при заражении различных культур клеток, экспрессирующих на плазматической мембране единственный рецептор для полиовируса – PVR (CD155) [78]. Приблизительно 55% связавшегося с клетками вируса полиомиелита за 2 часа при 37°C элюирует как с клеток RD, так и с клеток HeLa. Однако, элюция эховируса 7 типа в поддерживающую среду за 2 часа при 37°C составляла приблизительно 12% на клетках RD и лишь 3% на клетках HeLa. Ультрацентрифугирование элюированных вирусов в градиенте плотности сахарозы подтвердило образование А-частиц выявлением пика радиоактивности во фракциях с коэффициентом седиментации 135S, характерным для А-частиц, как в случае полиовируса, так и в случае эховируса 7. В отличие от полиовирусов, дезинтегрирующий рецептор для эховирусов оставался неизвестным, а менее выраженная спонтанная элюция А-частиц эховируса 7 подразумевала пониженный уровень его экспрессии на плазматической мембране клеток HeLa и RD.

Эховирусы могут использовать в качестве связывающих клеточных рецепторов несколько типов молекул, биологические свойства которых представлены в открытой базе данных UniProt [113]: *фактор, ускоряющий распад компонента* – DAF (complement decay accelerating factor; UniProt: P08174) [54, 101], *протеогликан гепарансульфата* – HSPG (heparan sulfate proteoglycan; UniProt: P98160) [34, 48, 69]; *интегрин $\alpha 2\beta 1$* (integrin alpha-2/beta-1; UniProt: P17301) и *интегрин $\alpha V\beta 3$* (integrin alpha-V/beta-3; UniProt: P05106) [50, 124].

Эховирус 1 типа избирательно связывается на плазматической мембране клеток с интегрином $\alpha 2\beta 1$. Методом криоэлектронной микроскопии и 3D моделирования было показано, что $\alpha 2$ I домен этого интегрин взаимодействует с поверхностью эховируса 1 в области каньона [120]. Однако, взаимодействие эховируса 1 с растворимой формой этого домена не приводило к дезинтеграции капсида и высвобождению вирусной РНК *in vitro*. Следовательно, интегрин $\alpha 2\beta 1$ выполнял функцию связывающего рецептора.

Поликлональные антитела к интегрину $\alpha V\beta 3$ проявляли ингибирующий эффект в отношении репродукции эховирусов 7, 11, 25, 30 и 32 типа в первичной культуре клеток островков поджелудочной железы человека и в культуре клеток обезьяны (GMK) [124]. Однако, в отношении ряда других типов эховирусов ингибирующий эффект антител к интегрину $\alpha V\beta 3$ в тех же экспериментальных условиях не наблюдался.

Многие типы энтеровирусов, относящихся к виду *Enterovirus B*, включая эховирусы 2, 3, 5, 6, 9, 11, 15, 19, 25, 26 и 30 типа, способны взаимодействовать на плазматической мембране клеток RD с протеогликаном – гепарансульфатом [35, 48, 69]. Это взаимодействие не приводило к дезинтеграции эховирусов с последующим выходом геномной РНК, что предполагало функциональную роль гепарансульфата лишь на этапе связывания с клетками.

Исследования механизмов интернализации гемагглютинирующих (Daf+) эховирусов 7 и 11 типа в поляризованной культуре клеток Caco-2 показали [53, 101], что для прикрепления к клеткам эховирусы использовали связывающий рецептор DAF, причём данный рецептор обеспечивал перемещение (*сёрфинг*) вирус-рецепторных комплексов по апикальной поверхности клеток в область плотных межклеточных контактов, где происходила интернализация эховирусов. Физиологическими лигандами DAF являются полипептиды C4b и C3b системы комплемента, образующиеся у плазматической мембраны клеток при активации C4 и C3 компонентов системы комплемента. Взаимодействие DAF с клеточно-ассоциированными C4b и C3b препятствует образованию комплексов C4b2a и C3bBb, обладающих C3-конвертазной активностью, что подавляет активацию системы комплемента и повреждение клеток мембрано-атакующим комплексом [20]. Взаимодействие энтеровирусов с эритроцитарным рецептором DAF *in vitro* лежит в основе феномена гемагглютинации [78].

Описаны варианты эховирусов, взаимодействующие только с рецептором DAF, только с HSPG, с DAF и с HSPG, наряду с вариантами, не использующими ни один из них [35]. Известны субтипозные варианты эховируса 9 с различным тропизмом к интегрину $\alpha V\beta 3$ [72]. Изменение тропизма эховирусов к

связывающему рецептору DAF или к HSPG может быть обусловлено единичной аминокислотной заменой в капсидном белке [69, 84, 71]. Селекция субтиповых вариантов эховирусов с изменённым тропизмом к связывающим рецепторам способствует адаптации эховирусов к различным культурам клеток в лабораторных условиях и может происходить при репродукции эховирусов в организме человека.

1.2.2. Пути эндоцитоза вирус-рецепторных комплексов

Эховирусы не имеют *оболочки* (envelope, суперкапсида) и *фузогенных белков* (fusogenic proteins), которые у вирусов, имеющих сложную структуру, обеспечивают слияние оболочки с липидами плазматической мембраны клеток. Для входа в клетки эховирусы используют некоторые физиологические пути эндоцитоза, каждый из которых характеризуется особенностями интернализации вирус-рецепторных комплексов. За последнее десятилетие наблюдался значительный прогресс в понимании структурно-функциональных взаимодействий энтеровирусов с клеточными компонентами в процессе их интернализации и внутриклеточного трафика за счёт применения методов конфокальной микроскопии с ко-локализацией флуоресцентно меченных клеточных и вирусных белков, экзогенной экспрессии доминантно-негативных и конститутивно активных вариантов клеточных белков, блокирования отдельных путей эндоцитоза короткими интерферирующими РНК, а также за счёт применения разнообразных химических соединений – ингибиторов эндоцитоза [66].

Исследования клеточных мембран методами электронной микроскопии, липидомики и протеомики показали, что плазматическая мембрана является неоднородной и содержит кластеры липидов с более упорядоченным состоянием – так называемые *липидные плоты* (lipid rafts, рафты) [79], которые находятся в окружении неупорядоченной липидной среды. Липидными плотами называют «небольшие (10-200 нм), гетерогенные, высоко-динамичные домены,

обогащенные стеролами и сфинголипидами, которые осуществляют компартиментализацию клеточных процессов» [78, 95, 99]. Понимание того, какие домены плазматической мембраны образуют первичные эндоцитарные везикулы, имеет важное практическое значение при установлении путей эндоцитоза эховирусов, а также при использовании химических ингибиторов, нарушающих функции липидных плотов [24, 26, 90].

Логично предположить, что различные субтипичные варианты эховирусов, взаимодействующие в качестве лигандов с соответствующими связывающими рецепторами на плазматической мембране клеток (DAF, HSPG, интегринами $\alpha 2\beta 1$ или $\alpha V\beta 3$), инициируют пути эндоцитоза, свойственные конкретному рецептору.

Связывающий рецептор DAF, локализованный в липидных плотках плазматической мембраны, в физиологических условиях перемещается внутрь клеток с помощью Arf6-ассоциированного пути эндоцитоза [27, 36]. Схема внутриклеточного трафика DAF показана на рисунке 1.3.

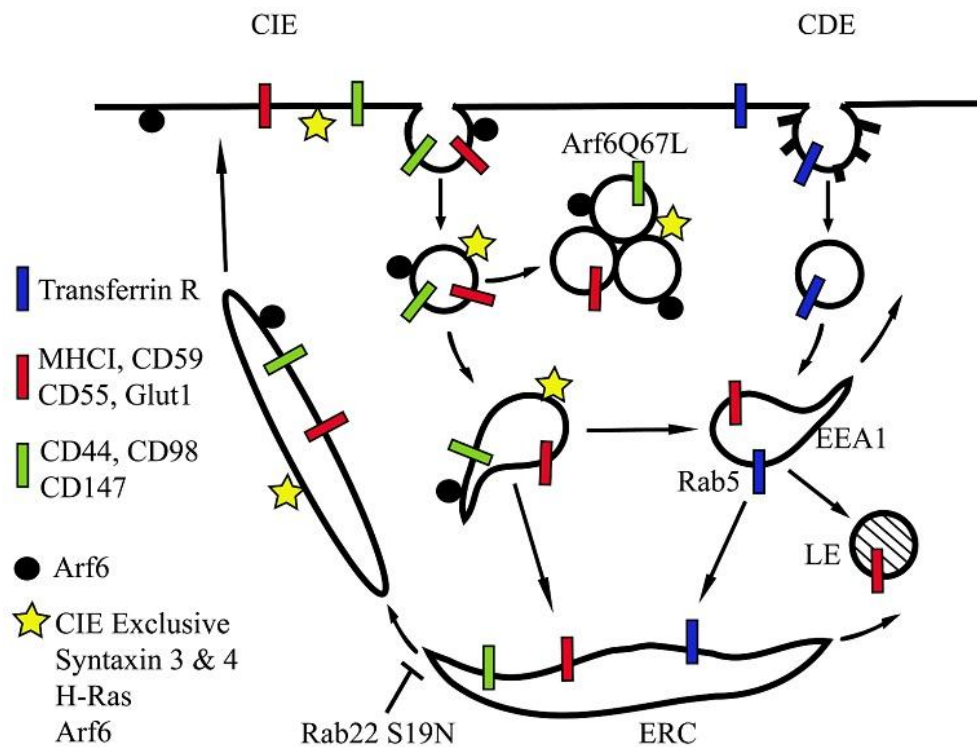


Рисунок 1.3. Схема внутриклеточного трафика рецептора DAF (CD55) после Arf6-ассоциированного эндоцитоза в клетках HeLa при экзогенной экспрессии конститутивно активной формы ГТФазы Arf6 (Arf6Q67L) [27].

Примечание: CIE – клатрин-независимый эндоцитоз (clathrin-independent endocytosis); CDE – клатрин-зависимый эндоцитоз (clathrin-dependent endocytosis); Rab5 и EEA1 – маркеры ранних эндосом; LE – поздняя эндосома (late endosome); ERC – эндоцитозный рециркулирующий компартмент (endocytic recycling compartment); Transferrin R – рецептор трансферрина.

В экспериментах с конститутивно активной мутантной формой ГТФазы Afr6 (Afr6Q67L) в клетках HeLa было показано [27], что экзогенная экспрессия мутантной формы Afr6 приводила, во-первых, к формированию вакуолярных структур, захватывающих молекулярные грузы непосредственно после их клатрин-независимой интернализации, и, во-вторых, к блокированию слияния этих структур с эндосомами, несущими антиген ранних эндосом (EEA1) и маркер клатрин-зависимого пути эндоцитоза – рецептор трансферрина. Иммуноизоляция вакуолярных структур с последующим масс-спектрометрическим анализом их состава позволили идентифицировать ряд молекулярных грузов, использующих данный путь эндоцитоза, включая DAF. С помощью антител с флуоресцентной меткой и конфокальной лазерной микроскопии была показана ко-локализация молекул DAF (CD55), CD59, MHC I и Glut1 в процессе их внутриклеточного трафика.

Функционирование липидных плотов в плазматических мембранах зависит от состояния и содержания холестерина (холестерина) в клеточных мембранах, поэтому реагенты, нарушающие функции холестерина мембран, такие как нистатин и метил-бета-циклодекстрин (MBCD) проявляют избирательную ингибирующую активность в отношении субтиповых Daf⁺ вариантов эховирусов 6 типа [59], 11 типа [106], 25 и 30 типа [124], использующих DAF в качестве связывающего рецептора. Филипин (Filipin III), также нарушающий функцию холестерина клеточных мембран, ингибировал эндоцитоз Daf⁺ эховируса 30 типа [114].

Stuart et al. [106] было показано, что подавление репродукции Daf⁺ варианта E11 нокодазолом в клетках RD сопровождалось формированием везикул с

эховирусом в периферической зоне цитоплазмы клеток (через 60 минут после заражения), в то время как без нокодазола E11 выявлялся в околоядерной зоне клеток (рисунок 1.4).

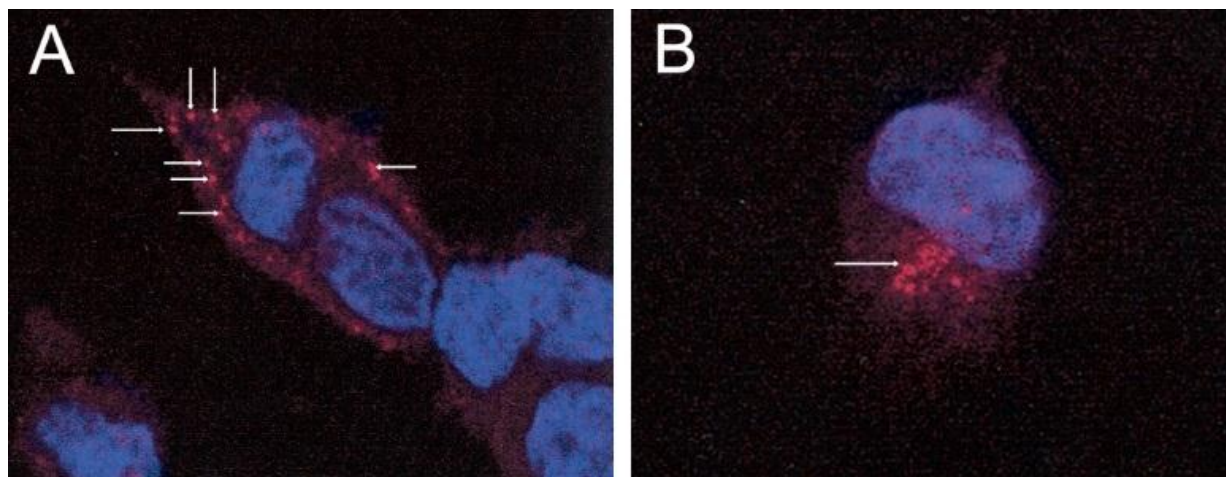


Рисунок 1.4. Формирование везикул с Daf+ вариантом эховируса 11 в периферической зоне цитоплазмы клеток RD в присутствии нокодазола [106].

(А) Везикулярные структуры (показаны стрелками) с E11 в периферической зоне цитоплазмы клеток, обработанных нокодазолом. (В) Везикулярные структуры с E11 в околоядерной зоне клеток, не обработанных нокодазолом.

Примечание: культуру клеток RD предварительно инкубировали 30 минут с нокодазолом, охлаждали до 4°C и заражали Daf+ вариантом E11 (EV11-207). Через 30 минут инкубации клетки отмывали от несвязанного вируса и нагревали до 37°C. Через 60 минут инкубации клетки фиксировали 4% формальдегидом. Для иммунофлуоресцентного обнаружения вируса использованы первичные поликлональные мышинные антитела к E11 и вторичные кроличьи анти-мышинные антитела, конъюгированные с флуорохромом Alexa Fluor®594. Ядра клеток окрашены DAPI.

Выявленный эффект нокодазола не наблюдался в отношении Daf– варианта E11, что позволило авторам работы сделать вывод о необходимости внутриклеточного транспорта везикул с Daf+ вариантом E11 в перинуклеарный компартмент для дезинтеграции капсида и высвобождения РНК.

В недавно опубликованной работе Vandesande et al. [114] также можно увидеть влияние нокодазола на локализацию везикул с Daf+ вариантом эховируса 30 в клетках RD, однако изображения были получены через 6 часов после начала

инфекции и не рассматривались авторами работы в аспекте различной локализации везикул с E30.

Установлено, что в поляризованных клетках Caco-2 уменьшение содержания холестерина в плазматической мембране с помощью MBCD (без эховирусов) приводило к агрегации DAF и интернализации агрегатов с последующим трафиком в перинуклеарную зону клеток [101]. Это объясняло пятикратное уменьшение связывания субтипového Daf⁺ варианта эховируса 11 с клетками Caco-2 в присутствии MBCD. Кроме того, в клетках Caco-2 у субтиповых Daf⁺ и Daf⁻ вариантов E11 наблюдались пространственно-временные особенности трафика, связанные с различными путями входа в клетки [101]. После прикрепления к клеткам Caco-2 при 4°C (для синхронизации начала инфекционного цикла), у обоих вариантов наблюдался диффузный характер иммунофлуоресцентного свечения на апикальной поверхности клеток (использовались антитела к белку капсида E11, меченные флуорохромом). Через 10 минут после начала инфекционного цикла (с момента нагрева клеток до 37°C), Daf⁺ вариант перемещался в область плотных контактов, а Daf⁻ вариант оставался диффузно распределённым по апикальной поверхности клеток. Через 30 минут после начала цикла оба варианта перемещались в перинуклеарную зону клеток, причем Daf⁺ вариант оставался ко-локализованным с рецептором DAF. Таким образом, несмотря на пространственно-временные различия входа субтиповых Daf⁺ и Daf⁻ вариантов E11 в клетки Caco-2 и отсутствие ко-локализации Daf⁻ варианта с DAF, через 30 минут после начала инфекционного цикла оба варианта синхронно обнаруживались в перинуклеарной зоне клеток.

Детальные исследования пути интернализации эховирусов после взаимодействия с интегрином $\alpha V\beta 3$ не проводились, хотя в культуре клеток GMK было показано ингибирующее действие нистатина на эховирусы 11, 25 и 30 типа, наряду с блокирующим эффектом антител к $\alpha V\beta 3$ [124]. Вместе с тем, интегрин $\alpha V\beta 3$ интенсивно изучался в качестве связывающего рецептора для коксакивируса A9. В частности, была установлена роль белка GRP78 (UniProt:

P11021; синонимы: ViP, HSPA5) в качестве ко-рецептора, участвующего, наряду с интегрином $\alpha V\beta 3$, в прикреплении и интернализации коксакивируса A9 в культуре клеток GMK [111]. Интернализация GRP78 в физиологических условиях происходит за счёт CLIC/GEEC пути эндоцитоза [44, 112], который является клатрин-независимым и инициируется в липидных плотках.

Эховирус 1 связывался с интегрином $\alpha 2\beta 1$ на плазматической мембране клеток Caco-2 и подвергался интернализации с помощью молекулярных механизмов, участвующих в макропиноцитозе [58]. С помощью химических ингибиторов эндоцитоза основной путь интернализации эховируса 30 в клетках RD также был интерпретирован как макропиноцитоз [114].

Исследования пути интернализации эховирусов после взаимодействия с HSPG не проводились. С помощью катионных лигандов HSPG, полиплексов и липоплексов было показано [75], что после связывания с протеогликанами гепарансульфата на плазматической мембране клеток, они поглощались путём флотиллин-зависимого эндоцитоза. В другой работе [46] с помощью наночастиц (квантовых точек), связанных с различным количеством (от 1 до 16) пептидов, соответствующих домену трансдукции в белке Tat ВИЧ-1, было показано, что на плазматической мембране клеток только поливалентные наночастицы эффективно перекрёстно связывались с протеогликанами гепарансульфата, что приводило к индукции их макропиноцитоза.

Возможность интернализации эховирусов с помощью клатрин-зависимого пути эндоцитоза была доказана различными методами для эховирусов 6 типа [59], 7 типа [54] и 11 типа [106], однако связывающий рецептор, инициирующий клатрин-зависимый эндоцитоз эховирусов, оставался неизвестным.

Более детально внутриклеточная маршрутизация эховирусов рассмотрена нами в обзоре о механизмах интернализации энтеровирусов вида В [139]. Одна из проблем, затруднявших исследования транспортных путей эховирусов, состояла в том, что не был идентифицирован клеточный рецептор, способный превращать вирионы эховирусов в А-частицы, то есть дезинтегрирующий капсид рецептор. Кроме того, представлялась актуальной задача сравнительного исследования

пропускной способности различных видов эндоцитоза [90], без решения которой невозможно ответить на вопрос о том, какой вид эндоцитоза эховирусов имеет ведущее значение при заражении конкретных типов клеток *in vitro* и *in vivo* субтипными вариантами эховирусов с различной рецепторной специфичностью.

1.2.3. Высвобождение и транслокация геномной РНК эховирусов

В настоящее время высвобождение геномной РНК энтеровирусов рассматривается как последовательность событий, происходящих под воздействием клеточных сигналов (cues), поэтапно дестабилизирующих вирион и заканчивающихся высвобождением геномной РНК в нужное время и в нужном внутриклеточном компартменте [4, 122]. Молекулярный механизм дезинтеграции капсида с высвобождением РНК эховирусов представляется аналогичным таковому у детально изученных родственных энтеровирусов (вирусов полиомиелита и риновирусов), так как они имеют сходную структуру капсида, каньон вокруг осей симметрии 5-го порядка, покет-фактор в гидрофобном кармане белка 1D (VP1) и способны к спонтанной элюции 135S А-частиц в поддерживающую среду при репродукции в культурах клеток.

Схема механизма высвобождения и транслокации РНК энтеровирусов показана на рисунке 1.5. Первым клеточным сигналом дезинтеграции капсида энтеровирусов является взаимодействие вириона с дезинтегрирующим капсид клеточным рецептором (полиовирусов – с CD155; коксакивирусов В3 – с CAR; коксакивирусов А21 – с ICAM-1) в области каньона, что приводит к сжатию гидрофобного кармана в белке 1D (VP1) и выталкиванию покет-фактора. Выход покет-фактора инициирует структурную реорганизацию вириона, проявляющуюся в увеличении диаметра капсида, в потере белка 1A (VP4), и в появлении на внешней стороне капсида N-терминальных участков капсидного белка 1D (VP1). Комплексы из шести освободившихся белков 1A (VP4) образуют трансмембранные каналы – *поры* (pore) [13, 14], а находящиеся снаружи капсида

N-терминальные участки белка 1D (VP1) заякоривают вирион в мембране эндосом.

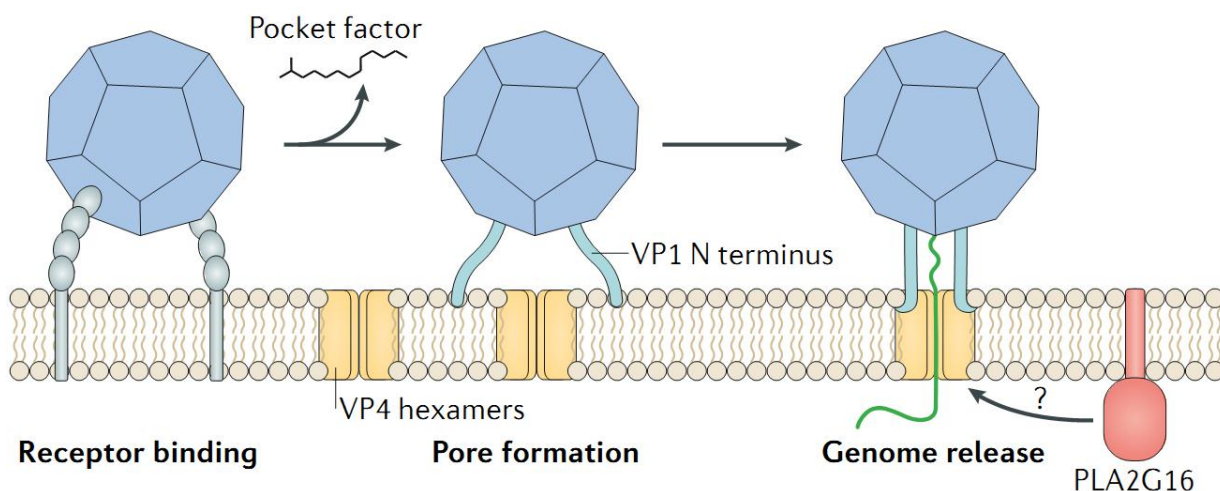


Рисунок 1.5. Механизм высвобождения и транслокации РНК энтеровирусов [4].

Примечание: Receptor binding – связывание вириона с депротенизирующим рецептором; Pore formation – формирование поры; VP4 hexamers – гексамеры капсидного белка VP4; Genome release – высвобождение геномной РНК; PLA2G16 – универсальный клеточный сигнал транслокации геномной РНК энтеровирусов; Pocket factor – покет-фактор; VP1 N terminus – N-терминальный участок капсидного белка VP1.

Затем происходит высвобождение геномной РНК из капсида и её транслокация через пору в мембране эндосомы в цитозоль. Было показано [38], что в процессе транслокации через модельные мембраны липосом и через эндосомальные мембраны внутри клеток, геномная РНК полиовирусов оставалась защищённой от деградации ко-интернализированной РНазой А. По мнению авторов исследования, полученные результаты подтверждали модель транслокации геномной РНК, согласно которой она переходит непосредственно изнутри вириона полиовируса в цитозоль через вирус-индуцированный трансмембранный канал.

Транслокация геномной РНК через пору в мембране эндосом требует участия универсального для энтеровирусов клеточного сигнала – фермента *фосфолипазы А2 из группы XVI* (PLA2G16; UniProt: P53816) [105], функционирующего в качестве сенсора в молекулярном механизме обнаружения

повышенной проницаемости (повреждения) эндосомальных мембран с участием галектина 8 (Galectin 8; UniProt: O00214). Точный механизм действия клеточного сигнала PLA2G16, способствующего транслокации энтеровирусной РНК, остаётся невыясненным.

При изучении репродукции эховируса 7 в культуре клеток Сасо-2 было показано [53], что блокирование ряда компонентов механизма аутофагии (Beclin-1, Atg12, Atg14, Atg16 или LC3) подавляло репродукцию E7 на этапе после связывания с клетками, но до этапа дезинтеграции капсида и выхода РНК. Также известно, что Atg16L связывается с фузогенным эффекторным белком снапином (snapin), который обеспечивает созревание эндосом в процессе их внутриклеточного трафика [55].

В качестве клеточного сигнала, необходимого для транслокации генома эховируса 1 через мембрану эндосом в цитоплазму клеток, рассматривались внутриклеточные кальций-зависимые цистеиновые протеазы – *кальпаины* [86]. Ингибитор кальпаинов (кальпептин) вызывал накопление E1 в эндосомах и эффективно блокировал репликацию E1 за счёт подавления протеолитического расщепления мембран мультивезикулярных телец.

Таким образом, изучение молекулярных механизмов дезинтеграции капсида с высвобождением РНК энтеровирусов способствует выявлению новых мишеней для разработки противовирусных препаратов, причём в качестве мишеней могут выступать как вирусные структуры (капсидные белки, покет-фактор), так и клеточные сигнальные молекулы.

1.2.4. Гипотеза о существовании общего дезинтегрирующего капсид рецептора для эховирусов

Mbida et al. [68] был выделен и предварительно охарактеризован в качестве предполагаемого клеточного рецептора для эховирусов гликопротеин с молекулярной массой 44 кДа – gp44. Моноклональные антитела (мАТ) к gp44 защищали культуру клеток P2002 от инфицирования практически всеми типами

эховирусов и коксакивирусом А9 [67]. Однако, сообщения о дальнейших исследованиях gp44 в доступных поисковых системах нами не были обнаружены.

Ward et al. [119] был выявлен защитный эффект МАТ к бета-2-микроглобулину (В2М; UniProt: P61769) при заражении клеток RD широким спектром типов эховирусов и коксакивирусом А9. Также было показано [117], что добавление бычьего (БСА) или человеческого (ЧСА) сывороточного альбумина в среду поддержания культуры клеток RD ингибировало её инфицирование эховирусом 7, подавляя образование А-частиц, но не препятствовало связыванию вируса с клетками. Был установлен механизм инактивации эховирусов 7 и 12 типов с помощью БСА (очищенного от глобулинов и жирных кислот), связанный с конверсией вирионов в А-частицы в результате извлечения покет-фактора [116]. Механизм протективного эффекта ЧСА, свободного от глобулинов, но не очищенного от жирных кислот, оставался неизвестным, хотя предполагалось его блокирующее действие либо на вирионы эховирусов, либо на вторичный по отношению к DAF не идентифицированный клеточный рецептор [117].

Неонатальный рецептор Fc фрагмента IgG человека (hFcRn) является трансмембранным гетеродимером, состоящим из альфа-цепи FCGRT (UniProt: P55899) и нековалентно связанного с ней бета-2-микроглобулина [81]. Молекула FCGRT у человека представлена гликопротеином, относящимся к суперсемейству иммуноглобулинов. В клетках человеческого происхождения она имеет молекулярную массу 45 кДа [129], близкую к молекулярной массе gp44, описанного ранее [68]. На поверхности клеток hFcRn выполняет функцию рецептора альбумина, а внутри клеток – функцию рецептора IgG и транспортного белка, обеспечивающего защиту IgG и альбумина от протеолитической деградации в лизосомах: либо за счёт рециркуляции связанного лиганда к плазматической мембране, либо за счёт транцитоза лиганда в поляризованных клетках [100]. Цитоплазматические домены FcRn у человека, мыши и крысы содержат консервативные аминокислотные последовательности (motifs), обеспечивающие взаимодействие FcRn с субъединицами адаптерного комплекса AP-2, участвующего в клатрин-зависимом эндоцитозе лигандов [89].

Учитывая физиологическую функцию hFcRn в качестве рецептора альбумина (что объясняло бы подавление репродукции эховирусов препаратом альбумина, очищенным от глобулинов, но не от жирных кислот), наличие В2М в составе гетеродимера hFcRn (что объясняло бы подавление репродукции эховирусов антителами к В2М в культуре клеток RD), сходство молекулярной массы FCGRT и gp44, а также защитный эффект МАТ к gp44 при заражении культур клеток практически всеми типами эховирусов и коксакивирусом А9, первой задачей диссертационной работы была проверка гипотезы о роли hFcRn в качестве общего дезинтегрирующего рецептора для эховирусов.

1.3. Методы изучения кинетики дезинтеграции капсида с высвобождением РНК эховирусов в культурах клеток

Для мониторинга сроков начала и интенсивности во времени процесса дезинтеграции капсида с высвобождением РНК вирусов полиомиелита и эховирусов в культурах клеток, применялось несколько методов: 1) измерение нарастания фоторезистентности фотосенсибилизированных полиовирусов и эховирусов; 2) мониторинг относительного содержания полных вирионов (160S), А-частиц (135S) и пустых капсидов (80S) по радиоактивности меченых капсидных белков во фракциях, полученных с помощью ультрацентрифугирования лизата клеток в градиенте сахарозы; 3) использование различий в форме начального участка графика изменения инфекционной активности в экспериментах с одиночным циклом репродукции эховирусов в культуре клеток.

Soonsawad et al. [103] использовали эховирус 1, фотосенсибилизированный нейтральным красным (NR-EV1), для заражения клеток остеосаркомы SAOS- $\alpha\beta$ 1, выращенных на покровных стеклах. Клетки инкубировали 1 час с NR-EV1 на льду для синхронизации начала инфекции, затем отмывали от несвязанного вируса и инкубировали при 37°C. Через определённые интервалы времени после заражения (p.i.) клетки подвергали воздействию белого света в течение 10 минут

при комнатной температуре, затем переносили в инкубатор при 37°C. Контрольные клетки держали в темноте в течение всего эксперимента. Через 7 часов р.і. клетки фиксировали, пермеабелизовали (удаляли липиды) и обрабатывали флуоресцентно меченными антителами к эховирусу 1. Наступление фоторезистентности эховируса оценивали по увеличению доли инфицированных (флуоресцирующих) клеток от общего количества клеток, учтённых при микроскопии (рисунок 1.6).

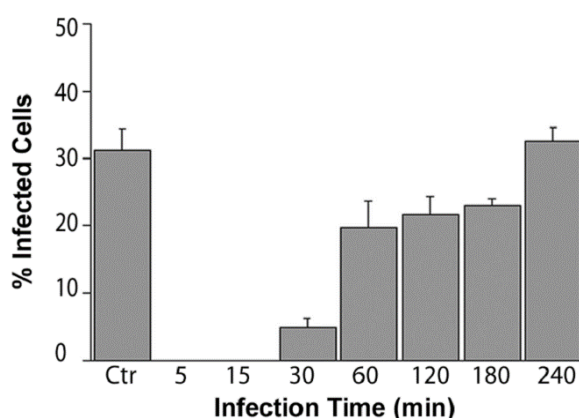


Рисунок 1.6. Мониторинг нарастания фоторезистентности эховируса 1 по увеличению доли инфицированных (флуоресцирующих) клеток через 7 часов после заражения (в процентах относительно общего количества клеток, учтённых при микроскопии) [103].

Фоторезистентность регистрировалась через 30 минут р.і., достигала плато на интервале 60-180 минут р.і. (приблизительно 80% от уровня, наблюдавшегося в контрольных клетках, инкубировавшихся в темноте) и выравнивалась с уровнем, наблюдавшимся в контрольных клетках, через 240 минут р.і.

Kim and Bergelson [54] использовали эховирус 7, фотосенсибилизированный нейтральным красным (NR-EV7). NR-EV7 адсорбировали на монослой клеток Сасо-2 при 4°C, отмывали не связавшийся вирус, монослой покрывали агаром и инкубировали при 37°C. Через заданные интервалы времени монослойные культуры подвергали воздействию света, затем продолжали инкубацию в темноте для получения бляшек. Нарастание фоторезистентности эховируса оценивали по увеличению количества учтённых бляшек после засвечивания клеточного

монослоя, относительно количества бляшек в монослойных культурах клеток без засвечивания. Результаты эксперимента показаны на рисунке 1.7.

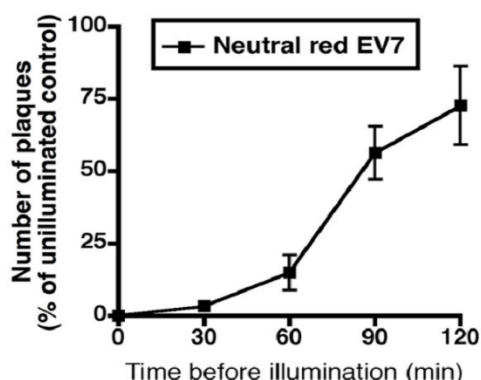


Рисунок 1.7. Мониторинг нарастания фоторезистентности эховируса 1 по увеличению количества учтённых бляшек после засвечивания монослойных культур клеток Сасо-2 относительно количества бляшек в контрольных монослойных культурах (в процентах) [53].

Примечание: по оси абсцисс – время до засвечивания (минут); по оси ординат – количество бляшек в засвеченных культурах клеток в процентах от количества бляшек в незасвеченных культурах клеток.

Фоторезистентность NR-EV7 регистрировалась уже через 30 минут р.і., а через 90 минут р.і. более 50% учтённых методом бляшек инфекционных частиц становилось фоторезистентными.

Мониторинг нарастания фоторезистентности фотосенсибилизированных эховирусов позволяет отслеживать кинетику высвобождения РНК. Однако, необходимость нормализации учитываемых результатов по контрольным культурам клеток и оценка в относительных величинах (в процентах) приводит к сужению диапазона измеряемых величин. Кроме того, мониторинг фоторезистентности, очевидно, не позволяет отслеживать предшествующее высвобождению РНК событие дезинтеграции капсида – образование А-частиц, так как в А-частицах нейтральный красный остаётся связанным с инкапсидированной РНК.

Gromeier and Wetz [37] исследовали кинетику высвобождения РНК с помощью радиоактивно меченных по $[^{32}\text{S}]$ -метионину вирусов полиомиелита 1 типа (штамм Mahoney) в монослойных культурах клеток HeLa (рисунок 1.8).

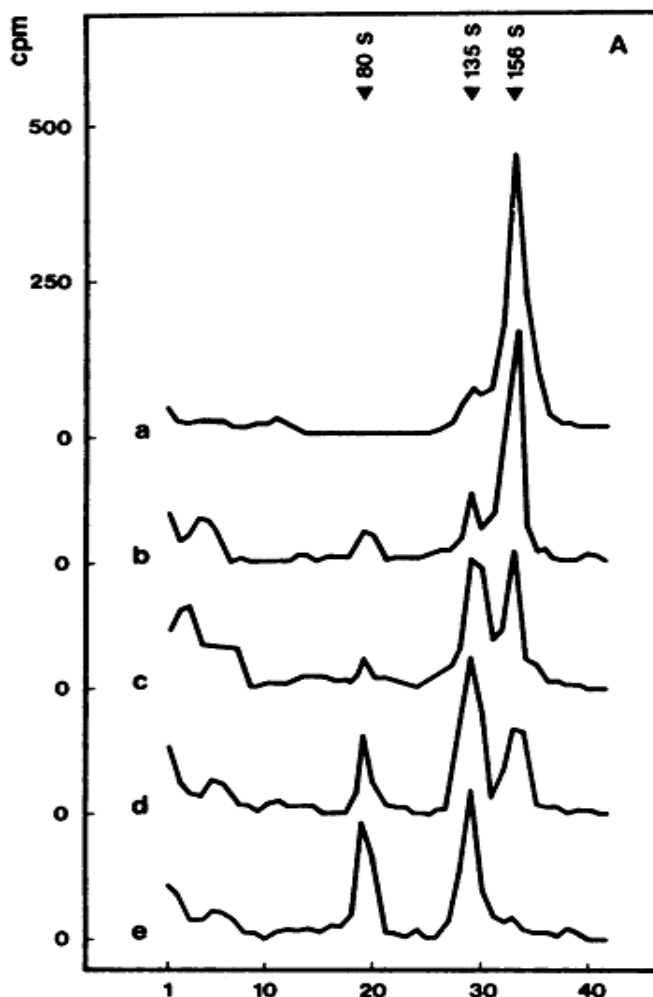


Рисунок 1.8. Кинетика высвобождения РНК полиовируса 1 типа в монослойных культурах клеток HeLa [37].

Примечание: по оси абсцисс – номера фракций, полученных ультрацентрифугированием в градиенте плотности сахарозы; по оси ординат – радиоактивность фракций (импульсов/мин). Лизаты клеток по времени p.i.: а) через 15 мин; б) через 30 мин; с) через 45 мин; д) через 60 мин; е) через 90 мин.

Начало инфекции было синхронизировано охлаждением клеток до 2°C , адсорбцию вируса проводили в течение 1 часа, отмывали несвязанный вирус и инкубировали клетки в среде поддержания при 37°C . Вирус выделяли из клеток

путем их лизиса через 15, 30, 45, 60 и 90 минут р.і., затем фракционировали лизаты ультрацентрифугированием в 10-30% градиенте плотности сахарозы, что позволяло измерять радиоактивность во фракциях 156S (полные вирионы), 135S (А-частицы) и 80S (пустые капсиды).

При лизисе клеток через 15 минут р.і., на графике (а) виден один отчётливый пик, соответствующий полным вирионам с коэффициентом седиментации 156S. При лизисе клеток через 30 минут р.і. заметно появление небольшого пика радиоактивности во фракциях, содержавших 135S А-частицы, а также появление небольшого пика радиоактивности во фракциях, содержавших 80S пустые капсиды. На графиках (с), (d) и (е), полученных через 45, 60 и 90 минут р.і., наблюдалось увеличение радиоактивности фракций с А-частицами и пустыми капсидами, наряду со снижением радиоактивности фракций с полными вирионами. Аналогичный метод был использован при изучении продукции 135S А-частиц эховирусами 7 и 11 типа в культуре клеток RD в работе [10].

Данный метод обеспечивает возможность мониторинга относительного содержания полных вирионов, А-частиц и пустых капсидов по радиоактивности их белка, однако, характеризуется значительной ресурсоёмкостью работ с радиоизотопами и градиентным ультрацентрифугированием, что затрудняет масштабирование применения этого метода.

Ward et al. [116] продемонстрировали, что различия в форме начального участка графика изменения инфекционной активности в экспериментах с одиночным циклом репродукции (ОЦР) эховируса 7 в культуре клеток RD могут быть информативны в отношении скорости дезинтеграции капсида и высвобождения РНК эховируса. Монослойные культуры клеток RD отмывали средой поддержания без сыворотки, заражали вирусом (1 ТЦД₅₀ на клетку), через 30 минут адсорбции при комнатной температуре отмывали клетки от несвязанного вируса, затем инкубировали культуры клеток при 37°C, извлекая из инкубатора и замораживая флаконы при -20°C через заданные интервалы времени. Вирус выделяли из клеток 3-кратным замораживанием и оттаиванием,

затем измеряли инфекционную активность. Результаты экспериментов показаны на рисунке 1.9.

В контрольных культурах клеток RD с поддерживающей средой без БСА, наблюдалось снижение инфекционной активности эховируса 7 в фазе эклипса (через 2 часа p.i.), отражавшее процесс дезинтеграции капсида с высвобождением РНК: образование А-частиц с низкой инфекционной активностью и высвобождение геномной РНК, которая разрушалась при лизисе клеток эндогенными РНазами.

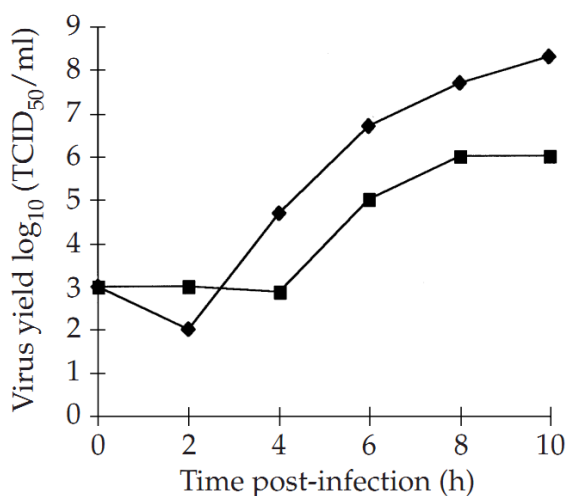


Рисунок 1.9. Изменение инфекционной активности эховируса 7 в эксперименте с одиночным циклом репродукции в культуре клеток RD в присутствии 2% БСА в поддерживающей среде (■) и без БСА (◆) [116].

В присутствии БСА в фазе эклипса не наблюдалось снижения инфекционной активности, вплоть до начала её роста через 4 часа p.i. Если через 2 часа p.i. альбумин удаляли и заменяли его на ингибитор дезинтеграции капсида эховируса 7 – роданин [15], то данное воздействие приводило к пролонгации блокирования инфекции и к такому же выходу вируса, как при воздействии только роданина. Сам по себе роданин, будучи добавлен через 2 часа p.i., не оказывал ингибирующего эффекта, поэтому данные результаты указывали на то, что стадия инфекции, блокируемая БСА, происходила в инфекционном цикле не позже, чем стадия инфекции, блокируемая роданином.

Эксперименты по аналогичной схеме с ОЦР были использованы той же группой исследователей при установлении защитного действия поликлональных антител к CD59 при заражении культур клеток RD эховирусом 7 [34]. Результаты показаны на рисунке 1.10. Как видно на иллюстрации, воздействие антител к CD59 привело к изменениям формы начального участка графика, отражавшего изменения инфекционной активности эховируса 7 в фазе эклипса, в которой происходят события образования А-частиц и высвобождения геномной РНК.

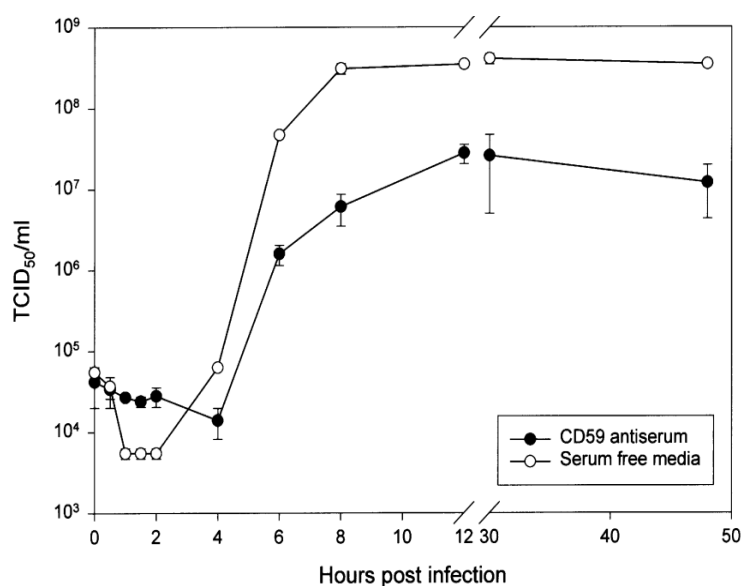


Рисунок 1.10. Изменение инфекционной активности эховируса 7 в эксперименте с одиночным циклом репродукции в культуре клеток RD в присутствии антител к CD59 (●) и без антител (○) [34].

Метод мониторинга процесса дезинтеграции капсида и выхода геномной РНК эховирусов с использованием ОЦР позволял учитывать суммарное снижение инфекционной активности в фазе эклипса за счёт образования А-частиц и высвобождения геномной РНК, характеризовался относительной простотой выполнения, но опубликованные экспериментальные данные требовали систематизации и теоретического обоснования для количественного анализа графиков ОЦР. Вышеописанные эксперименты послужили обоснованием для постановки второй задачи диссертационной работы – разработки математической модели, описывающей кинетику дезинтеграции капсида с высвобождением РНК и

инкапсидации РНК эховирусов в ОЦР, для последующей реализации модели в виде компьютерной программы.

1.4. Математическое моделирование изменения инфекционной активности вирусов в одиночном цикле репродукции

Немногочисленные работы, посвящённые математическому моделированию вклада отдельных стадий репродуктивного цикла вирусов в конечный *тайминг* (timing, сроки наступления) и продуктивность инфекции, рассмотрены в обзоре Yin and Redovich [123]. Лаборатория под руководством J. Yin в Висконсинском университете в Мэдисоне (University of Wisconsin-Madison, США) уже более 20 лет занимается разработкой математических моделей репродуктивного цикла вирусов, поэтому в данном подразделе рассмотрена эволюция концептуальных моделей, использовавшихся данной группой исследователей при создании математических моделей репродуктивного цикла различных вирусов, с особым вниманием к моделированию фазы эклипса.

В докладе, опубликованном в 2001 году и посвящённом математическому моделированию роста бактериофага T7 [125], кривая одиночного цикла репродукции (ОЦР) характеризовалась тремя параметрами: *длительностью фазы эклипса* (eclipse time), то есть периодом времени от начала инфекции до момента, когда появляется потомство фага; *скоростью роста* (rise rate), соответствующей наклону прямой линии, начинающейся от конца фазы эклипса и заканчивающейся в момент окончания лизиса бактерий; *продуктивностью инфекции* (burst size), то есть количеством фагов, производимых в среднем одной бактериальной клеткой. Концептуальная модель и результат моделирования показаны на рисунке 1.11.

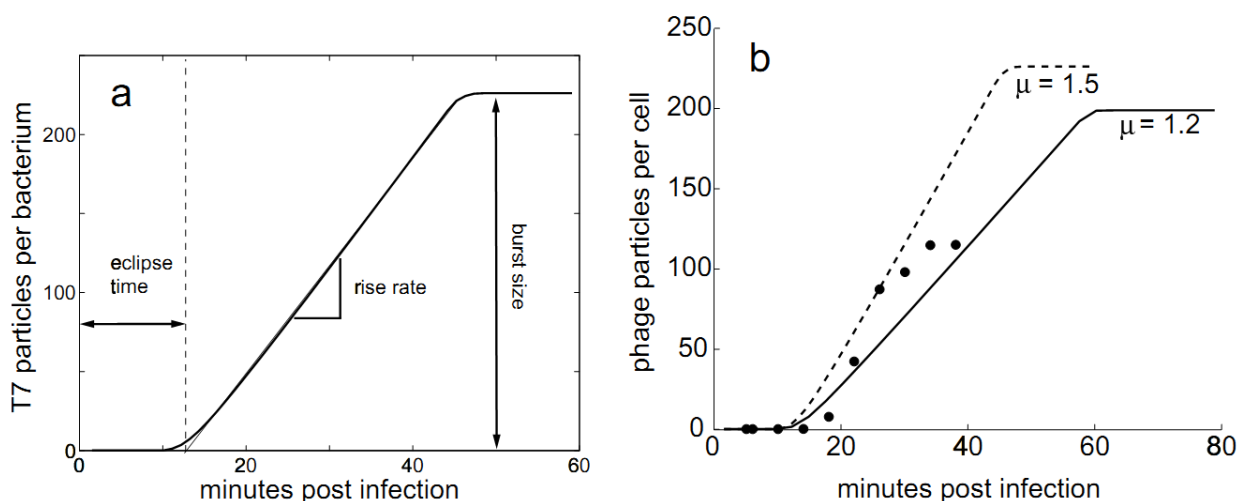


Рисунок 1.11. Концептуальная модель и результат моделирования репродуктивного цикла фага T7 [125].

Примечание: Слева показаны основные параметры модели: длительность фазы эклипса (eclipse time), скорость линейного роста (rise rate) и продуктивность инфекции (burst size). Справа показаны данные эксперимента (точки), аппроксимация экспериментальных данных (пунктирная линия) и результат математического моделирования (сплошная линия).

В данной концептуальной модели отсутствует учёт возможного снижения инфекционной активности в фазе эклипса, что было показано в экспериментах Doermann [17], выполненных на модели фага T4 и бактерий *E. coli*, в которых была впервые обнаружена фаза эклипса, характеризовавшаяся снижением инфекционной активности в экспериментальной системе ниже исходной. Положение экспериментальных точек на рисунке 1.11 (график справа) показывает наличие нелинейности на интервале роста инфекционной активности.

В 2006 году была опубликована, пожалуй, самая сложная модель ОЦР, объединившая десятки параметров внутриклеточной репродукции вируса везикулярного стоматита [61]. Однако, в разделе «Материалы и методы» подход к моделированию фазы эклипса изложен следующим образом: «Мы полагаем, что после связывания [с клеткой] вирус немедленно подвергается эндоцитозу и слиянию мембран, а его геном и белковые компоненты немедленно высвобождаются в цитоплазму».

В публикации 2012 года [109] базовая концептуальная модель не изменилась. Для интервала роста использовалась линейная функция: «Скорость роста оценивалась по наклону кривой кумулятивной продукции вируса, по трём опорным точкам, с учетом 50% уровня продуктивности. Экстраполяция линейной функции, построенной по этим точкам, на ось времени позволяла оценить латентное время, необходимое для начала высвобождения вирусного потомства».

В публикации 2015 года [110] упомянута экспоненциальная функция при моделировании продукции мРНК вируса везикулярного стоматита: «Уровни мРНК во времени описывали с использованием модели, основанной на уровнях [концентрации] геномной [РНК], причем уровни геномной [РНК] описывали с использованием эмпирической экспоненциальной реакции, реакции распада второго порядка и задержки по времени. Мы выбрали такую структуру модели, так как она обеспечивала наименьшую ошибку при сравнении с другими похожими моделями методом наименьших квадратов».

В другой работе 2015 года [1] экспоненциальная функция явно указана в концептуальной модели при описании кинетических параметров ОЦР вируса везикулярного стоматита в отдельной (единичной) клетке (рисунок 1.12).

Экспоненциальная скорость роста вычислялась с помощью аппроксимации экспериментальных данных экспоненциальной функцией ($Yield = A e^{(Rise\ rate \times Time)}$) за начальный 1,5 часовой период роста, с учётом фонового уровня. Окончание периода роста определялось как достижение уровня флуоресценции репортерного красного флуоресцирующего белка (встроенного в геном вируса везикулярного стоматита), соответствующего 0,85 уровня максимальной интенсивности флуоресценции единичной клетки.

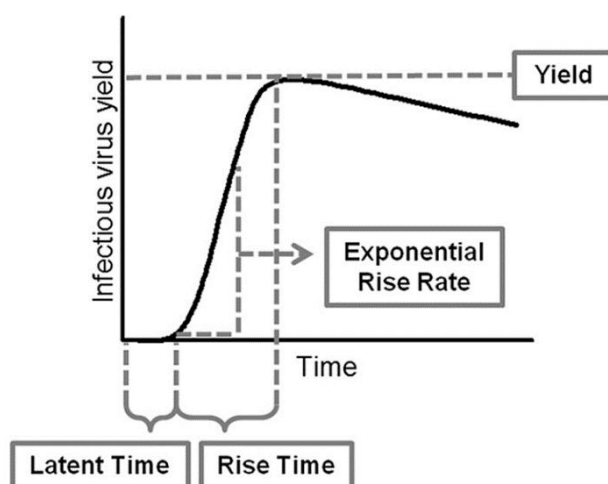


Рисунок 1.12. Кинетические параметры одиночного цикла репродукции вируса в единичной клетке [1].

Примечание: По оси ординат – урожай инфекционного вируса (Yield); по оси абсцисс – время (Time); Latent Time – латентный период времени; Rise Time – период роста; Exponential Rise Rate – экспоненциальная скорость роста.

Таким образом, концептуальные модели в исследованиях, посвящённых математическому моделированию репродуктивного цикла бактериофага T7 и вируса везикулярного стоматита, не учитывали возможность снижения инфекционной активности в фазе эклипса. Так как в экспериментах с ОЦР эховирусов такое снижение наблюдалось и имело важное значение для оценки кинетики дезинтеграции капсида с высвобождением РНК эховирусов, то второй задачей диссертационной работы стала разработка математической модели ОЦР эховирусов, учитывающей снижение инфекционной активности в фазе эклипса.

1.5. Заключение по обзору литературы

Эховирусы характеризуются вариабельностью рецепторной специфичности по отношению к связывающим клеточным рецепторам, поэтому являются удобной экспериментальной моделью для изучения различных путей входа энтеровирусов в клетки. Одна из проблем, затруднявшая изучение путей входа эховирусов в клетки, состояла в том, что не был идентифицирован клеточный

рецептор, способный превращать вирионы эховирусов в А-частицы, то есть дезинтегрирующий рецептор.

Учитывая физиологическую функцию неонатального рецептора Fc фрагмента иммуноглобулинов класса G человека (hFcRn) в качестве рецептора альбумина (что объясняло бы подавление репродукции эховирусов в культуре клеток RD препаратом альбумина, очищенным от глобулинов, но не от жирных кислот); наличие бета-2-микроглобулина (B2M) в составе гетеродимера hFcRn (что объясняло бы подавление репродукции эховирусов антителами к B2M в культуре клеток RD); сходство молекулярной массы FCGRT (альфа-цепи hFcRn) и gp44; а также защитный эффект моноклональных антител к gp44 при заражении культур клеток P2002 практически всеми типами эховирусов и коксакивирусом A9; первой задачей диссертационной работы была проверка гипотезы о роли hFcRn в качестве общего дезинтегрирующего капсид рецептора для эховирусов.

Учитывая вариабельность рецепторной специфичности эховирусов по отношению к связывающим клеточным рецепторам и важную роль связывающих рецепторов в инициации различных путей входа эховирусов в клетки, представляли интерес сравнительные исследования пропускной способности различных транспортных путей в отдельных типах клеток. Без решения этой задачи невозможно ответить на вопрос о том, какой вид эндоцитоза эховирусов имеет ведущее значение при заражении конкретных типов клеток *in vitro* и *in vivo* субтиповыми вариантами эховирусов с различной рецепторной специфичностью.

Мониторинг процесса дезинтеграции капсида с выходом РНК эховирусов с использованием одиночного цикла репродукции (ОЦР) позволял учитывать суммарное снижение инфекционной активности в экспериментальной системе в фазе эклипса за счёт образования А-частиц и высвобождения геномной РНК, характеризовался относительной простотой выполнения, но опубликованные экспериментальные данные требовали систематизации и теоретического обоснования для количественного анализа графиков ОЦР. Немногочисленные опубликованные работы, посвящённые математическому моделированию вклада отдельных стадий репродуктивного цикла других вирусов в конечный тайминг

(сроки наступления) и продуктивность инфекции, не учитывали возможность снижения инфекционной активности в фазе эклипса. Поэтому второй задачей диссертационной работы являлась разработка математической модели, описывающей кинетику дезинтеграции капсида с высвобождением РНК и инкапсидации РНК эховирусов в ОЦР, и технического задания по реализации модели в виде программного обеспечения для ЭВМ.

После разработки математической модели ОЦР эховирусов, необходимо было проверить её адекватность для выполнения третьей задачи диссертационного исследования: сравнительного изучения кинетики дезинтеграции капсида с высвобождением РНК эховирусов, взаимодействующих с различными связывающими клеточными рецепторами и использующих различные транспортные пути в клетки, применяя известные химические ингибиторы репродукции эховирусов (роданин, нистатин и нокодазол).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Реактивы и материалы

Культуральные питательные среды, растворы и реактивы производства «ПанЭко» (РФ): среда Игла MEM; среда DMEM/F-12; среда 199; раствор трипсина-ЭДТА 0,25% с солями Хенкса; раствор Эрла, фосфатно-солевой буфер pH 7,4; трипановый синий; пенициллин (1000000 ЕД); гентамицин (1000х) в растворе 10 мг/мл.

Эмбриональная телячья сыворотка производства «Biosera» (Франция), каталожный номер (кат. №) FB-1001/500.

Реактивы производства «Merck / Sigma-Aldrich» (Германия / США):

1) Человеческий сывороточный альбумин, очищенный от глобулинов (Human serum albumin essentially globulin free), каталожный номер A8763 (HSA-GF);

2) Человеческий сывороточный альбумин, очищенный от глобулинов и жирных кислот (Human serum albumin essentially globulin free, fatty acids free) каталожный номер A3782 (HSA-FF);

3) Роданин (Rhodanine), кат. № 118192-25G;

4) Нистатин (Nystatin), кат. № N6261;

5) Нокодазол (Nocodazole), кат. № M1404;

6) Тритон X-100 (Triton X-100), кат. № T8787;

7) Твин 80 (Tween 80), кат. № P1754;

8) Бычий сывороточный альбумин (Bovine serum albumin), кат. № 05470;

9) Диметилсульфоксид (ДМСО), (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 99%, кат. № 485519;

10) Кристаллический фиолетовый (Crystal Violet) кат. № 61135.

Первичные антитела производства «Sino Biological» (КНР): очищенные кроличьи поликлональные антитела (пАТ) класса IgG к гетеродимеру человеческого FCGRT с бета-2-микроглобулином (B2M), кат. № СТ009-T08, полученные иммунизацией кроликов рекомбинантным человеческим гетеродимером FCGRT с B2M, очищенные аффинной хроматографией; получены в стерильной жидкой форме, без консерванта.

Вторичные антитела для иммунофлуоресцентной микроскопии производства «Abcam» (Великобритания): ослиные поликлональные анти-кроличьи IgG антитела, конъюгированные с флуорохромом Alexa Fluor® 647 (кат. № ab150075).

Пластиковая культуральная посуда производства «Corning» (США): 96-луночные (кат. № REF3598) и 48-луночные (кат. № 30048) культуральные пластиковые планшеты с плоским дном; культуральные флаконы с площадью 25 см² (кат. № 430639).

Пластиковые планшеты для иммунологических реакций с U-образным дном («Медполимер», РФ)

Ацетон (осч) кат. № 67-64-1 («Экос 1», РФ); спирт этиловый 95% кат. № 003811 (ООО «БиоФармКомбинат», РФ).

2.1.2. Культуры клеток

В работе использовали перевиваемую линию клеток RD (клетки рабдомиосаркомы человека), которая была получена из ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области» Роспотребнадзора. Культура клеток MDCK (линия клеток почки собаки) 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.

2.1.3. Вирусы

В экспериментах были использованы ранее полученные и охарактеризованные [71] родственные клоны 431-1 и 431-6 эховируса 11 (E11). Гемагглютинирующий (*daf+*) клон 431-1 вируса E11, использующий DAF в качестве связывающего (первичного) клеточного рецептора, и негемагглютинирующий (*daf-*) клон 431-6 вируса E11, не использующий клеточный рецептор DAF, структурные белки которых отличались единственной аминокислотной заменой (T165A) в капсидном белке VP2 – в области контактной площадки вириона с рецептором DAF.

Штаммы и клоны энтеровирусов вида В, использованные в работе, представлены в таблице 2.1. Все перечисленные клинические изоляты были выделены на клетках RD в лаборатории энтеральных вирусных инфекций «ЕНИИВИ» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора из ликвора больных энтеровирусным менингитом. Генотипирование изолятов проводилось по двум фрагментам структурной части генома энтеровирусов, кодирующим капсидные белки VP1 и VP4-VP2, в соответствии с описанными ранее методиками [4, 74] и патентом [136].

Таблица 2.1. Типы, штаммы и клоны энтеровирусов, использованные в экспериментах.

Тип энтеровируса (аббревиатура ICTV)	Номер штамма (клона)	Daf фенотип	Идентификатор нуклеотидной последовательности GenBank (Accession Number)
1	2	3	4
echovirus 3 (E3)	206	Daf+	MK962649, MK962655
echovirus 9 (E9)	8100	Daf-	MK962651, MK962657

Продолжение таблицы 2.1

1	2	3	4
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

2.2. Методы

2.2.1. Культивирование клеток

Для проведения экспериментов клетки выращивали в культуральных пластиковых флаконах (Corning, США) с площадью монослоя 25 см² и в культуральных пластиковых 96-луночных и 48-луночных планшетах (Corning, США) при 37°C в атмосфере 5% CO₂ до образования плотного монослоя.

Для линии клеток RD в качестве ростовой среды использовали среду Игла MEM (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) и антибиотики: пенициллин – 100 ЕД/мл и гентамицин – 20 мкг/мл (конечные концентрации). При пересевах клетки снимали с пластика раствором трипсина-ЭДТА 0,25% с солями Хенкса (ПанЭко, РФ). При пересевах суспензию клеток разводили питательной средой в 4-5 раз по сравнению с исходным объёмом среды. В качестве среды поддержания использовали среду 199 (ПанЭко, РФ) с антибиотиками, но без добавления сыворотки.

2.2.2. Оценка инфекционной активности вирусов

Инфекционную активность вирусосодержащих жидкостей (ВСЖ) определяли методом конечных разведений на культуре клеток RD, выращенной в 96-луночных культуральных планшетах. Состояние монослоя и цитопатический эффект (ЦПЭ) учитывали с помощью инвертированного микроскопа «Olympus» ежедневно, окончательный учёт результатов проводили на 5-е сутки, после фиксации монослоя 95% раствором этилового спирта и последующей окраски 0,5% раствором кристалвиолета. Для каждого разведения ВСЖ использовали не менее 8 реплик. Инфекционный титр ВСЖ рассчитывали по формуле Спирмена-Кербера (Spearman-Karber) с расчётом суммарной аналитической погрешности [45]. Инфекционную активность ВСЖ выражали в $lg(TЦД_{50}/мл)$ – десятичных логарифмах величин 50% тканевой цитопатогенной дозы в 1 мл.

Определение инфекционной активности ВСЖ методом бляшек под агаровым покрытием проводилось на клетках RD, выращенных в культуральных флаконах, по описанной ранее методике [134].

2.2.3. Оценка гемагглютинирующей активности вирусов

Гемагглютинирующую активность вирусов определяли микрометодом в 96-луночных планшетах с U-образным дном с использованием последовательных двукратных разведений ВСЖ в 50 мкл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) pH 7,4 с 0,05% (вес/объём) бычьим сывороточным альбумином (БСА) [92, 134]. Эритроциты человека группы крови 0(I)Rh+ трёхкратно отмывали стерильным физиологическим раствором (1:10 объём/объём), готовили 0,75% взвесь эритроцитов в ФСБ и добавляли по 50 мкл взвеси к разведениям вируса в планшете. После встряхивания планшет инкубировали при 4⁰C в течение часа, затем учитывали результат реакции по 4-плюсовой шкале [129] в гемагглютинирующих единицах (ГАЕ), то есть в величинах, обратных

максимальным двукратным разведениям ВСЖ, в которых наблюдалась гемагглютинация не менее чем на 2 плюса.

2.2.4. Исследование вирус-инактивирующего действия препаратов человеческого сывороточного альбумина

Для исследования вирус-инактивирующего действия растворов человеческого сывороточного альбумина HSA-GF (Merck/Sigma-Aldrich, Германия, кат. № А8763) и HSA-FF (Merck/Sigma-Aldrich, Германия, кат. № А3782), к 100 мкл ВСЖ, содержащей 200 ТЦД₅₀ соответствующего вируса, добавляли 100 мкл 8% (вес/объём) раствора альбумина HSA-GF или HSA-FF в среде 199 для получения конечной концентрации 4% (величина 40 г/л находится внутри интервала физиологической нормы концентрации альбумина в сыворотке крови человека), перемешивали на вортексе и инкубировали 60 минут при 37⁰С (период времени, использованный при заражении культур клеток RD в экспериментах по исследованию защитного действия альбумина). Контрольные пробы ВСЖ инкубировали в тех же условиях, но к ВСЖ добавляли 100 мкл среды 199 без альбумина. После инкубации остаточную инфекционную активность вирусов определяли методом конечных разведений на клетках RD в 96-луночных планшетах.

2.2.5. Непрямая иммунофлуоресцентная микроскопия

Все этапы иммуноцитохимической окраски, а также анализ флуоресценции проводили на клетках RD и MDCK, выращенных в 48-луночных планшетах (Corning, США). Клетки фиксировали охлаждённым до –20⁰С ацетоном в течение 30 мин при 4⁰С и пермеабелизовали (удаляли липиды) 15 минут при 22⁰С в ФСБ (ПанЭко, РФ) с добавлением 0,5% Triton X-100 (Merck/Sigma-Aldrich, Германия) и 1% БСА (Merck/Sigma-Aldrich, Германия) в конечной концентрации. Затем клетки отмывали 3 раза ФСБ с 0,5% БСА и инкубировали с первичными антителами в

течение 18 часов при 4°C. В качестве первичных антител использовали пАТ СТ009-T08 (Sino Biological, КНР) или мАТ СТ009-R110 (Sino Biological, КНР) в конечной концентрации 10 мкг/мл. По окончании инкубации с первичными антителами, клетки трижды отмывали ФСБ с 0,5% БСА (с временем выдержки 5, 15 и 25 минут), затем инкубировали 1 час при 22°C без доступа света со вторичными Alexa Fluor® 647-конъюгированными ослиными поликлональными анти-кроличьими IgG антителами ab150075 (Abcam, Великобритания) в концентрации 2 мкг/мл. Клетки RD, обработанные только антителами ab150075, конъюгированными с Alexa Fluor® 647, использовали для контроля фонового уровня флуоресценции. Культуру клеток MDCK использовали в качестве негативного контроля отсутствия целевого антигена (по причине отсутствия человеческого рецептора hFcRn). Так как ядра клеток не окрашивали, то, для локализации специфической флуоресценции в клетках, изображения, полученные с помощью световой микроскопии, конвертировали в полупрозрачные слои, которые позиционировали над фоновыми изображениями, полученными при флуоресцентной микроскопии того же самого поля зрения.

2.2.6. Исследование протективного эффекта человеческого сывороточного альбумина при заражении культур клеток RD энтеровирусами вида В

В экспериментах по ингибированию репродукции вирусов с помощью HSA-GF (Merck/Sigma-Aldrich, Германия, кат. № A8763) использовали культуры клеток RD, выращенные в 96-луночных планшетах (Corning, США). В предварительных экспериментах было установлено, что HSA-GF в конечных концентрациях от 0,25% до 4% (вес/объём) не оказывал цитотоксического действия в течение 5-суточного периода наблюдения. Для обнаружения зависимости протективного эффекта от концентрации альбумина, использовали одинаковые заражающие дозы вирусов (100 ТЦД₅₀ на лунку) и различные концентрации альбумина, полученные 2-кратными разведениями в среде 199. После удаления среды роста,

клеточный монослой однократно промывали средой 199, затем вносили в лунки планшета по 100 мкл среды 199 с различными концентрациями HSA-GF. Инкубировали планшеты 60 мин при 37⁰С, затем в лунки вносили по 100 мкл ВСЖ, содержащей 100 ТЦД₅₀ соответствующего вируса (множественность заражения составляла 0,001 ТЦД₅₀ на клетку). Для учёта цитопатического эффекта (ЦПЭ) вирусов, в контрольные лунки вместо раствора альбумина вносили 100 мкл среды 199. Для учёта состояния клеточного монослоя, в контрольные лунки вместо ВСЖ и раствора альбумина вносили 200 мкл среды 199. Каждую конечную концентрацию HSA-GF (4%, 2%, 1%, 0,5% и 0,25%) исследовали в 8 репликах в двух повторах эксперимента с каждым вирусом. В ходе экспериментов ЦПЭ ежедневно оценивали с помощью инвертированного микроскопа, окончательный учёт результатов проводили на 5-е сутки после фиксации монослоя 95% раствором этилового спирта и последующей окраски 0,5% раствором кристалвиолета. Степень ЦПЭ оценивали по доле клеток в монослое с характерными для эховирусов признаками цитопатологии по условной четырёх-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, указанными в разделе 2.2.10.

2.2.7. Исследование протективного эффекта поликлональных и моноклональных антител к hFcRn при заражении культур клеток RD энтеровирусами вида В

Эксперименты по ингибированию репродукции вирусов с помощью пАТ СТ009-Т08 (Sino Biological, КНР) и мАТ СТ009-Р110 (Sino Biological, КНР) к hFcRn были выполнены на культуре клеток RD в 96-луночных планшетах (Corning, США). В предварительных экспериментах было показано, что пАТ и мАТ в концентрациях от 0,15 до 10 мкг/мл не оказывали цитотоксического действия на клетки в течение 5-суточного периода наблюдения. Для обнаружения

протективного эффекта использовали одинаковые заражающие дозы вирусов (100 ТЦД₅₀ на лунку) и различные концентрации антител в среде 199. После удаления среды роста, клеточный монослой однократно промывали средой 199, затем в лунки вносили по 50 мкл растворов антител в различных концентрациях и инкубировали 1 час при 37⁰С. После этого в каждую лунку с раствором антител вносили по 50 мкл ВСЖ, содержащей 100 ТЦД₅₀ соответствующего вируса (множественность заражения 0,001 ТЦД₅₀ на клетку). Каждую конечную концентрацию антител (10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,6 и 0,3 мкг/мл) тестировали в 8 репликах с каждым вирусом в двух независимых экспериментах. В лунки с положительным контролем ЦПЭ вируса вносили по 50 мкл ВСЖ и 50 мкл среды 199 без антител. Для контроля цитотоксичности антител, вместо ВСЖ в лунки вносили 50 мкл среды 199 и 50 мкл раствора антител. Для мониторинга состояния клеточного монослоя, в контрольные лунки вносили 100 мкл среды 199. Контроль отсутствия неспецифического вируснейтрализующего действия ПАТ (10,0 мкг/мл) и МАТ (80,0 мкг/мл) проводили по схеме эксперимента, описанной в подразделе 2.2.4. Методика учета ЦПЭ описана в подразделе 2.2.6.

2.2.8. Изучение изменения инфекционной активности эховируса 11 в одиночном цикле репродукции на чувствительных клетках

Монослойные культуры клеток RD и Л-41 КД/84 выращивали до плотного монослоя в культуральных флаконах с рабочей площадью 25 см² (Corning, США). Для синхронизации начала инфекционного цикла, после замены среды роста на среду поддержания, клетки охлаждали 20 минут при температуре 4⁰С. Затем, после удаления среды поддержания, во флаконы вносили по 400 мкл ВСЖ из расчёта множественности заражения 10 ТЦД₅₀ на клетку. Флаконы инкубировали на платформе покачивателя при 4⁰С 45 минут, затем тщательно удаляли инокулят и отмывали монослой от несвязавшегося вируса охлаждённой до 4⁰С средой поддержания трёхкратно по 15 мл. Вносили во флаконы по 5 мл среды поддержания комнатной температуры и нагревали в термостате каждый флакон

до 37⁰С. Через 0, 30, 60, 120, 180, 210, 240, 300, 420 минут инфекционный цикл останавливали, замораживая флаконы при –70⁰С.

Ранее нами было показано, что применение детергента Tween 80 повышало величины инфекционной активности, определяемые методом конечных разведений в пробах эховируса 11, полученных в начальной стадии одиночного цикла репродукции [140]. После трёхкратного замораживания и оттаивания флаконов с клетками и вирусом, для определения инфекционной активности к 315 мкл ВСЖ добавляли 35 мкл 4% (объём/объём) Tween 80 (Merck/Sigma-Aldrich, Германия). Конечная концентрация детергента (0,4%) превышала указанную производителем критическую концентрацию мицеллообразования (0,168%), что обеспечивало оптимальные условия для солюбилизации белков и липидов. 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 поддерживающей средой до конечной концентрации детергента 0,004%. В предварительных экспериментах данная концентрация Tween 80 была определена как нетоксичная для культур клеток RD по отсутствию визуальных признаков цитопатологии при наблюдении в течение 5 суток.

2.2.9. Изучение влияния ингибиторов репродукции эховируса 11 на изменения инфекционной активности в одиночном цикле репродукции в культуре клеток RD

При изучении влияния ингибиторов репродукции (роданин, нистатин, нокодазол) эховируса 11 на кинетику инфекционной активности в одиночном цикле репродукции в культуре клеток RD, исследуемый ингибитор присутствовал в среде поддержания и в ВСЖ в максимальной нетоксичной концентрации на всех этапах эксперимента. Максимальная конечная концентрация ингибиторов предварительно проверялась на отсутствие цитотоксического действия. Цитотоксическое действие ингибиторов определяли для различных концентраций, использовавшихся по данным литературы в аналогичных

исследованиях, в интервале от максимальной до минимальной концентрации с двукратным шагом разведения. Жизнеспособность клеток оценивали методом прижизненного окрашивания трипановым синим через 72 часа [142].

Роданин (Merck/Sigma-Aldrich, Германия) растворяли в среде 199 и использовали в конечной концентрации 100 мкг/мл [55].

Нистатин (Merck/Sigma-Aldrich, Германия) растворяли до концентрации 5 мг/мл в 99% ДМСО. Конечная концентрация нистатина в экспериментах составляла 25 мкг/мл [97, 106].

Нокодазол (Merck/Sigma-Aldrich, Германия) растворяли в 99% ДМСО в концентрации 10 мг/мл, для полного растворения препарата проводили нагрев. Конечная концентрация нокодазола в экспериментах составляла 1,8 мкг/мл [62, 121].

2.2.10. Статистические методы обработки результатов

Суммарную аналитическую погрешность определения инфекционного титра вирусов по формуле Спирмена-Кербера рассчитывали по методике [45]. Статистически достоверные различия между экспериментальными группами определяли методами дисперсионного анализа ANOVA [119] или с помощью непараметрического U теста Манна-Уитни (Mann-Whitney U test) [28]. Различия считали статистически значимыми при величинах P менее 0,05.

2.2.11. Разработка математической модели, описывающей кинетику дезинтеграции капсида с высвобождением РНК и инкапсидации РНК эховирусов в одиночном цикле репродукции, и технического задания по реализации модели в виде программного обеспечения для ЭВМ

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. Основными этапами разработки модели в рамках диссертационной работы являлись: 1) разработка концептуальной модели, 2) математическая постановка задачи моделирования; 3) тестирование реализованной математической модели в виде программы для операционной системы Windows.

Объектом моделирования являлись изменения инфекционной активности эховирусов в экспериментах с ОЦР и преждевременным лизисом клеток. Схема экспериментов позволяет отслеживать кинетику снижения инфекционной активности в начальной фазе инфекционного цикла (в фазе эклипса), а также кинетику увеличения инфекционной активности в фазе созревания.

Задачей математической модели являлся подбор двух логистических функций, сумма значений которых приближалась бы к экспериментальной кривой. Убывающая логистическая функция соответствует процессу дезинтеграции исходных (родительских) вирионов, которая сопровождается убыванием инфекционной активности в экспериментальной системе. Возрастающая логистическая функция соответствует процессу инкапсидации вирусной РНК при сборке новых вирионов и сопровождается возрастанием инфекционной активности в экспериментальной системе.

Программная реализация модели выполнена А.В. Хозовым на языке программирования C#, на платформе .NET Framework 4.8, для IBM-совместимых компьютеров с операционной системой Windows 10.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Определение роли неонатального рецептора Fc фрагмента иммуноглобулинов класса G человека в качестве общего дезинтегрирующего капсид рецептора для эховирусов и коксакивируса A9

Для определения роли hFcRn в качестве общего дезинтегрирующего капсид рецептора эховирусов и коксакивируса A9 было необходимо:

1) Показать специфичность и избирательность подавления репродукции эховирусов и коксакивируса A9 за счет блокирования hFcRn с помощью его физиологического лиганда (человеческого альбумина [102]) и антител к рецептору, проявляющих защитный эффект при заражении клеток данными вирусами;

2) Показать защитный эффект человеческого альбумина и антител к hFcRn при заражении клеток близкородственными эховирусами, имеющими одинаковую структуру в типичном для энтеровирусов сайте связывания с дезинтегрирующими капсид рецепторами (в каньоне вокруг осей симметрии 5-го порядка), но различную поверхностную структуру вирионов в сайте связывания с рецептором DAF (вблизи осей симметрии 2-го порядка).

Учитывая данные литературы о вирус-инактивирующем действии бычьего сывороточного альбумина, очищенного от глобулинов и жирных кислот, в отношении эховирусов 7 и 12 типа [116], для доказательства специфичности блокирования рецептора hFcRn альбумином, было показано отсутствие вирус-инактивирующего действия у препарата альбумина, очищенного от глобулинов, но не очищенного от жирных кислот (HSA-GF), а также подтверждено вирус-инактивирующее действие у препарата альбумина, очищенного от глобулинов и жирных кислот (HSA-FF), в отношении эховирусов 11 типа.

Для подтверждения экспрессии hFcRn в культуре клеток RD и проверки функциональной активности антител, была использована непрямая

иммунофлуоресцентная микроскопия с первичными поликлональными (пАТ) и моноклональными (мАТ) антителами к hFcRn и вторичными анти-IgG антителами, конъюгированными с флуорохромом. Негативный контроль специфичности первичных антител выполнен иммунофлуоресцентным методом на культуре клеток MDCK. Также было показано отсутствие вируснейтрализующего действия растворов пАТ и мАТ, что подтвердило отсутствие взаимодействия данных антител с эховирусами.

Для подтверждения избирательности блокирующего действия HSA-GF и пАТ в отношении рецептора для эховирусов и коксакивируса A9, культуры клеток RD заражали коксакивирусами В4 и В5 типа, использующими дезинтегрирующий капсид рецептор CAR (коксакивирусный и аденовирусный рецептор), с которым эховирусы не взаимодействуют [83].

Для подтверждения взаимодействия hFcRn с каньоном на поверхности вириона эховирусов, были использованы два близкородственных клона эховируса 11 (*daf*⁺ клон 431-1 и *daf*⁻ клон 431-6), имевшие одинаковую структуру каньона, но отличающуюся поверхностную структуру в сайте связывания с рецептором DAF [73].

3.1.1. Исследование протективного эффекта альбумина при заражении культур клеток RD энтеровирусами вида В

3.1.1.1. Отсутствие вирус-инактивирующего действия препарата сывороточного альбумина, очищенного от глобулинов

Результаты проверки вирус-инактивирующего действия растворов человеческого сывороточного альбумина (ЧСА), очищенного от глобулинов (HSA-GF), и ЧСА, очищенного от глобулинов и жирных кислот (HSA-FF), на клонированные *daf*⁺ и *daf*⁻ варианты E11 представлены в Таблице 3.1. Конечная концентрация альбумина (4%) соответствовала физиологической концентрации альбумина в сыворотке крови человека, а длительность предварительной

инкубации вирусов в растворе альбумина (1 час) до заражения клеток соответствовала периоду адсорбции вирусов при заражении культур клеток RD в экспериментах по исследованию протективного эффекта альбумина.

Таблица 3.1. Исследование инактивирующего действия препаратов альбумина (HSA-GF и HSA-FF) в отношении клонированных вариантов эховируса 11 с разной рецепторной специфичностью.

Клоны эховируса 11 (<i>daf</i> генотип)	Инфекционная активность $lg(TICD_{50})/мл$ ($M \pm s$) ¹		
	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:

¹ М – средняя величина инфекционной активности; s – стандартная ошибка средней величины

Полученные результаты свидетельствовали об отсутствии вирус-инактивирующего действия раствора HSA-GF в отношении клонированных вариантов E11, в то время как раствор HSA-FF в условиях эксперимента полностью инактивировал оба клона E11.

Ward et al. [116] был установлен механизм инактивации вирусов E7 и E12 в присутствии бычьего сывороточного альбумина (БСА), очищенного от глобулинов и жирных кислот, обусловленный извлечением гидрофобного покет-фактора из вирионов, что приводило к превращению вирионов в А-частицы. Данный механизм инактивации с помощью БСА был подтвержден и для других энтеровирусов вида В: E1, CVA9 [88] и CVB3 [9]. Тем не менее, механизм протективного действия HSA-GF при заражении клеток эховирусами оставался неизвестным, хотя высказывалось предположение о его блокирующем действии на вторичный по отношению к DAF клеточный рецептор [117]. В дальнейших экспериментах нами использовался только HSA-GF.

3.1.1.2. Протективный эффект альбумина при заражении культур клеток RD энтеровирусами вида В, имеющими различную рецепторную специфичность

Зависимость протективного эффекта от концентрации альбумина (HSA-GF) и от времени после заражения (p.i.) изучали, заражая культуры клеток RD одинаковой инфицирующей дозой (100 ТЦД₅₀ на лунку при множественности заражения 0,001 ТЦД₅₀ на клетку) эховирусов 3 (E3), 9 (E9), 11 (E11), коксакивирусов А9 (CVA9) и В5 (CVB5). Результаты показаны на рисунке 3.1. Первичные данные со статистическими оценками представлены в Приложении 1.

Сравнение протективного эффекта HSA-GF в клетках RD в отношении двух близкородственных клонов E11, показало более выраженный ингибирующий эффект альбумина в случае заражения культуры клеток RD *daf*⁻ клоном 431-6 (Рисунок 3.1 В), не взаимодействовавшим с рецептором DAF, по сравнению с DAF-зависимым *daf*⁺ клоном 431-1 (Рисунок 3.1 А). При отсутствии альбумина в поддерживающей среде, 100% ЦПЭ наблюдался через 48 часов после заражения клеток каждым из клонов.

Минимальная концентрация HSA-GF, статистически достоверно снижавшая ЦПЭ через 48 часов после заражения клоном 431-1, была равна 0,5% (ЦПЭ 81,3±4,1% относительно 100,0% при отсутствии альбумина). Минимальная концентрация HSA-GF, статистически достоверно снижавшая ЦПЭ через 48 часов после заражения клоном 431-6, также составляла 0,5%, но снижение ЦПЭ было более выраженным (40,6±4,6%).

Максимальная длительность протективного эффекта в случае *daf*⁺ клона 431-1 при 4% концентрации HSA-GF составляла 96 часов p.i. (ЦПЭ 50,0%). В случае *daf*⁻ клона 431-6 протективный эффект 4% концентрации HSA-GF наблюдался даже через 120 часов после заражения (ЦПЭ 12,5±4,7%). Кроме того, у клона 431-1 наблюдался более быстрый прирост ЦПЭ по времени при использовании 1% и 2% концентраций HSA-GF, в сравнении с клоном 431-6.

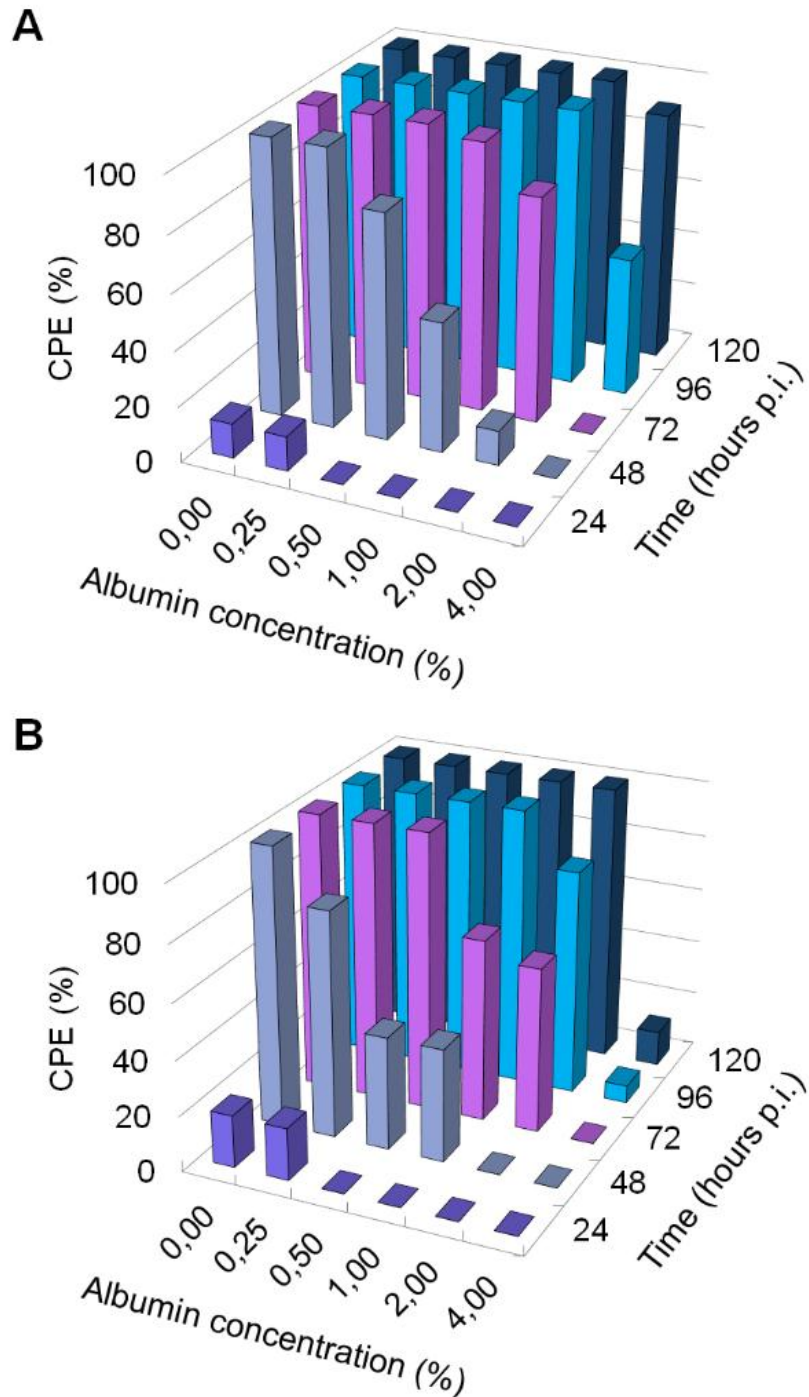


Рисунок 3.1. Зависимость протективного эффекта от концентрации альбумина и времени после заражения культур клеток RD одинаковой инфицирующей дозой энтеровирусов вида В.

(А) Клон 431-1 (*daf+*) вируса E11. (В) Клон 431-6 (*daf-*) вируса E11.

Примечание: По оси 0X указаны концентрации альбумина (HSA-GF) в процентах (вес/объём). По оси 0Y указаны средние величины ЦПЭ в процентах при инфицирующей дозе 100 ТЦД₅₀ соответствующего вируса. По оси 0Z указано время учёта ПЦЭ в часах после заражения клеток (hours p.i.).

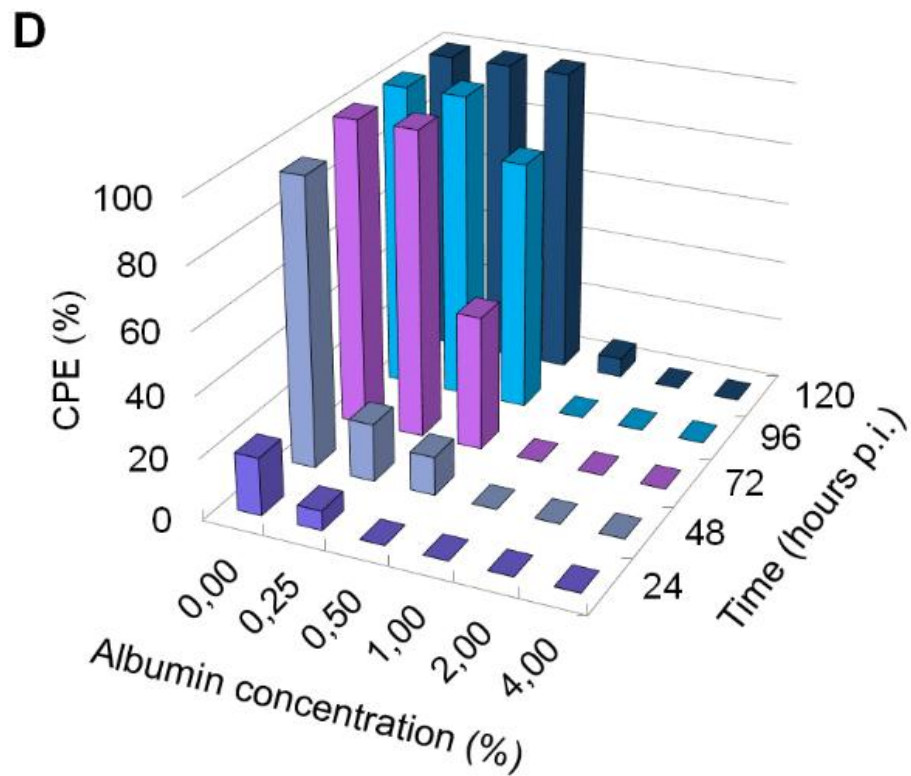
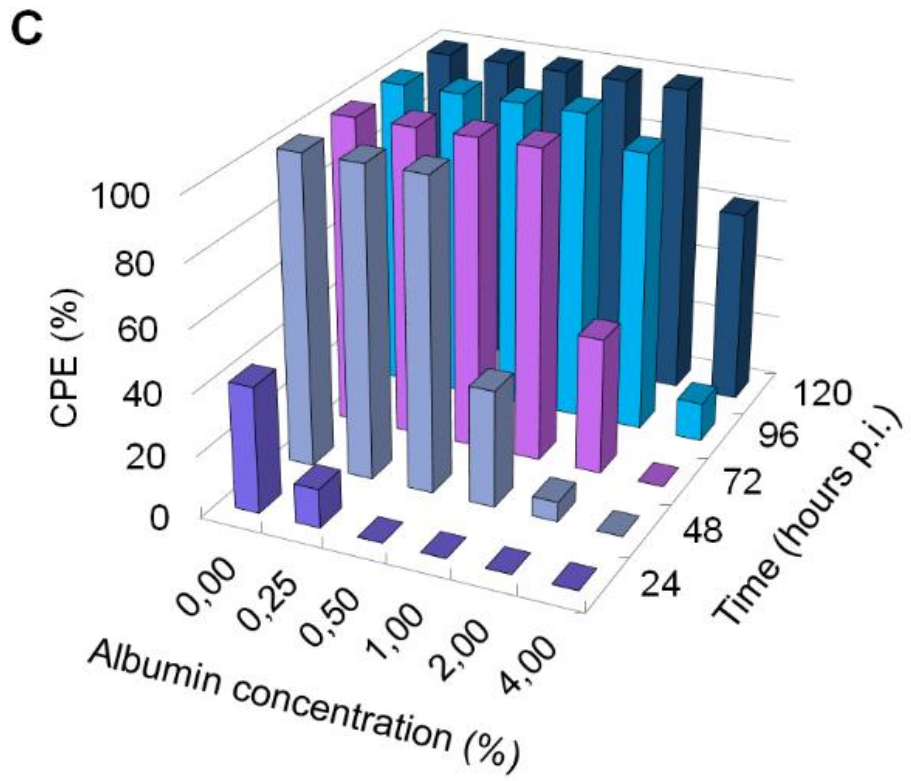


Рисунок 3.1 (продолжение). Зависимость протективного эффекта от концентрации альбумина и времени после заражения культур клеток RD одинаковой инфицирующей дозой энтеровирусов вида В.

(С) Штамм 206 (Daf+) вируса E3. (D) Штамм 8100 (Daf-) вируса E9.

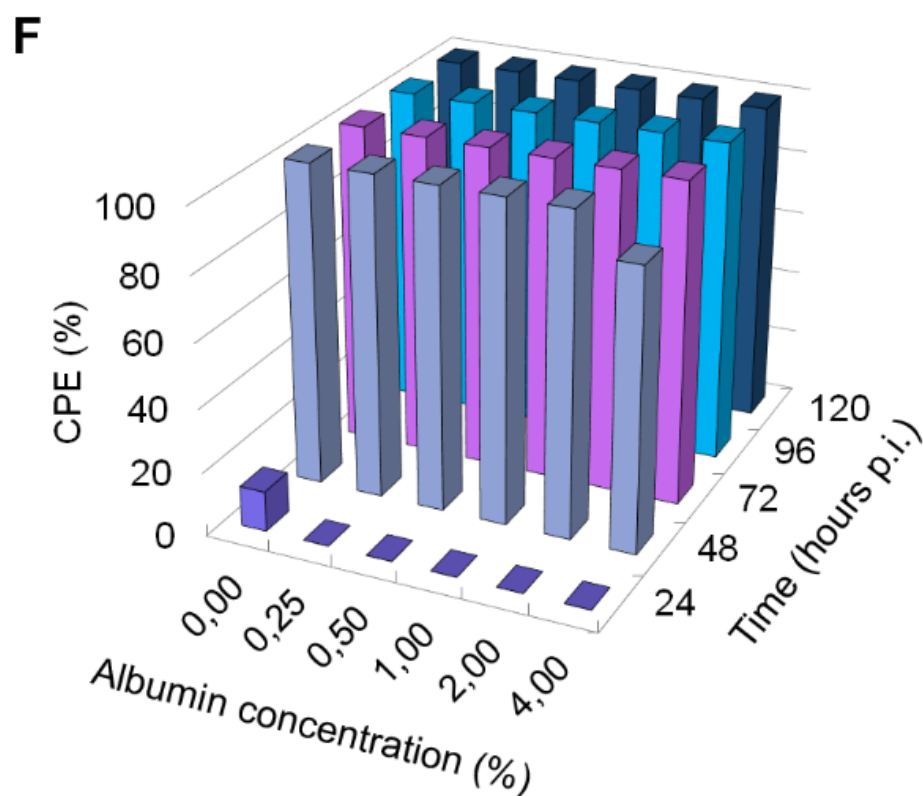
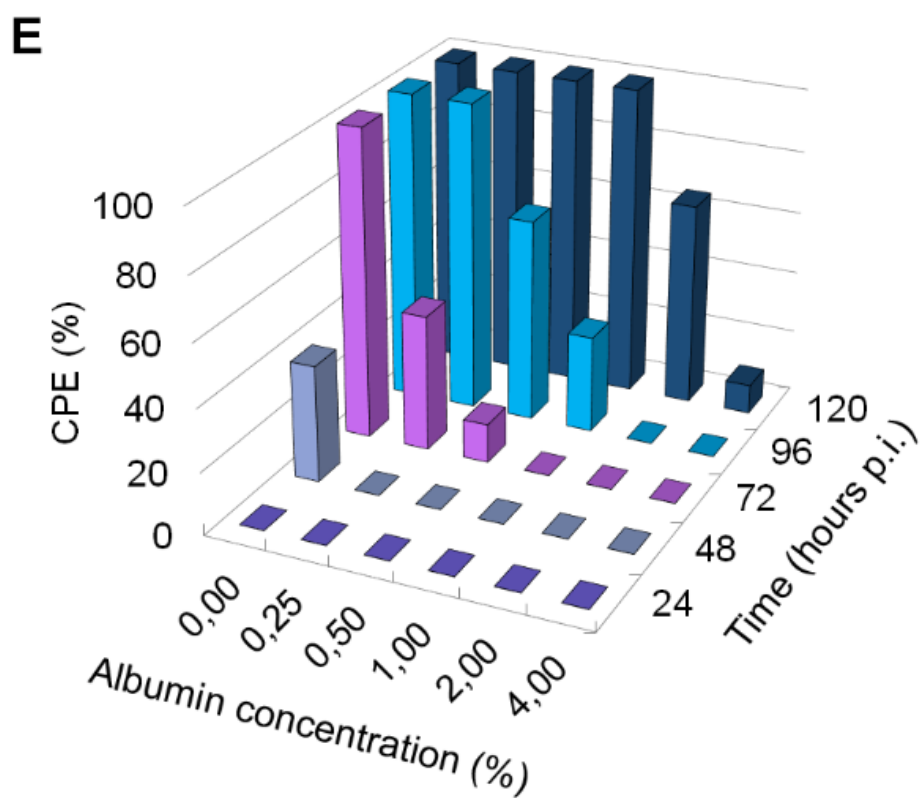


Рисунок 3.1 (продолжение). Зависимость протективного эффекта от концентрации альбумина и времени после заражения культур клеток RD одинаковой инфицирующей дозой энтеровирусов вида В.

(E) Штамм 3000 (Daf⁻) вируса CVA9. (F) Штамм 3122 (CAR⁺ Daf⁻) вируса CVB5.

Сравнение протективного эффекта HSA-GF в клетках RD, инфицированных E3 (Рисунок 3.1 C) и E9 (Рисунок 3.1 D) выявило более быстрое нарастание ЦПЭ в случае Daf⁺ штамма E3 в сравнении с Daf⁻ штаммом E9. При отсутствии альбумина в поддерживающей среде, 100% ЦПЭ наблюдался через 48 часов p.i. как у вируса E3, так и E9.

Минимальная концентрация HSA-GF, статистически достоверно снижавшая ЦПЭ через 48 часов p.i. у Daf⁺ штамма E3 (ЦПЭ $37,5 \pm 4,7\%$), составляла 1,0%. Минимальная концентрация HSA-GF, статистически достоверно снижавшая ЦПЭ через 48 часов p.i. у Daf⁻ штамма E9 (ЦПЭ $18,8 \pm 4,1\%$), была в 4 раза ниже: 0,25%.

Максимальная длительность протективного эффекта в случае Daf⁺ штамма E3 при использовании 4% концентрации HSA-GF составляла 120 часов (ЦПЭ $62,5 \pm 4,7\%$). Максимальная длительность протективного эффекта в отношении Daf⁻ штамма E9 также наблюдалась через 120 часов, но при использовании 4%, 2% и 1% концентраций HSA-GF (в частности, через 120 ч p.i. при 1% концентрации альбумина наблюдался ЦПЭ лишь $6,3 \pm 4,1\%$).

Таким образом, при попарном сравнении, был выявлен более выраженный протективный эффект HSA-GF в отношении *daf*⁻ клона 431-1 вируса E11 и Daf⁻ штамма E9, в сравнении с менее выраженным ингибированием ЦПЭ в отношении *daf*⁺ клона 431-6 вируса E11 и Daf⁺ штамма E3.

В отличие от использованных в данной работе эховирусов и CVB5, штамм CVA9 характеризовался замедленной кинетикой развития ЦПЭ: в отсутствие альбумина 100% ЦПЭ наблюдался через 72 часа (Рисунок 1 E). Минимальная концентрация HSA-GF, статистически достоверно снижавшая ЦПЭ (до $43,8 \pm 4,1\%$) через 72 часа p.i., была равна 0,25%. Протективный эффект через 120 часов p.i. наблюдался при использовании HSA-GF в концентрациях 2% (ЦПЭ $65,6\% \pm 4,6\%$) и 4% (ЦПЭ $9,4 \pm 4,6\%$).

Штамм CVB5 через 48 часов после заражения клеток RD демонстрировал развитие 100% ЦПЭ как в отсутствие альбумина, так и при всех концентрациях HSA-GF вплоть до 2% (Рисунок 3.1 F). При концентрации 4% HSA-GF снижение

ЦПЭ не достигало статистически значимого отличия от контрольных лунок без альбумина.

3.1.2 Исследование протективной активности антител к hFcRn при заражении культур клеток RD энтеровирусами вида В

3.1.2.1. Подтверждение экспрессии hFcRn в культуре клеток RD методом непрямой иммунофлуоресцентной микроскопии

С целью подтверждения экспрессии hFcRn в клетках RD и подтверждения функциональной активности первичных антител, взаимодействующих с данным рецептором, использовали непрямую иммунофлуоресцентную микроскопию с первичными поликлональными антителами (пАТ) к hFcRn и вторичными антителами к IgG, конъюгированными с флуорохромом.

Наибольшая интенсивность флуоресценции наблюдалась в перинуклеарной области клеток RD по сравнению с менее интенсивной, диффузной флуоресценцией периферической зоны цитоплазмы. Перинуклеарная локализация hFcRn выявлялась в виде асимметричного светящегося пятна в околоядерной зоне: либо с одной стороны от ядра клеток (юкстануклеарно), либо в виде яркой флуоресценции по периметру ядра (Рисунок 3.2). В отрицательном контроле на клетках MDCK специфического свечения не наблюдалось (данные не показаны).

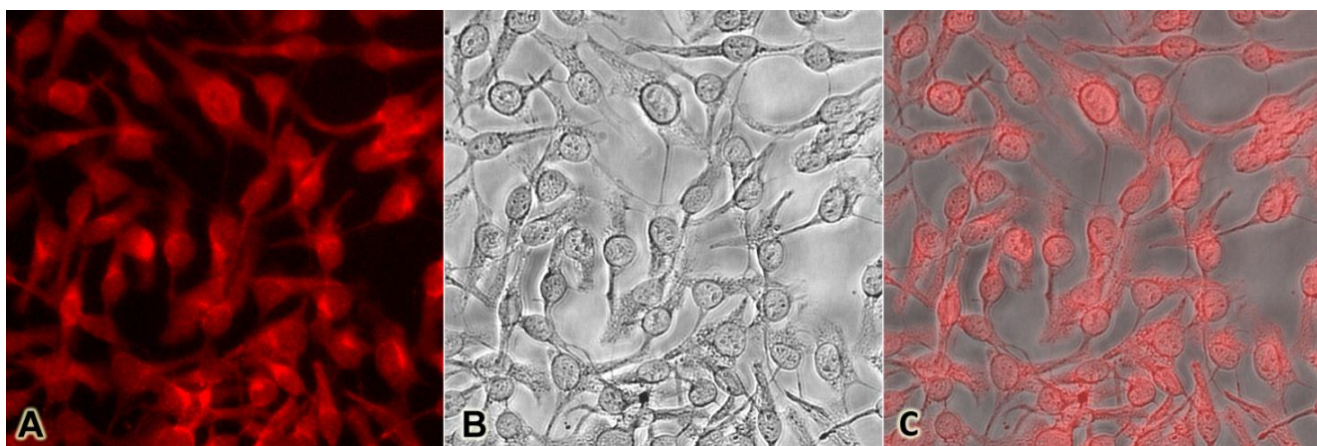


Рисунок 3.2. Непрямая иммунофлуоресцентная микроскопия культуры клеток RD. (А) Клетки RD, обработанные поликлональными антителами к hFcRn (10 мкг/мл) и

вторичными антителами (2 мкг/мл), конъюгированными с флуорохромом AlexaFluor®647. (B) Тот же кадр в световой микроскопии. (C) Наложение полупрозрачного слоя с изображением (B) на изображение (A). Увеличение x400.

3.1.2.2. Отсутствие вируснейтрализующего действия поликлональных и моноклональных антител к hFcRn на эховирусы 11 типа

Для исключения прямого неспецифического нейтрализующего действия антител к hFcRn на эховирусы, было проведено исследование вируснейтрализующего действия пАТ к hFcRn (Sino Biological, кат. № СТ009-T08) в концентрации 10 мкг/мл и мАТ к hFcRn (Sino Biological, кат. № СТ009-R110) в концентрации 80 мкг/мл на клонированные варианты E11. Вирусные пулы предварительно инкубировали с антителами при условиях, имитировавших температуру и период времени, использовавшиеся при заражении клеток (1 час при 37°C). Было показано отсутствие вируснейтрализующего действия антител к hFcRn на клоны E11 (Таблица 3.2). Предварительная инкубация эховирусов с антителами к hFcRn не изменяла инфекционную активность клонов E11 с разной рецепторной специфичностью.

Таблица 3.2. 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 $lg(TЦД_{50})/мл$ ($M \pm s$) ¹		
	Предварительная инкубация с мАТ к hFcRn (80 мкг/мл)	Предварительная инкубация с пАТ к hFcRn (10 мкг/мл)	Предварительная инкубация без антител (контроль)
431-1 (<i>daf+</i>)	6,7±0,24	6,9±0,21	6,8±0,24
431-6 (<i>daf-</i>)	6,5±0,23	6,7±0,24	6,6±0,21

Примечание:

¹ M – средняя величина инфекционной активности; s – стандартная ошибка средней величины.

3.1.2.3. Протективная активность антител к hFcRn при заражении культур клеток RD различными типами энтеровирусов вида В

Зависимость протективного эффекта от концентрации пАТ к hFcRn (Sino Biological, кат. № СТ009-T08) и времени после заражения культур клеток RD вирусами E3, E9, E11, E30, CVA9, CVB4 и CVB5 показана на рисунке 3.3. Первичные данные представлены в Приложении 2.

Сравнение протективной активности пАТ к hFcRn в отношении двух близкородственных клонов E11 (431-1 и 431-6) показало, что минимальная концентрация пАТ, обеспечившая отсутствие ЦПЭ в течение 120 часов, была одинаковой для обоих клонов и составляла 2,5 мкг/мл (Рисунок 3.3 А, 3.3 В). При концентрации пАТ 1,25 мкг/мл кинетика нарастания ЦПЭ по времени (через 72, 96 и 120 часов) после заражения была более выраженной в случае DAF-зависимого *daf*⁺ клона 431-1 (Рисунок 3.3 А) по сравнению с *daf*⁻ клоном 431-6, не взаимодействовавшим с DAF (Рисунок 3.3 В).

Минимальные концентрации пАТ, обеспечившие полное отсутствие ЦПЭ в течение 120 часов при заражении клеток RD штаммами вирусов E3, E9 и E30 составили, соответственно: 5,0; 2,5 и 1,25 мкг/мл (Рисунок 3.3 С, 3.3 D, 3.3 Е).

Более выраженная протективная активность пАТ к FcRn наблюдалась при использовании штаммов E9 и E30, не взаимодействовавших с DAF, в отличие от *Daf*⁺ штамма вируса E3.

Вирус CVA9 характеризовался замедленным развитием ЦПЭ по сравнению с эховирусами и коксакивирусами В: в отсутствие пАТ 100% ЦПЭ наблюдался через 72 часа (Рисунок 3.3 F). Минимальная концентрация пАТ, обеспечившая полное отсутствие ЦПЭ в течение 120 часов при заражении клеток RD вирусом CVA9, была равна 0,6 мкг/мл.

Все использованные концентрации пАТ к hFcRn, до 10 мкг/мл включительно, не проявляли защитного эффекта при заражении культуры клеток RD вирусами CVB4 (Рисунок 3.3 G) и CVB5 (Рисунок 3.3 H).

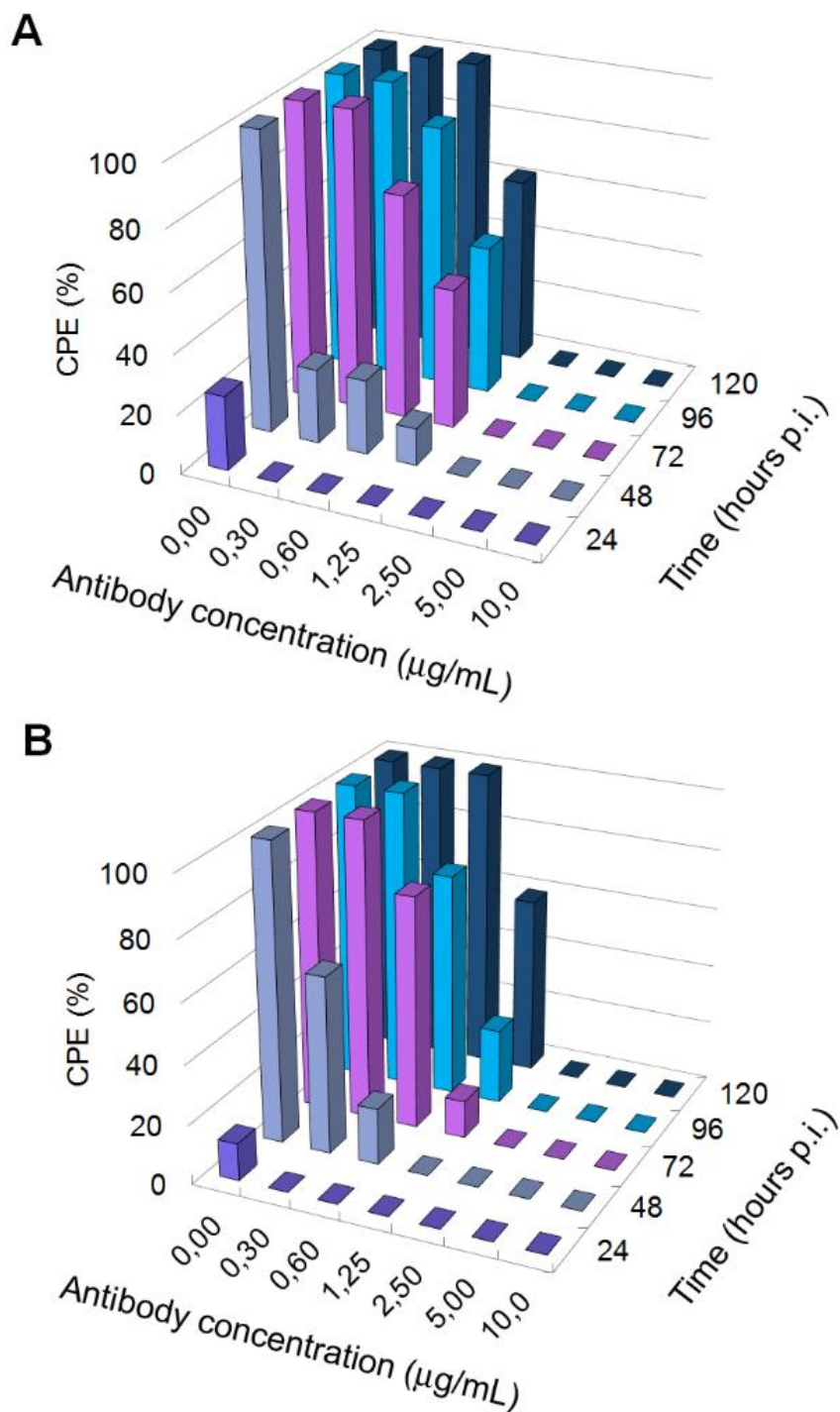


Рисунок 3.3. Зависимость протективного эффекта от концентрации пАТ к hFcRn и времени после заражения культур клеток RD одинаковой инфицирующей дозой (100 ТЦД₅₀) энтеровирусов вида В.

(А) Клон 431-1 (*daf*⁺) вируса E11. (В) Клон 431-6 (*daf*⁻) вируса E11.

Примечание: По оси OX указаны концентрации пАТ к hFcRn (мкг/мл). По оси OY указаны средние величины ЦПЭ в процентах при инфицирующей дозе 100 ТЦД₅₀ соответствующего вируса. По оси OZ указано время учёта ЦПЭ в часах после заражения клеток (hours p.i.).

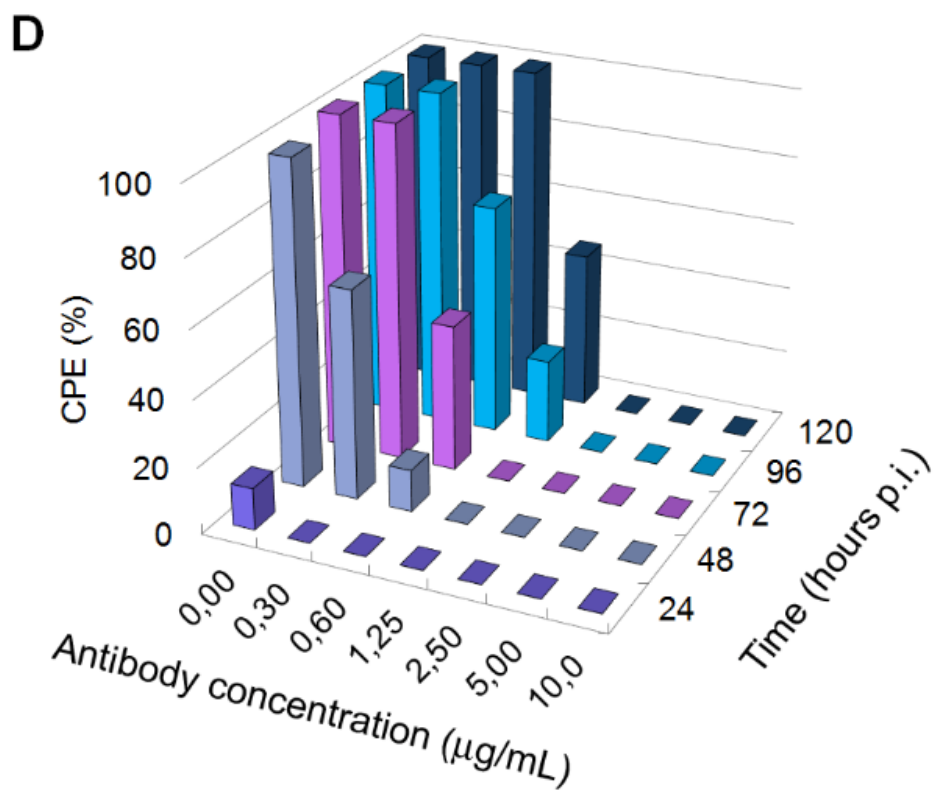
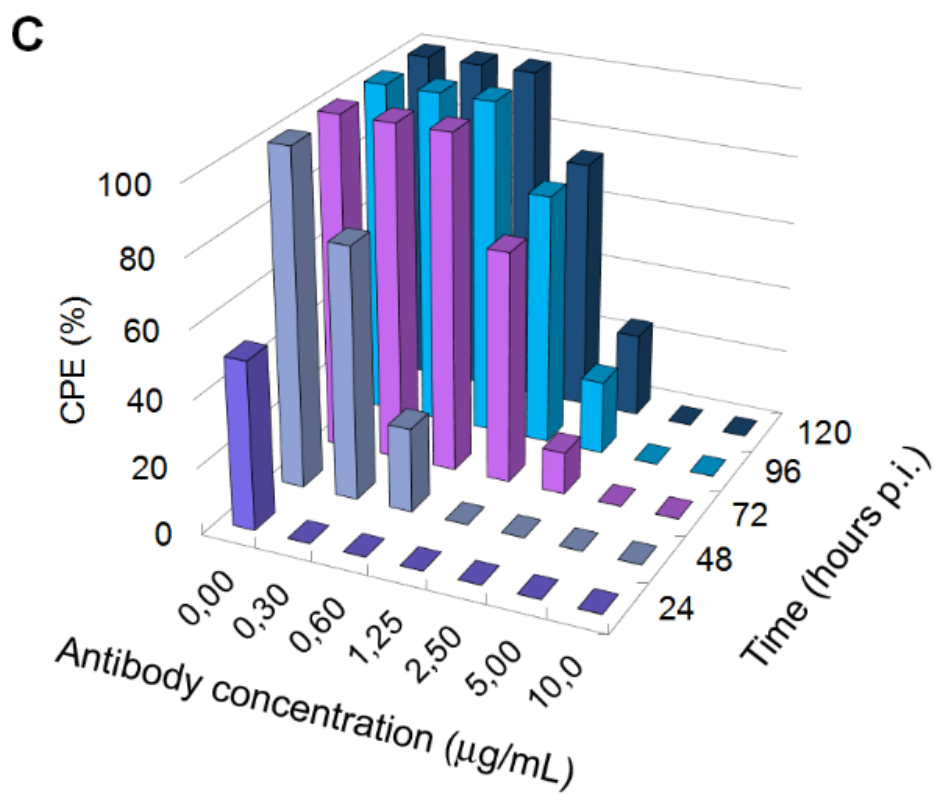


Рисунок 3.3 (продолжение). Зависимость протективного эффекта от концентрации пАТ к hFcRn и времени после заражения культур клеток RD одинаковой инфицирующей дозой (100 ТЦД₅₀) энтеровирусов вида В.

(С) Штамм 206 (Daf+) вируса E3. (D) Штамм 8100 (Daf-) вируса E9.

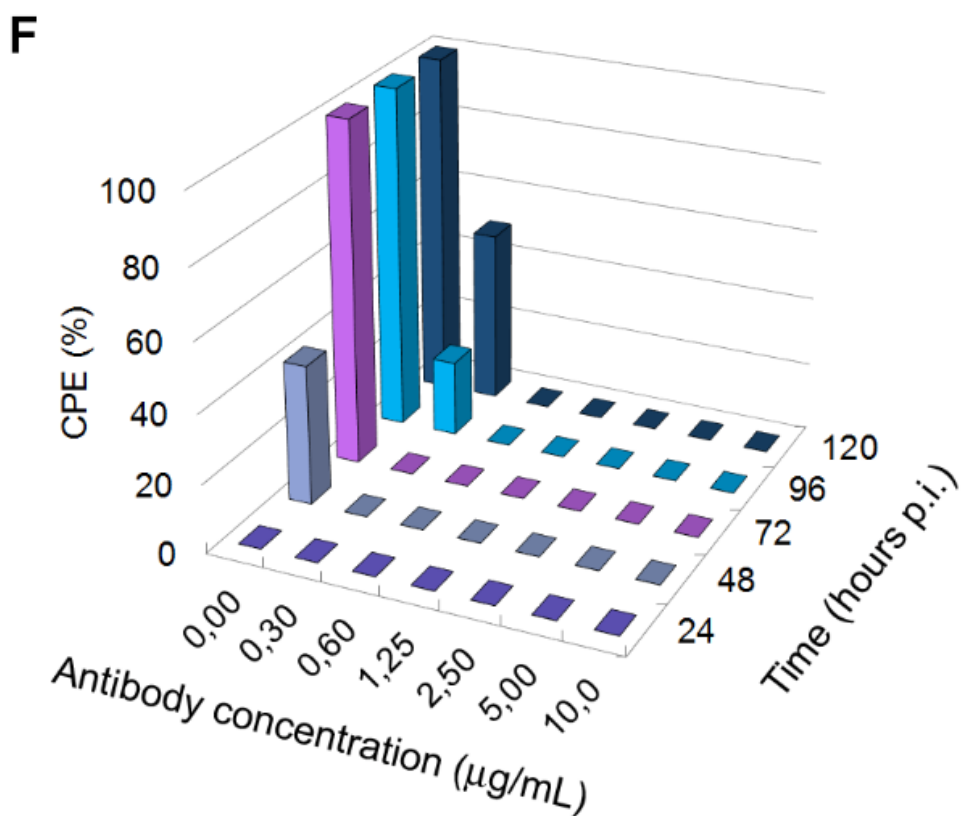
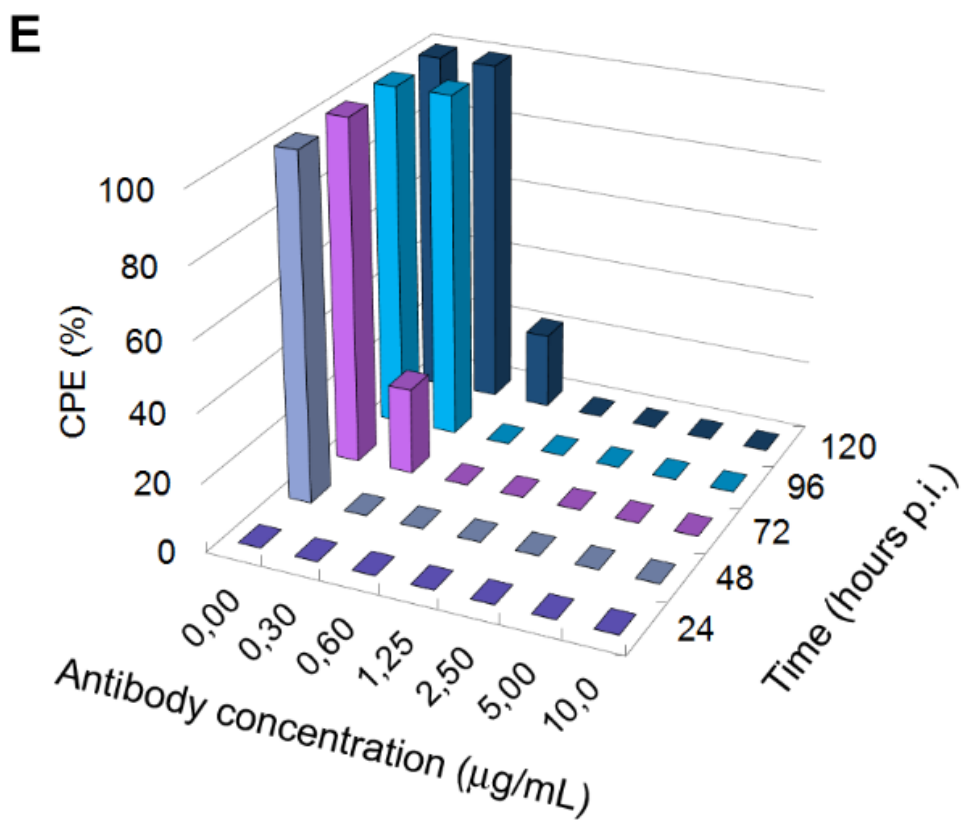


Рисунок 3.3 (продолжение). Зависимость протективного эффекта от концентрации пАТ к hFcRn и времени после заражения культур клеток RD одинаковой инфицирующей дозой (100 ТЦД₅₀) энтеровирусов вида В.

(E) Штамм 7500 (Daf+) вируса E30. (F) Штамм 3000 (Daf-) вируса CVA9.

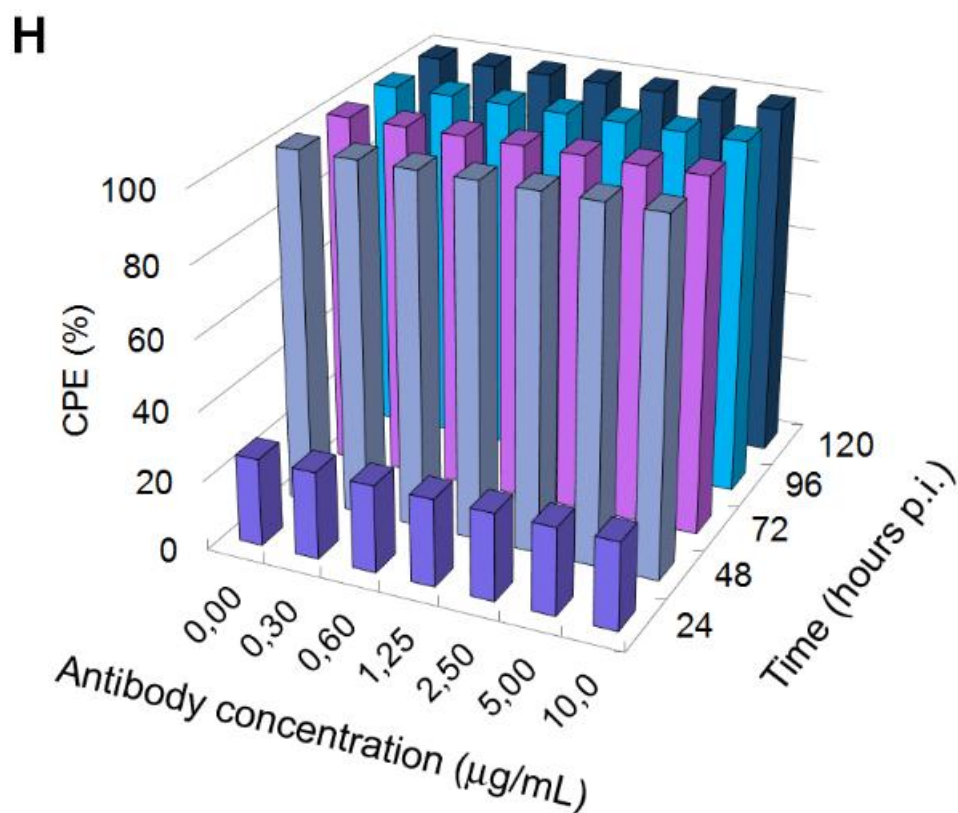
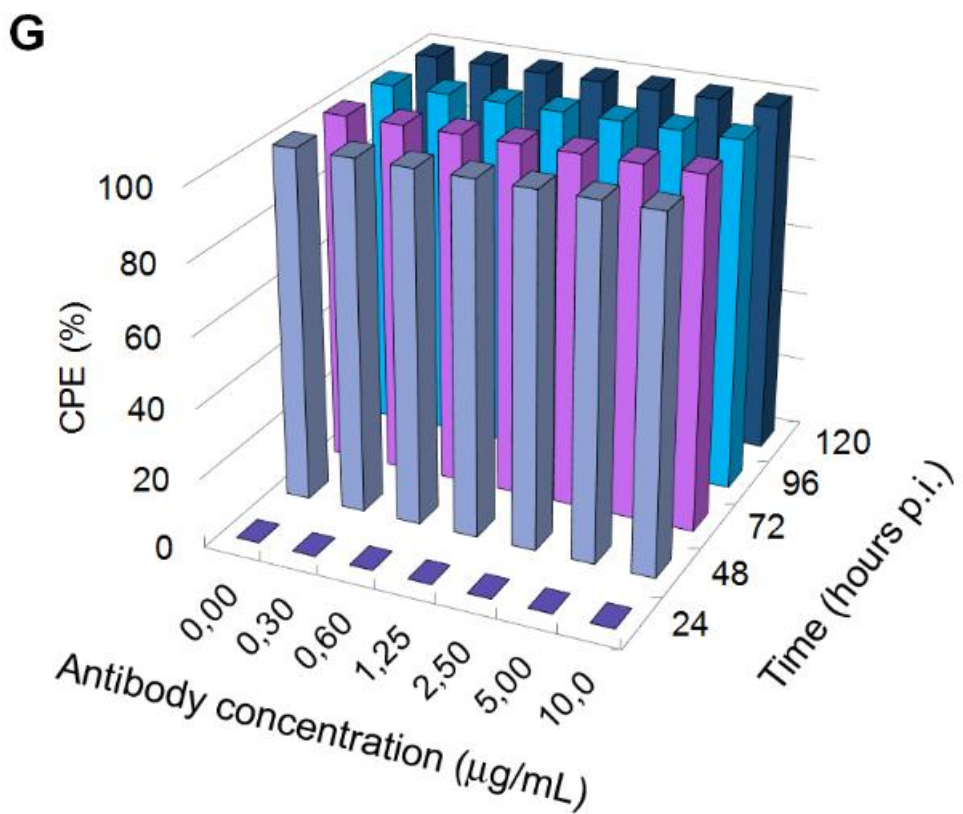


Рисунок 3.3 (продолжение). Зависимость протективного эффекта от концентрации пАТ к hFcRn и времени после заражения культур клеток RD одинаковой инфицирующей дозой (100 ТЦД₅₀) энтеровирусов вида В. (G) Штамм 1000 (CAR+ Daf-) вируса CVB4. (H) Штамм 3122 (CAR+ Daf-) вируса CVB5.

3.1.3. Доказательства роли hFcRn в качестве общего дезинтегрирующего капсид рецептора эховирусов, связывающегося с каньоном

Спектр протективной активности HSA-GF и пАТ к hFcRn, наблюдавшийся нами в культуре клеток RD, соответствовал спектру протективной активности описанных ранее мАТ к gp44 в культуре клеток P2002 [67]. Поскольку мАТ к gp44 ингибировали репродукцию практически всех типов эховирусов, а gp44 идентичен FCGRT (альфа-цепи hFcRn), то полученные нами результаты можно экстраполировать на всю группу эховирусов.

Роль hFcRn в качестве первичного (primary) пан-эховирусного (pan-echovirus) рецептора была показана другими методами и на других культурах клеток в работе [71]. Методом копреципитации *in vitro* с последующим иммуноблоттингом было продемонстрировано прямое взаимодействие рекомбинантной молекулы rFcRn-B2M (состоявшей из внеклеточного домена hFcRn и B2M) с вирионами E11 и E30. Кроме того, было показано вируснейтрализующее действие rFcRn-B2M.

Ранее нами были картированы аминокислотные замены в области каньона E11, связанные с адаптацией клонированного методом бляшек под агаровым покрытием вируса E11, полученного в культуре клеток RD, к культурам клеток обезьяны (BGM) и человека (HEp-2 и Л-41 КД/84) [84], что позволило предположить существование межвидового отличия рецептора, связывающегося с каньоном E11, в клетках человека и обезьян. Затем были селекционированы два близкородственных клона E11 (*daf*⁺ клон 431-1 и *daf*⁻ клон 431-6), отличавшиеся единственной аминокислотной заменой в сайте связывания вириона с DAF и имевшие одинаковую структуру капсидных белков в области каньона [73]. Клон 431-1 был DAF-зависимым, так как его репродукция эффективно подавлялась мАТ к DAF в культуре клеток RD, а клон 431-6 не взаимодействовал с DAF. Репродукция обоих клонов в культуре клеток RD ингибировалась мАТ к B2M. Полученные результаты указывали на существование общего рецептора,

предположительно связывавшегося с каньоном, у двух клонов, функциональность которого зависела от В2М. Поскольку В2М является субъединицей hFcRn, и в настоящей работе был обнаружен протективный эффект HSA-GF и пАТ к hFcRn при заражении культуры клеток RD как *daf*⁺ клоном 431-1, так и *daf*⁻ клоном 431-6, то общий рецептор, связывавшийся с каньоном у двух клонов, мог быть идентифицирован как hFcRn. Кроме того, DAF-зависимый клон 431-1 демонстрировал двухэтапное взаимодействие с клетками RD, так как первый этап взаимодействия мог быть блокирован с помощью мАТ к связывающему рецептору DAF, а второй этап взаимодействия мог быть блокирован с помощью мАТ к В2М, HSA-GF или пАТ к hFcRn.

Отличительным свойством дезинтегрирующих капсид рецепторов энтеровирусов является их способность трансформировать зрелые 160S вирионы в 135S А-частицы. Объединение доказательств прямого взаимодействия рекомбинантной молекулы rFcRn-В2М с вирионами E11, приводившего к снижению их инфекционной активности [71], с данными о снижении продукции 135S А-частиц и блокировании дезинтеграции капсида с высвобождением РНК E11 в культуре клеток RD с помощью мАТ к В2М [9], с результатами наших исследований по картированию сайта связывания альтернативного по отношению к DAF клеточного рецептора на поверхности вириона E11, позволяет сделать вывод о роли hFcRn в культуре клеток RD в качестве дезинтегрирующего капсид рецептора, связывающегося с каньоном эховируса 11.

3.1.4. Итоги изучения роли hFcRn в качестве общего дезинтегрирующего капсид рецептора для эховирусов и коксакивируса А9

1. Специфичность и избирательность (по спектру энтеровирусов) защитного эффекта альбумина и антител к hFcRn, проявлявшегося независимо от типа эховирусов и от различий в их способности к взаимодействию с клеточным

рецептором DAF, подтверждает роль hFcRn в качестве общего дезинтегрирующего капсид клеточного рецептора для эховирусов.

2. Обнаружение защитного эффекта альбумина и антител к hFcRn при заражении клеток RD коксакивирусом A9, наряду с имевшимися данными литературы, подтверждает роль hFcRn в качестве дезинтегрирующего капсид клеточного рецептора для коксакивируса A9.

3. В условиях неполного блокирования hFcRn с помощью альбумина или антител к hFcRn, длительность и величина защитного эффекта были меньше у эховирусов, способных к связыванию с DAF, по сравнению с эховирусами, не взаимодействовавшими с DAF. Данное наблюдение (в совокупности с ранее полученными данными о протективном эффекте антител к DAF при заражении клеток RD клонированным *daf*⁺ вариантом E11) согласуется с двухэтапной схемой взаимодействия DAF-зависимых эховирусов с рецепторами при входе в клетку: сначала – со связывающим рецептором DAF, затем – с дезинтегрирующим капсид клеточным рецептором hFcRn.

3.2. Разработка математической модели, описывающей изменения инфекционной активности эховирусов в экспериментах с одиночным циклом репродукции

3.2.1. Математическая модель объекта моделирования

В одиночном цикле репродукции (ОЦР) энтеровирусов различают две последовательные фазы: *фаза эклипса* и *фаза созревания* [29, 30, 137]. В фазе эклипса происходит более или менее выраженное снижение инфекционной активности в экспериментальной системе: как за счёт событий *конверсии полных вирионов в А-частицы*, так и за счёт последующих событий *высвобождения вирусной геномной РНК* из вирионов внутри клеток с образованием пустых капсидов. Конверсия полных вирионов в А-частицы (в результате взаимодействия с дезинтегрирующим капсид рецептором) сопровождается потерей капсидного

белка VP4 и структурной реорганизацией капсидного белка VP1 без высвобождения РНК, поэтому образование А-частиц является первым этапом процесса высвобождения вирусной геномной РНК. В культуре клеток RD на модели эховируса 7 было показано, что через 2 часа от начала ОЦР приблизительно 12% радиоактивно меченных вирионов превращались в А-частицы и элюировали в поддерживающую культуральную среду, не проникая внутрь клеток [80]. А-частицы, образовавшиеся на поверхности клеток и элюированные в культуральную среду, имели на два порядка величины меньшую инфекционную активность при заражении клеток по сравнению с полными вирионами. А-частицы, образовавшиеся внутри клеток, переходили к следующему событию – высвобождению вирусной геномной РНК. Высвободившаяся из вирионов геномная РНК, после искусственного лизиса клеток в экспериментах с ОЦР, разрушается клеточными рибонуклеазами. Таким образом, в экспериментах с ОЦР снижение инфекционной активности в фазе эклипса наблюдается как за счёт образования эховирусами А-частиц (преимущественно внутриклеточного в культуре клеток RD), так и за счёт разрушения высвободившейся геномной РНК клеточными рибонуклеазами.

Начало регистрируемого роста инфекционной активности в экспериментальной системе соответствует окончанию фазы эклипса и началу фазы созревания. В экспериментах с ОЦР рост инфекционной активности наблюдается за счёт сборки новых вирионов (потомства), их накопления внутри клеток и последующего выхода в поддерживающую среду при искусственном лизисе клеток. Завершающим событием сборки новых вирионов является *инкапсидация* (упаковка) вновь синтезированной вирусной геномной РНК в белковый прокапсид, приводящая к его стабилизации за счёт расщепления капсидного белка VP0 на VP4 и VP2.

Результатом экспериментов, проводимых по схеме ОЦР энтеровирусов в культуре клеток (с достаточной множественностью заражения, с удалением несвязанных с клетками вирусов, с синхронизацией начала цикла и с искусственным лизисом клеток через определённые интервалы времени), является

график изменения инфекционной активности в экспериментальной системе, показанный на рисунке 3.4.

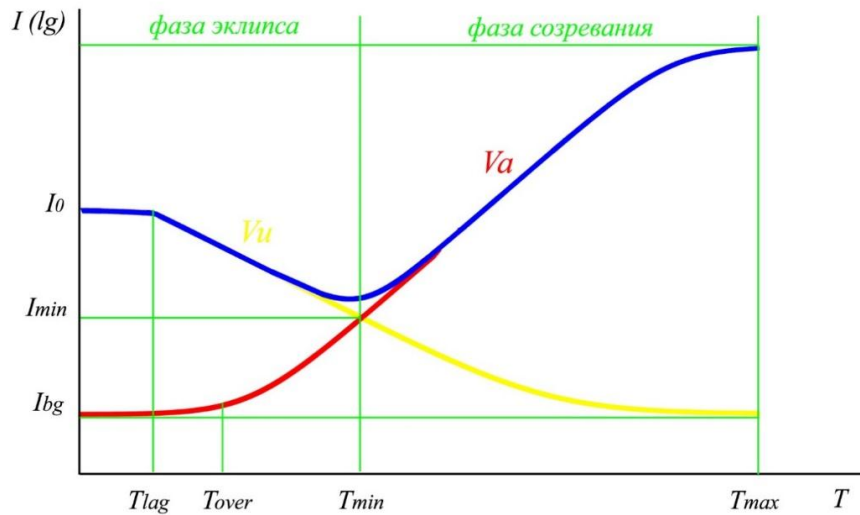


Рисунок 3.4. Теоретический график изменения инфекционной активности энтеровирусов в экспериментах с одиночным циклом репродукции в культуре клеток.

Примечание: экспериментальный график показан синим цветом; кривая снижения инфекционной активности исходных (родительских) вирусов показана жёлтым цветом; кривая роста инфекционной активности новых вирусов (потомства) показана красным цветом.

Регистрируемое снижение инфекционной активности в экспериментальной системе начинается в момент времени T_{lag} с уровнем инфекционной активности I_0 . Если в клетках искусственно блокировать синтез компонентов для новых вирионов (например, с помощью блокирования первичной трансляции вирусного генома пуромицином [60]), то теоретически снижение инфекционной активности могло бы продолжаться до распада всех родительских вирионов, то есть до уровня инфекционной активности $I = 0$. В реальных экспериментах уровень инфекционной активности может лишь приблизиться к некоторой минимальной *фоновой* величине, обусловленной неспецифической адсорбцией вирусов на стенках культуральных флаконов и вирусами, связавшимися с клетками, но не перешедшими в стадии процесса дезинтеграции капсида.

В момент времени $T = 0$ новые вирусы в экспериментальной системе отсутствуют, далее наблюдается некоторая задержка начала роста инфекционной активности за счёт вирусов потомства, обусловленная как временем синтеза вирусных компонентов, так и теоретическим пределом обнаружения этого роста из-за наличия фоновой инфекционной активности. Рост инфекционной активности продолжается до точки $(T_{max}; I_{max})$, которая соответствует максимальной наблюдавшейся инфекционной активности за время эксперимента.

Математической моделью называется совокупность уравнений или других математических соотношений, отражающих основные свойства изучаемого объекта или явления в рамках принятой умозрительной физической модели и особенности его взаимодействия с окружающей средой на пространственно-временных границах области его локализации [132].

Задачей математической модели являлся подбор двух логистических (S -образных) функций, сумма значений которых приближалась бы к экспериментальной кривой. Убывающая логистическая функция (выделена на рисунке 3.4 жёлтым цветом) соответствует процессу дезинтеграции капсида с выходом вирусной РНК исходных вирионов. Возрастающая логистическая функция (выделена на рисунке 3.4 красным цветом) соответствует процессу инкапсидации вирусной РНК при сборке новых вирионов.

Убывающая функция начинается с точки $(T_0; I_0)$, в которой инфекционная активность определяется количеством вирусов, необратимо связавшихся с клетками в условиях, препятствующих входу вирусов в клетки (холодовая синхронизация заражения). На участке явного убывания этой функции рассчитывается *средняя скорость дезинтеграции капсида с высвобождением РНК* V_{ui} (*uncoating*, «раздевание»)[2]. Убывающая функция асимптотически приближается к фоновому уровню инфекционной активности I_{bg} (*background*, фон). Возрастающая функция начинается с точки $(T_0; I_{bg})$, то есть с фоновой инфекционной активности, измеренной в контрольном эксперименте без клеточной культуры. На участке явного возрастания этой функции рассчитывается *средняя скорость инкапсидации* вирусной геномной РНК при

сборке новых вирионов Va (*assembly*, сборка). Сумма значений убывающей и возрастающей функций соответствует экспериментальному графику изменения инфекционной активности эховирусов в ОЦР.

3.2.2. Расчётные параметры математической модели

Математическая модель обеспечивает расчёт значений следующих параметров репродукции эховирусов в одиночном цикле:

$Tlag$ – длительность возможной задержки во времени (может отсутствовать) до начала явного убывания инфекционной активности. Рассчитывается по убывающей функции. Интерпретируется как задержка начала процесса дезинтеграции капсида на этапе любого или нескольких предшествующих событий в цикле репродукции.

$Tmin$ – момент времени, когда итоговая (общая) расчётная функция достигает минимального значения $Imin$. Рассчитывается по итоговой функции. Фаза эклипса соответствует длительности интервала времени от T_0 до $Tmin$.

Vu – средняя скорость дезинтеграции капсида с высвобождением РНК. Рассчитывается по убывающей функции на интервале от $Tlag$ (или от T_0 при отсутствии $Tlag$) до $Tmin$. Если убывающий участок на графике отсутствует, то Vu не рассчитывается. Интерпретируется как пропускная способность пути входа вируса в клетку.

$Tover$ – момент времени начала явного роста инфекционной активности. Рассчитывается по возрастающей функции как превышение фонового уровня инфекционной активности на заданную относительную величину. Интерпретируется как расчётное время для теоретически регистрируемого начала инкапсидации РНК при сборке новых вирионов.

Va – средняя скорость инкапсидации вирусной РНК при сборке новых вирионов. Рассчитывается по возрастающей функции на интервале явного роста от $Tover$ до $Tmax$. Характеризует скорость сборки новых вирионов в единицу времени.

T_{max} – момент времени, когда достигается максимальная инфекционная активность за период наблюдения. Рассчитывается по возрастающей функции как момент времени окончания периода явного роста, если функция выходит на *плато*, либо по превышению относительной пороговой величины, заданной относительно максимальной наблюдавшейся в эксперименте инфекционной активности.

3.2.3. Постановка задачи математического моделирования

Математическая задача состояла в том, чтобы аппроксимировать набор точек суммой двух логистических функций.

Логистическая функция - решение простого нелинейного дифференциального уравнения первого порядка[56]. 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 четырёх 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: $K_a, P_a, r_a, K_d, P_d, r_d$.

Логистическая функция или логистическая кривая - самая общая сигмоидальная (S-образная) кривая. Она моделирует кривую роста вероятности некоего события, по мере изменения управляющих параметров (факторов риска)[56].

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:

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

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 значение L было выбрано 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) [52]. Первым шагом генерируется рой частиц. Частицей в данном случае является 6-ти мерный вектор ($K_a, P_a, r_a, K_d, P_d, r_d$). Каждая частица помещается в случайную точку 6-ти мерного пространства. Координаты частицы в этом пространстве и есть искомым вектор. Для каждой частицы из роя вычисляется значение оптимизируемой функции. Каждая частица хранит информацию о точке пространства из числа “посещённых” данной частицей, в которой вычислено лучшее значение функции. Также она имеет информацию о точке, в которой вычислено лучшее значение функции всем роем частиц. На основе этих данных генерируется вектор скорости для каждой частицы. Частица перемещается на этот вектор скорости. В новом положении снова вычисляется значение функции. В разработанной программе

метод роя частиц запускается в цикле. На каждой итерации (за исключением первой) в рой добавляется дополнительная частица, начальное местоположение которой является положением с наилучшим значением функции, найденным на предыдущих итерациях. Цикл завершается, когда 20 итераций подряд не улучшают текущее лучшее значение.

В данной задаче качество аппроксимации оценивалось по значению коэффициента расхождения Г. Тейла (Henri Theil), приемлемая величина которого в биомедицинских исследованиях не должна превышать 5% [133]:

$$U = \frac{\sqrt{\sum (y - \bar{y})^2}}{\sqrt{\sum y^2} + \sqrt{\sum \bar{y}^2}}$$

где y – эмпирические данные; \bar{y} – теоретические (расчётные) данные.

3.2.4. Значение количественного подхода к описанию формы графиков одиночного цикла репродукции

Несмотря на значительный прогресс в исследованиях молекулярных механизмов входа вирусов в клетки, за последние 50 лет предпринимались лишь относительно немногочисленные попытки применения математического моделирования для описания внутриклеточных событий в продуктивном цикле репродукции вирусов [123].

Схема эксперимента с ОЦР бактериофагов была разработана Ellis and Delbruck [25] ещё в 1939 году. Для изучения кинетики *внутриклеточной* репродукции бактериофагов, данная схема была впервые применена в модификации Doermann [17] на модели фага T4 и бактерий *E. coli*. Эксперименты Doermann привели к открытию фазы эклипса у вирусов, то есть периода внутриклеточного размножения фага, когда инфекционная активность в экспериментальной системе снижалась ниже исходной. Фаза эклипса была обусловлена выходом вирусной ДНК из родительского фага в бактериальную

клетку. После преждевременного разрушения зараженных бактерий (до окончания созревания потомства фага), ДНК в свободном виде утрачивала инфекционность для новых бактерий. Наличие фазы эклипса у энтеровирусов человека было впервые показано Holland [42] на модели вируса полиомиелита в клетках HeLa.

Эксперименты по схеме ОЦР с лизисом клеток неоднократно использовались для выяснения кинетики внутриклеточной репродукции эховирусов: при изучении ингибирующего действия альбумина на дезинтеграцию капсида эховируса 7 в культуре клеток RD [117]; при установлении защитного действия антител к CD59 в отношении E7 в культуре клеток RD [34]; при исследовании кинетики репродукции вариантов E11 в культурах клеток Vero, HT29 и RD [107, 106], а также в других исследованиях эховирусов [65, 124]. Однако, количественный анализ формы графиков изменения инфекционной активности эховирусов во времени, полученных в экспериментах по схеме ОЦР с лизисом клеток, в указанных исследованиях не проводился.

Современная концепция репродукции энтеровирусов предусматривает *мультифокальную инициацию* инфекции при высокой множественности заражения клеток [21, 62, 85, 100]. Анализ репродукции вирусов полиомиелита в отдельных (единичных) клетках HeLa [91], разделённых с помощью проточного цитометра с функцией сортера, показал, что повышение множественности заражения приводило к увеличению количества внутриклеточной вирусной РНК, но не повышало продуктивность клеток в отношении потомства вирусов. Анализ репродукции вируса полиомиелита в единичных клетках позволил сделать вывод о «локальных различиях субклеточной доступности ресурсов для репликации, таких как рибосомы, энергия, нуклеотиды, мембраны и другие, вероятно создающих вариабельность в производительности каждого локуса» репродукции. Эти выводы согласуются с данными о существовании в клетках HeLa непродуктивных внутриклеточных компартментов, куда направляются варианты коксакивирусов В3 с определённой рецепторной специфичностью [64].

Для применения разработанной нами математической модели к описанию изменения инфекционной активности эховирусов в экспериментах, проводимых по схеме ОЦР с лизисом клеток, можно сформулировать следующие общие принципы интерпретации формы графиков:

1. Срок наступления каждого последующего биологического события в цикле репродукции эховирусов определяется сроками наступления и продолжительностью предшествующих событий.

2. Различные пути входа эховирусов в клетку могут иметь различную пропускную способность в единицу времени, которую отражает средняя скорость дезинтеграции вирусной РНК.

3. Различные пути входа эховирусов в клетку могут характеризоваться различными сроками наступления биологических событий, которые влияют на сроки наступления и продолжительность фаз эклипса и созревания.

4. Скорость инкапсидации вирусной РНК в фазе созревания может отражать различную производительность компартментов, в которых происходит синтез вирусных компонентов и сборка новых вирионов.

3.2.5. Итоги работ по созданию математической модели

1. Разработана концептуальная модель объекта моделирования – процесса изменения инфекционной активности эховирусов в экспериментах с одиночным циклом репродукции в культуре клеток. Определены расчётные кинетические параметры модели и их интерпретация с учётом 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 расчётом коэффициента расхождения Тейла.

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

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

3.3. Кинетические особенности одиночного цикла репродукции клонированных субтиповых вариантов эховируса 11 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 одиночном цикле репродукции (ОЦР), позволили перейти к изучению особенностей входа в клетки эховирусов с различной рецепторной специфичностью. В экспериментах были использованы охарактеризованные ранее [73] клонированные субтиповые варианты эховируса 11 (E11) с расширенным диапазоном клеток-хозяев (RD и Л-41 КД/84): 1) DAF-зависимый (*daf*⁺) клон 431-1 с двойным рецепторным тропизмом, использовавший рецептор DAF в качестве *связывающего рецептора* и hFcRn – в качестве *дезинтегрирующего капсид рецептора*; 2) не взаимодействовавший с DAF (*daf*⁻) клон 431-6, использовавший hFcRn в качестве *связывающего и дезинтегрирующего капсид рецептора*.

Варьируемые экспериментальные условия включали использование двух клеточных культур (RD и Л-41 КД/84) с различными селективными свойствами по отношению к *Daf*⁺ и *Daf*⁻ вариантам E11, что обеспечило возможность сравнения количественных характеристик путей входа вариантов E11 с различной рецепторной специфичностью в двух культурах клеток.

Результаты экспериментов в культуре клеток RD с роданином (известным ингибитором дезинтеграции капсида эховирусов 7 и 12 типа [15, 117]) позволили

подтвердить пригодность используемой экспериментальной системы и математической модели для исследования скорости дезинтеграции капсида с высвобождением РНК вариантов E11 с различной рецепторной специфичностью. В последующих экспериментах в культуре клеток RD было изучено влияние нистатина (ингибитора функции липидных плотов) и нокодазола (ингибитора полимеризации микротрубочек) на количественные параметры ОЦР *daf+* и *daf-* вариантов E11.

3.3.1. Кинетические особенности одиночного цикла репродукции *daf+* и *daf-* клонов экховируса 11 в культуре клеток RD

Учитывая известные селективные свойства культур клеток RD и Л-41 КД/84 в отношении субтиповых вариантов E11 (позитивная селекция *daf+* вариантов в культуре клеток RD и позитивная селекция *daf-* вариантов в культуре клеток Л-41 КД/84 [134, 141]), представляло интерес сравнение количественных характеристик путей входа вариантов E11 с различной рецепторной специфичностью в двух культурах клеток.

Результаты экспериментов с одиночным циклом репродукции (ОЦР) *daf+* и *daf-* клона E11 в культуре клеток RD представлены в таблице 3.3.

Сравнение инфекционной активности *daf+* клона 431-1 и *daf-* клона 431-6 E11 на клеточной линии RD не выявило статистически достоверного различия ($p > 0,05$) в начале ОЦР (0 минут). В условиях одинаковой множественности заражения (10 БОЕ/клетку), адсорбции вирусов на охлажденных до 4°C клетках и последующей отмывки клеточного монослоя, полученные результаты указывали на приблизительно одинаковый уровень связывания двух клонов с клетками. В условиях охлаждения клеток, препятствующих проникновению вирус-рецепторных комплексов внутрь клеток, это наблюдение позволило предположить отсутствие существенных различий уровня экспрессии связывающих рецепторов DAF и hFcRn на поверхности клеток RD.

Таблица 3.3. Результаты определения инфекционной активности в экспериментах с ОЦР *daf+* клона 431-1 и *daf-* клона 431-6 эховируса 11 в культуре клеток RD

Время ⁽¹⁾ [мин]	Инфекционная активность $lg(TЦД_{50})/мл$			
	Клон 431-1 (<i>daf+</i>)		Клон 431-6 (<i>daf-</i>)	
	$M \pm s$ ⁽²⁾	Разность с началом цикла ⁽³⁾	$M \pm s$ ⁽²⁾	Разность с началом цикла ⁽³⁾
0	6,8±0,24	0	6,6±0,21	0
30	5,9±0,23	-0,9**	6,5±0,15*	-0,1
60	5,4±0,24	-1,4**	6,2±0,23*	-0,4
120	5,1±0,17	-1,7**	5,9±0,23*	-0,7**
180	6,6±0,21	-0,2	6,5±0,15	-0,1
210	6,8±0,15	0	6,9±0,17	+0,3
240	8,9±0,15	+2,1**	8,1±0,17*	+1,5**
300	9,0±0,15	+2,2**	8,3±0,15*	+1,7**
420	9,0±0,21	+2,2**	9,0±0,21	+2,4**

Примечание:

¹ Время от начала ОЦР с момента переноса флаконов с культурой клеток в CO₂-инкубатор (для нагрева до 37°C) после адсорбции вируса.

² M – средняя величина инфекционной активности; s – стандартная ошибка.

³ Разность средних значений инфекционной активности в начале цикла (0 мин) и после инкубации клеток с вирусом в течение указанного интервала времени.

* Статистически достоверное ($p < 0,05$) различие инфекционной активности при сравнении клонов 431-1 и 431-6 на одинаковых интервалах времени инкубации.

** Статистически достоверное ($p < 0,05$) различие инфекционной активности одного и того же клона на разных интервалах времени инкубации по сравнению с началом цикла.

Инфекционная активность *daf+* клона 431-1 на интервале от 0 до 120 минут инкубации при 37°C постепенно снижалась почти на два порядка величины, в то время как снижение инфекционной активности *daf-* клона 431-6 было значительно менее выраженным и достигало статистически достоверного различия по сравнению с точкой 0 лишь через 120 минут. Через 180 и 210 минут инкубации при 37°C у обоих клонов наблюдалось увеличение инфекционной активности до сопоставимого уровня. Дальнейший рост инфекционной активности происходил быстрее у *daf+* клона 431-1 по сравнению с *daf-* клоном 431-6 (максимум наблюдался, соответственно, через 240 и 420 мин).

Значения расчётных параметров модели по результатам ОЦР *daf+* и *daf-* клона E11 в культуре клеток RD представлены в таблице 3.4.

Таблица 3.4. Расчётные параметры моделей ОЦР для *daf+* клона 431-1 и *daf-* клона 431-6 эховируса 11 в культуре клеток RD

Параметры модели	Единицы измерения	Культура клеток RD	
		Клон 431-1 (<i>daf+</i>)	Клон 431-6 (<i>daf-</i>)
<i>T_{min}</i>	мин	100	119
<i>V_u</i>	(ТЦД ₅₀ /мл)/мин	3,116×10 ⁴ (0-202) ⁽¹⁾	9,467×10 ³ (0-420) ⁽¹⁾
<i>T_{over}</i>	мин	11,619	0
<i>V_a</i>	(ТЦД ₅₀ /мл)/мин	3,237×10 ⁶ (12-305) ⁽¹⁾	2,503×10 ⁶ (0-308) ⁽¹⁾
<i>T_{max}</i>	мин	305,015	379,516
Кэфф. Тейла	%	2,231	1,351

Примечание:

¹ Расчётный временной интервал процесса [минуты от начала ОЦР].

Средняя скорость дезинтеграции капсида с высвобождением РНК у *daf+* клона 431-1 была в 3,2 раза выше, чем у *daf-* клона 431-6. Примечательно, что момент начала явного роста на возрастающей функции у *daf-* клона 431-6 наблюдался раньше (0 мин), чем у *daf+* клона 431-1 (11,6 мин).

Можно предположить, что данный факт соответствует более короткому времени внутриклеточного трафика *daf-* клона до сайта репликации. Скорость инкапсидации РНК у *daf+* клона 431-1 была в 1,29 раза выше, чем у *daf-* клона 431-6. Время достижения максимальной расчётной инфекционной активности за период наблюдения у *daf+* клона 431-1 составило 305 минут, тогда как у *daf-* клона 431-6 – 380 минут, что подтверждает предположение о более высокой скорости сборки вирионов у *daf+* клона по сравнению с *daf-* клоном.

Графики аппроксимирующих функций, рассчитанные с помощью математической модели по экспериментальным точкам, показаны на рисунке 3.5.

При сопоставимом уровне связывания двух клонов с клетками, более высокая скорость дезинтеграции капсида с высвобождением РНК *daf+* клона 431-

1 позволяет предположить более высокую пропускную способность пути входа в клетки RD, используемого клоном, взаимодействующим со связывающим рецептором DAF, по сравнению с пропускной способностью пути входа в клетки, используемого *daf*⁻ клоном 431-6, взаимодействующим с рецептором hFcRn на поверхности клеток.

Несмотря на более высокую пропускную способность пути входа в клетки, ассоциированного с рецептором DAF, вход в клетки с использованием данного рецептора приводил к отсроченному началу явного роста инфекционной активности у *daf*⁺ клона 431-1 относительно *daf*⁻ клона 431-6, что позволяло предположить более продолжительный внутриклеточный трафик *daf*⁺ клона до сайта репликации. Тем не менее, несмотря на отсроченное начало явного роста инфекционной активности, более высокая скорость инкапсидации РНК у *daf*⁺ клона 431-1 обеспечила к концу периода наблюдения опережающее достижение максимальной инфекционной активности *daf*⁺ клоном по сравнению с *daf*⁻ клоном 431-6.

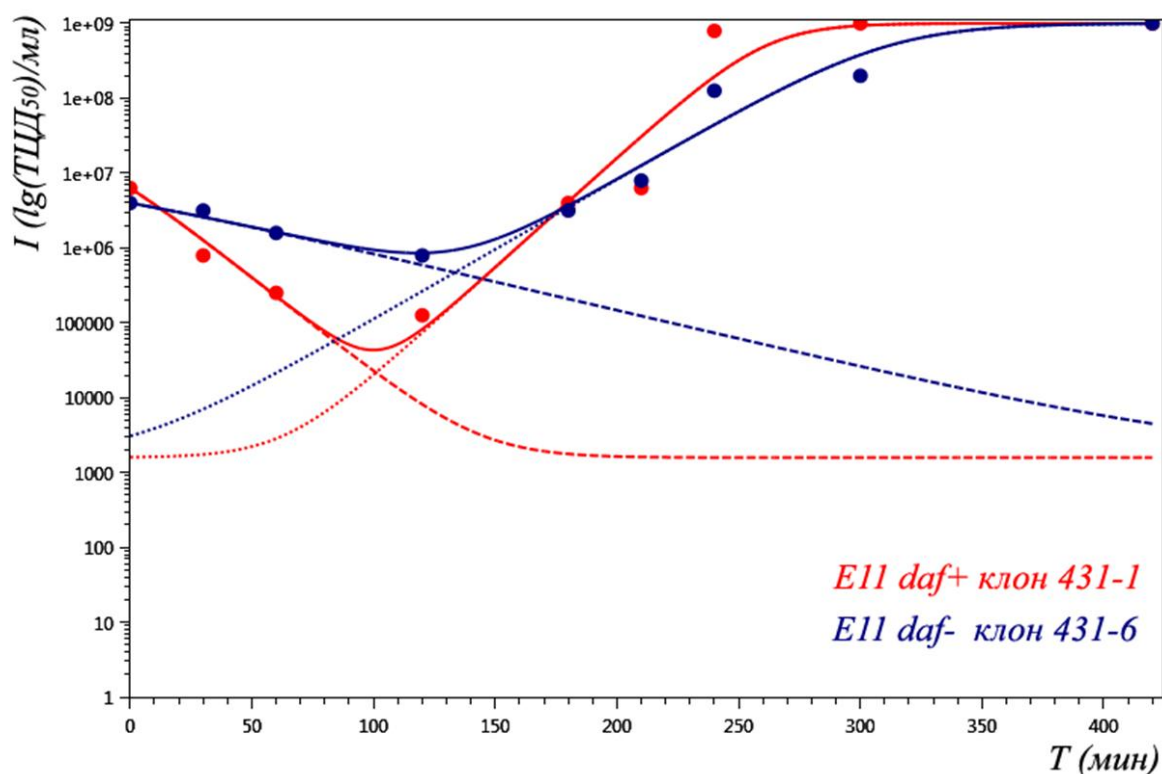


Рисунок 3.5. Моделирование изменений инфекционной активности в ОЦР для *daf*⁺ клона 431-1 и *daf*⁻ клона 431-6 эховируса 11 в культуре клеток RD.

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

3.3.2. Кинетические особенности одиночного цикла репродукции *daf+* и *daf-* клонов эховируса 11 в культуре клеток Л-41 КД/84

Результаты экспериментов с ОЦР *daf+* и *daf-* клонов Е11 в культуре клеток Л-41 КД/84 представлены в таблице 3.5.

При одинаковой множественности заражения клеток Л-41 КД/84 (10 БОЕ/клетку), уровень остаточной инфекционной активности у *daf+* клона 431-1 после адсорбции вируса с охлаждением клеток и отмывания монослоя был почти на три порядка величины ниже, чем у *daf-* клона 431-6.

Таблица 3.5. Результаты определения инфекционной активности в экспериментах с ОЦР *daf+* клона 431-1 и *daf-* клона 431-6 эховируса 11 в культуре клеток Л-41 КД/84

Время ⁽¹⁾ [мин]	Инфекционная активность $Ig(TЦД_{50})/мл$			
	Клон 431-1 (<i>daf+</i>)		Клон 431-6 (<i>daf-</i>)	
	$M \pm s$ ⁽²⁾	Разность с началом цикла ⁽³⁾	$M \pm s$ ⁽²⁾	Разность с началом цикла ⁽³⁾
0	3,6±0,21	0	6,3±0,23*	0
30	3,6±0,10	0	6,3±0,21*	0
60	3,6±0,24	0	6,2±0,23*	-0,1
120	3,8±0,15	+0,2	6,2±0,15*	-0,1
180	3,8±0,23	+0,2	5,6±0,15*	-0,7**
210	4,2±0,10	+0,6**	5,6±0,15*	-0,7**
240	5,4±0,10	+1,8**	5,9±0,15*	-0,4**
300	5,7±0,10	+2,1**	8,3±0,15*	+2,0**
420	8,6±0,17	+5,0**	8,6±0,15	+2,3**

Примечание:

¹ Время от начала ОЦР с момента переноса флаконов с культурой клеток в CO₂-инкубатор (для нагрева до 37°C) после адсорбции вируса.

² M – средняя величина инфекционной активности; s – стандартная ошибка.

³ Разность средних значений инфекционной активности в начале цикла (0 мин) и после инкубации клеток с вирусом в течение указанного интервала времени.

* Статистически достоверное ($p < 0,05$) различие инфекционной активности при сравнении клонов 431-1 и 431-6 на одинаковых интервалах времени инкубации.

** Статистически достоверное ($p < 0,05$) различие инфекционной активности одного и того же клона на разных интервалах времени инкубации по сравнению с началом цикла.

Так как условия экспериментов с культурой клеток Л-41 КД/84 были идентичны условиям, использовавшимся в экспериментах с культурой клеток RD, и остаточная инфекционная активность *daf*⁻ клона 431-6 в культуре клеток Л-41 КД/84 после отмывки монослоя была сопоставима с таковой в культуре RD, то полученный результат в случае *daf*⁺ клона 431-1 указывал на значительно меньший уровень экспрессии рецептора DAF на клетках Л-41 КД/84 по сравнению с клетками RD в условиях эксперимента.

Инфекционная активность *daf*⁺ клона 431-1 с начала цикла вплоть до 180-й минуты достоверно не отличалась от точки 0 (не наблюдалось явного снижения инфекционной активности). Затем на интервале 210 – 420 минут наблюдался рост инфекционной активности, в результате которого на 420-й минуте наблюдения инфекционная активность обоих клонов сравнялась. График ОЦР *daf*⁻ клона 431-6 имел продолжительный начальный участок убывания инфекционной активности (на интервале 180 – 240 минут она была статистически достоверно ниже таковой в точке 0) и участок быстрого роста (на интервале 300 – 420 минут).

Значения расчётных параметров моделей по результатам ОЦР клонов 431-1 и 431-6 в культуре клеток Л-41 КД/84 представлены в таблице 3.6.

Таблица 3.6. Расчётные параметры моделей ОЦР для *daf*⁺ клона 431-1 и *daf*⁻ клона 431-6 эховируса 11 в культуре клеток Л-41 КД/84

Параметры модели	Единицы измерения	Культура клеток Л-41 КД/84	
		Клон 431-1 (<i>daf</i> ⁺)	Клон 431-6 (<i>daf</i> ⁻)
1	2	3	4
<i>T_{min}</i>	мин	100	217

Продолжение таблицы 3.6

1	2	3	4
<i>Vu</i>	(ТЦД ₅₀ /мл)/мин	3,408 (0-420) ⁽¹⁾	4,571×10 ³ (0-420) ⁽¹⁾
<i>Tover</i>	мин	87,318	160,346
<i>Va</i>	(ТЦД ₅₀ /мл)/мин	6,392×10 ⁵ (87-420) ⁽¹⁾	2,287×10 ⁶ (160-326) ⁽¹⁾
<i>Tmax</i>	мин	420,000	325,728
<i>Коэфф. Тейла</i>	%	2,6169	0,8115

Примечание:

¹ Расчётный временной интервал процесса [минуты от начала ОЦР].

Средняя скорость дезинтеграции капсида с высвобождением РНК *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+* клоном, и объяснялось низким уровнем экспрессии рецептора DAF на клетках Л-41 КД/84 в условиях эксперимента. Тем не менее, момент начала явного роста на возрастающей функции у *daf+* клона 431-1 наблюдался раньше (через 87 минут), чем у *daf-* клона 431-1 (через 160 мин). Фаза эклипса у *daf+* клона была короче (100 мин), чем у *daf-* клона (217 мин). Полученные результаты позволяют предположить более продолжительный внутриклеточный трафик до сайта репликации у *daf-* клона 431-1 по сравнению *daf+* клоном 431-1.

Скорость инкапсидации РНК у *daf-* клона 431-1 была в 3,6 раза выше, чем у *daf+* клона 431-1, что позволило *daf-* клону достичь максимальной расчётной инфекционной активности за период наблюдения раньше (через 326 минут), чем *daf+* клону (через 420 минут).

Таким образом, в клетках Л-41 КД/84 более высокой пропускной способностью характеризовался путь входа в клетки, инициируемый рецептором hFcRn, что, наряду с более высокой скоростью инкапсидации у *daf-* клона, обеспечило ему меньшее время достижения максимальной инфекционной активности.

Графики аппроксимирующих функций, рассчитанные с помощью

математической модели по экспериментальным точкам, показаны на рисунке 3.6.

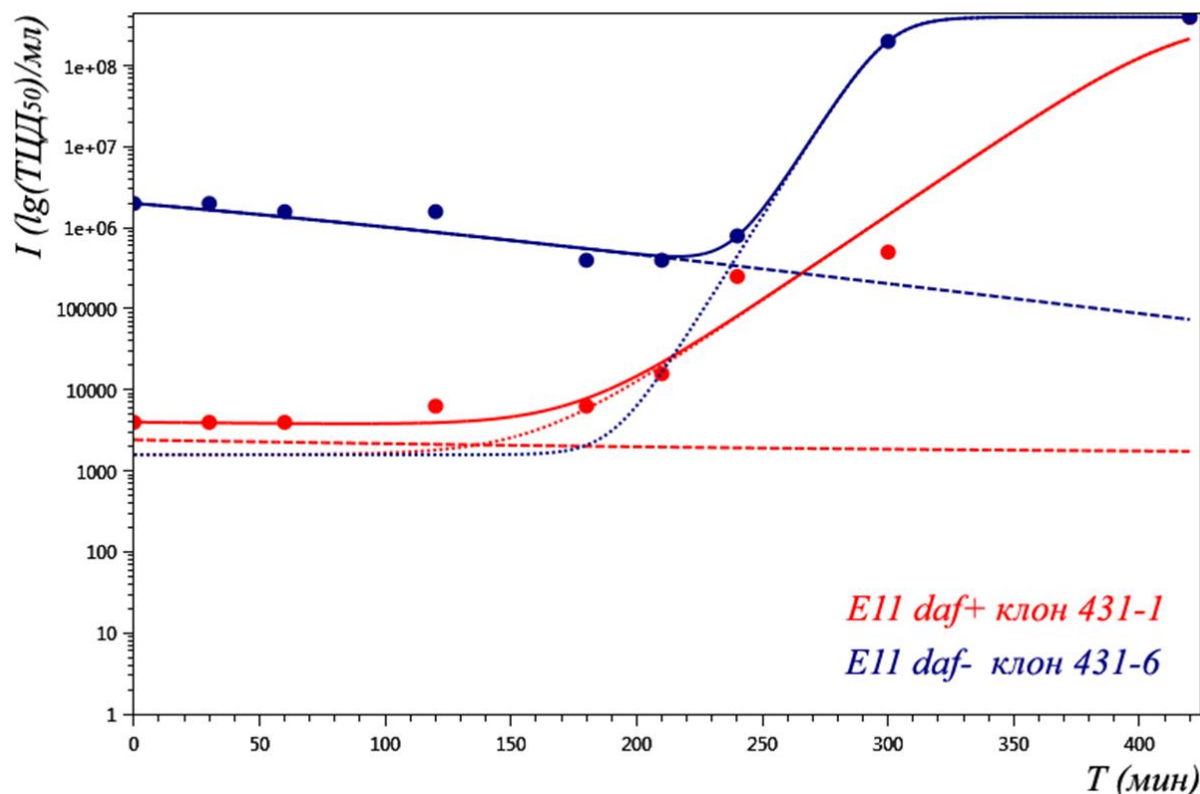


Рисунок 3.6. Моделирование изменений инфекционной активности в ОЦР для *daf+* клона 431-1 и *daf-* клона 431-6 эховируса 11 в культуре клеток Л-41 КД/84.

Примечание:

Ось абсцисс – время в минутах; ось ординат – инфекционная активность в $lg(\text{ТЦД}_{50})/\text{мл}$. Сплошные линии – итоговые функции; штриховые – убывающие функции; пунктирные – возрастающие функции.

Таким образом, в представленных экспериментах были показаны:

- 1) различная пропускная способность путей входа в клетки, используемых субтиповыми вариантами E11 с различной аффинностью к связывающему рецептору DAF;
- 2) различия в расчётных сроках начала явного роста инфекционной активности, которые могут быть обусловлены различной длительностью внутриклеточного трафика вируса до сайта репликации;
- 3) различия в скорости инкапсидации вирусной РНК, ассоциированные с разными путями входа субтиповых вариантов E11 в клетки.

Совокупность полученных результатов позволяет связать известные

селективные свойства культур клеток RD и Л-41 КД/84 в отношении *Daf+* и *Daf-* вариантов E11 с выявленными в ОЦР особенностями репродукции субтиповых вариантов: 1) с различным уровнем экспрессии рецептора DAF в двух клеточных линиях; 2) с различной пропускной способностью путей входа E11 в клетки, ассоциированных со связывающими рецепторами DAF и hFcRn; 3) с различиями в скорости инкапсидации геномной РНК у вариантов E11.

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

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

Для проверки возможности применения экспериментальной модели на основе субтиповых вариантов эховируса 11 с различной рецепторной специфичностью и разработанной математической модели в исследованиях влияния химических ингибиторов репродукции эховирусов на параметры ОЦР, в частности – на скорость дезинтеграции капсида, были проведены эксперименты с использованием роданина (СЗНЗНОS2) – известного ингибитора дезинтеграции капсида эховирусов 7 и 12 типа [22, 23].

Результаты экспериментов с клонированными *daf+* и *daf-* вариантами E11 в культуре клеток RD в присутствии роданина и без него представлены в таблице 3.7.

Сравнение инфекционной активности *daf+* клона 431-1 в присутствии роданина и без него показало достоверно более высокие значения инфекционной активности ($p < 0,05$) в присутствии роданина через 30, 60, 120, 180 и 210 минут от начала ОЦР, что подтвердило наличие эффекта роданина в отношении DAF-зависимого варианта E11. Через 240, 300 и 420 минут от начала ОЦР статистически достоверных различий инфекционной активности *daf+* клона 431-1

в присутствии роданина и без него выявлено не было.

Таблица 3.7. 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 роданина и без него

Время ⁽¹⁾ [мин]	Инфекционная активность $lg(TЦД_{50})/мл$					
	Клон 431-1 (<i>daf+</i>)			Клон 431-6 (<i>daf-</i>)		
	$M \pm s$ ⁽²⁾ без роданина	$M \pm s$ ⁽²⁾ с роданином	Эффект ингиби- тора ⁽³⁾	$M \pm s$ ⁽²⁾ без роданина	$M \pm s$ ⁽²⁾ с роданином	Эффект ингиби- тора ⁽³⁾
0	6,8±0,24	7,2±0,23	+0,4	6,6±0,21	6,5±0,15	-0,1
30	5,9±0,23	7,2±0,15	+1,3*	6,5±0,15	6,0±0,23	-0,5*
60	5,4±0,24	6,9±0,21	+1,5*	6,2±0,23	6,3±0,21	+0,1
120	5,1±0,17	7,6±0,15	+2,5*	5,9±0,23	5,9±0,15	0
180	6,6±0,21	7,6±0,10	+1,0*	6,5±0,15	6,2±0,15	-0,3
210	6,8±0,15	7,7±0,15	+0,9*	6,9±0,17	6,3±0,17	-0,6*
240	8,9±0,15	8,7±0,17	-0,2	8,1±0,17	7,8±0,15	-0,3*
300	9,0±0,15	9,0±0,21	0	8,3±0,15	8,4±0,21	+0,1
420	9,0±0,21	9,2±0,23	+0,2	9,0±0,21	9,0±0,23	0

Примечание:

¹ Время от начала ОЦР с момента переноса флаконов с культурой клеток в CO₂-инкубатор (для нагрева до 37°C) после адсорбции вируса.

² M – средняя величина инфекционной активности; s – стандартная ошибка.

³ Разность средних значений инфекционной активности без ингибитора и с ингибитором на одинаковых интервалах времени.

* Статистически достоверное ($p < 0,05$) различие инфекционной активности при сравнении экспериментов с роданином и без него на одинаковых интервалах времени инкубации.

Сравнение инфекционной активности *daf-* клона 431-6 в присутствии роданина и без него выявило отдельные точки с незначительным, но достоверным снижением инфекционной активности (через 30, 210 и 240 минут от начала ОЦР), что свидетельствовало о слабой выраженности эффекта роданина в отношении *daf-* клона E11, использующего связывающий рецептор hFcRn.

Расчётные параметры моделей для ОЦР *daf+* клона 431-1 и *daf-* клона 431-6 E11 в культуре клеток RD в присутствии роданина и без него представлены в таблице 3.8.

Таблица 3.8. Расчётные параметры моделей ОЦР для *daf+* клона 431-1 и *daf-* клона 431-6 эховируса 11 в культуре клеток RD в присутствии роданина и без него

Параметры модели	Единицы измерения	Культура клеток RD			
		Клон 431-1 (<i>daf+</i>)		Клон 431-6 (<i>daf-</i>)	
		без роданина	с роданином	без роданина	с роданином
<i>T_{min}</i>	мин	100	79	119	144
<i>V_u</i>	(ТЦД ₅₀ /мл)/ мин	$3,116 \times 10^4$ (0-202) ¹	$1,602 \times 10^4$ (0-420) ¹	$9,467 \times 10^3$ (0-420) ¹	$7,448 \times 10^3$ (0-420) ¹
<i>T_{over}</i>	мин	11,619	0	0	7,460
<i>V_a</i>	(ТЦД ₅₀ /мл)/ мин	$3,237 \times 10^6$ (12-305) ¹	$4,328 \times 10^6$ (0-348) ¹	$2,503 \times 10^6$ (0-308) ¹	$2,675 \times 10^6$ (0-363) ¹
<i>T_{max}</i>	мин	305,015	347,883	379,516	362,597
Кэфф. Тейла	%	2,231	1,308	1,351	1,699

Примечание:

¹ Расчётный временной интервал процесса [минуты от начала ОЦР].

Влияние роданина на параметры ОЦР *daf+* клона E11 проявилось в снижении скорости дезинтеграции капсида с высвобождением РНК в 1,95 раза по сравнению с исходной, в сокращении расчётного 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 расчётного 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 3.7 и 3.8.

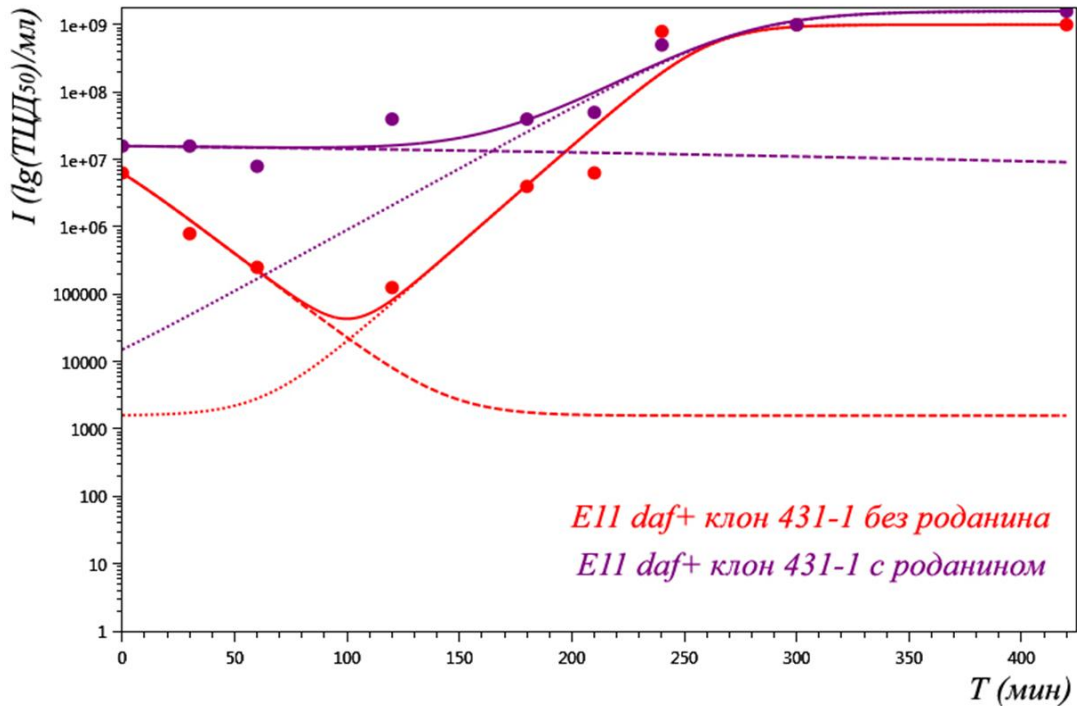


Рисунок 3.7. Моделирование изменений инфекционной активности в ОЦР для *daf+* клона 431-1 экзовируса 11 в культуре клеток RD с роданином и без него.

Примечание: Ось абсцисс – время в минутах; ось ординат – инфекционная активность в $lg(\text{ТЦД}_{50})/\text{мл}$. Сплошные линии – итоговые функции; штриховые – убывающие функции; пунктирные – возрастающие функции.

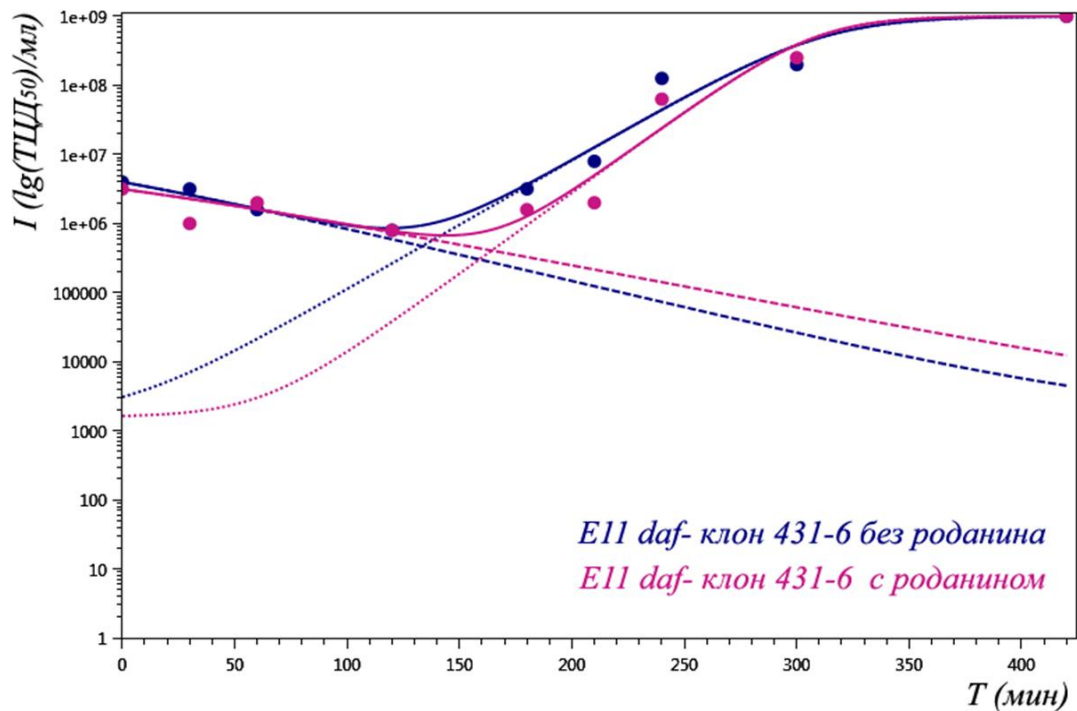


Рисунок 3.8. Моделирование изменений инфекционной активности в ОЦР для *daf-* клона 431-6 экзовируса 11 в культуре клеток RD с роданином и без него.

Примечание: Ось абсцисс – время в минутах; ось ординат – инфекционная активность в $Ig(TЦД_{50})/мл$. Сплошные линии – итоговые функции; штриховые – убывающие функции; пунктирные – возрастающие функции.

Так как ранее ингибирующий эффект роданина на дезинтеграцию капсида эховирусов изучался в экспериментах с эховирусами 7 и 12 типа, то полученные результаты впервые продемонстрировали влияние роданина на скорость дезинтеграции с высвобождением РНК Е11 в ОЦР, а также подтвердили возможность применения разработанной математической модели для изучения фазы эклипса в ОЦР с помощью химических (фармакологических) ингибиторов репродукции эховирусов. В отличие от применявшихся ранее способов оценивания эффектов роданина по влиянию на конечную продуктивность инфекции, в настоящем исследовании оказалось возможным количественно оценить влияние роданина на скорость процессов высвобождения и инкапсидации вирусной РНК при близких значениях максимальной инфекционной активности за период наблюдения.

Влияние роданина на параметры ОЦР *daf+* и *daf-* клонов Е11 проявлялось в снижении скорости дезинтеграции капсида с выходом вирусной РНК и в незначительном повышении скорости инкапсидации РНК; имело одинаковую направленность, но большую выраженность у *daf+* клона по сравнению с *daf-* клоном. Меньшую выраженность ингибирующего эффекта роданина в отношении *daf-* клона 431-6 можно объяснить тем, что данный клон, не взаимодействовавший со связывающим рецептором DAF, характеризовался исходно низкой скоростью дезинтеграции капсида, обусловленной использованием другого связывающего рецептора (hFcRn) и другого пути входа в клетки RD с меньшей пропускной способностью.

Точный молекулярный механизм ингибирующего эффекта роданина остаётся невыясненным. В исследованиях эховируса 12 было установлено, что роданин не влиял на адсорбцию и интернализацию вируса [22, 23]. Мутационный анализ эховируса 12 выявил 3 аминокислотные замены в капсидном белке VP1

(L68F, Y75C, V157A), обеспечивавшие резистентность к роданину, и 2 замены, приводившие к зависимости от роданина (V101A в VP1 и F53Y в VP4) [57]. С помощью радиоактивно меченного роданина было установлено, что он связывался с вирионом эховируса 12, причем это взаимодействие *не* нарушалось у роданин-резистентных и роданин-зависимых мутантов. Авторы исследования предположили, что выявленные аминокислотные замены не затрагивали сайт(ы) связывания роданина с вирионом, но усиливали подвижность капсидных белков, облегчая дезинтеграцию капсида и высвобождение вирусной РНК в присутствии роданина.

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

Нистатин (C₄₇H₇₅N₁₇O₁₇) – полиеновый противогрибковый антибиотик, обладающий высоким сродством к стеролам клеточных мембран – эргостеролу в клетках грибов и холестеролу (холестерину) в клетках животных [19, 49]. При высоких концентрациях, даже при отсутствии стеролов в искусственных мембранах, нистатин способен формировать трансмембранные поры, обладающие избирательностью в отношении молекул определенного размера, что обуславливает его цитотоксический эффект. В исследованиях эховирусов нистатин применялся как реагент, нарушающий функции липидных плотов плазматических мембран [59, 77, 106, 124], необходимым компонентом которых является холестерол. Одним из компонентов липидных плотов являются гликозилфосфатидилинозитол-заякоренные белки (GPI-APs), к которым относится DAF. В настоящей работе было изучено влияние нистатина на параметры ОЦР DAF-зависимого (*daf+*) клона E11 и *daf-* клона E11, не использующего DAF. Результаты экспериментов представлены в таблице 3.9.

Таблица 3.9. 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 нистатина и без него

Время ⁽¹⁾ [мин]	Инфекционная активность $lg(TCD_{50})/мл$					
	Клон 431-1 (<i>daf+</i>)			Клон 431-6 (<i>daf-</i>)		
	$M \pm s$ ⁽²⁾ без нистатина	$M \pm s$ ⁽²⁾ с нистатином	Эффект ингиби- тора ⁽³⁾	$M \pm s$ ⁽²⁾ без нистатина	$M \pm s$ ⁽²⁾ с нистатином	Эффект ингиби- тора ⁽³⁾
0	6,8±0,24	6,5±0,21	-0,3	6,6±0,21	5,4±0,21	-1,2*
30	5,9±0,23	6,0±0,27	+0,1	6,5±0,15	5,4±0,21	-1,1*
60	5,4±0,24	5,3±0,23	-0,1	6,2±0,23	4,5±0,27	-1,7*
120	5,1±0,17	5,1±0,27	0	5,9±0,23	4,8±0,21	-1,1*
180	6,6±0,21	4,1±0,21	-2,5*	6,5±0,15	4,4±0,15	-1,1*
210	6,8±0,15	3,1±0,15	-3,7*	6,9±0,17	5,3±0,15	-1,6*
240	8,9±0,15	3,4±0,23	-5,5*	8,1±0,17	5,5±0,21	-2,6*
300	9,0±0,15	5,7±0,21	-3,3*	8,3±0,15	5,3±0,23	-3,0*
420	9,0±0,21	6,0±0,21	-3,0*	9,0±0,21	5,6±0,15	-3,4*

Примечание:

¹ Время от начала ОЦР с момента переноса флаконов с культурой клеток в CO₂-инкубатор (для нагрева до 37°C) после адсорбции вируса.

² M – средняя величина инфекционной активности; s – стандартная ошибка.

³ Разность средних значений инфекционной активности без ингибитора и с ингибитором на одинаковых интервалах времени.

* Статистически достоверное ($p < 0,05$) различие инфекционной активности при сравнении экспериментов с нистатином и без него на одинаковых интервалах времени.

Сравнение инфекционной активности *daf+* клона 431-1 в культуре клеток RD в присутствии нистатина и без него в начале ОЦР (0 минут) не выявило статистически достоверного различия ($p > 0,05$). В условиях одинаковой множественности заражения (10 БОЕ/клетку), адсорбции вирусов на охлаждённых до 4°C клетках с последующей отмывкой клеточного монослоя, полученные результаты указывали на отсутствие влияния нистатина на уровень связывания *daf+* клона E11 с клетками RD.

Это наблюдение позволило предположить отсутствие влияния нистатина на

экспрессию рецептора DAF в условиях охлаждения клеток. Снижение инфекционной активности *daf+* клона в присутствии нистатина характеризовалось большей продолжительностью (до 210 минут от начала цикла), чем в отсутствие нистатина (до 120 минут от начала цикла). К концу периода наблюдения максимальная инфекционная активность у данного клона была на 3 порядка величины ниже в присутствии нистатина, чем без него.

Инфекционная активность *daf-* клона 431-6 в культуре клеток RD в начале ОЦР (0 минут) в присутствии нистатина была достоверно ниже ($p < 0,05$), более чем на порядок величины, чем инфекционная активность без нистатина. Учитывая условия эксперимента, препятствовавшие проникновению вирус-рецепторных комплексов внутрь клеток на этапе адсорбции, полученный результат указывал на снижение уровня экспрессии рецептора hFcRn на поверхности клеток RD в присутствии нистатина. Снижение инфекционной активности *daf-* клона в присутствии нистатина также характеризовалось большей продолжительностью (до 180 минут от начала цикла), чем в отсутствие нистатина (до 120 минут от начала цикла). К концу периода наблюдения максимальная инфекционная активность у данного клона была более чем на 3 порядка величины ниже в присутствии нистатина, чем без него.

Расчётные параметры моделей для ОЦР *daf+* клона 431-1 E11 в культуре клеток RD в присутствии нистатина и без него представлены в таблице 3.10.

Влияние нистатина на параметры ОЦР *daf+* клона E11 проявилось в снижении скорости дезинтеграции капсида с высвобождением РНК в 3,08 раза по сравнению с исходной, в удлинении расчётного 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 в 16,0 раз по сравнению с исходной, в удлинении расчётного 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.

Таблица 3.10. Расчётные параметры моделей ОЦР для *daf+* клона 431-1 и *daf-* клона 431-6 эховируса 11 в культуре клеток RD в присутствии нистатина и без него

Параметры модели	Единицы измерения	Культура клеток RD			
		Клон 431-1 (<i>daf+</i>)		Клон 431-6 (<i>daf-</i>)	
		без нистатина	с нистатином	без нистатина	с нистатином
<i>T_{min}</i>	мин	100	246	119	168
<i>V_u</i>	(ТЦД ₅₀ /мл) /мин	$3,116 \times 10^4$ (0-202) ¹	$1,013 \times 10^4$ (0-311) ¹	$9,467 \times 10^3$ (0-420) ¹	$5,905 \times 10^2$ (0-420) ¹
<i>T_{over}</i>	мин	11,619	87,318	0	134,301
<i>V_a</i>	(ТЦД ₅₀ /мл) /мин	$3,238 \times 10^6$ (12-305) ¹	$1,235 \times 10^4$ (241-317) ¹	$2,503 \times 10^6$ (0-380) ¹	$2,623 \times 10^3$ (134-236) ¹
<i>T_{max}</i>	мин	305,015	368,756	379,516	236,224
Коэфф. Тейла	%	2,231	2,408	1,351	2,125

Примечание:

¹ Расчетный временной интервал процесса [минуты от начала ОЦР].

Графики аппроксимирующих функций показаны на рисунках 3.9 и 3.10.

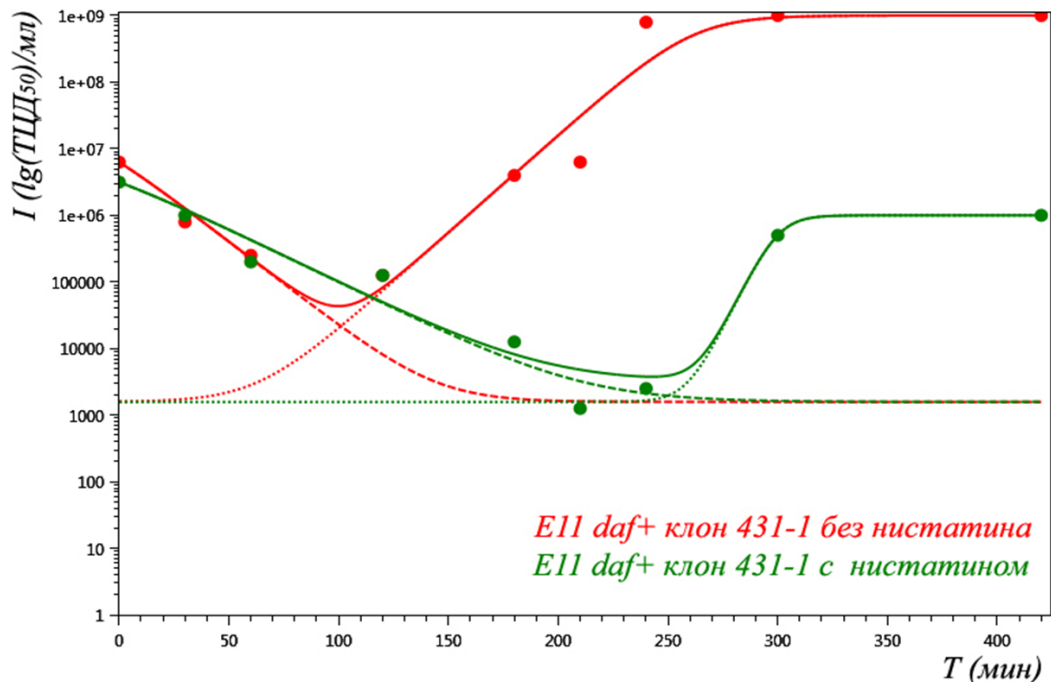


Рисунок 3.9. Моделирование изменений инфекционной активности в ОЦР для

daf+ клона 431-1 эховируса 11 в культуре клеток RD с нистатином и без него.

Примечание: Ось абсцисс – время в минутах; ось ординат – инфекционная активность в $lg(TЦД_{50})/мл$. Сплошные линии – итоговые функции; штриховые – убывающие функции; пунктирные – возрастающие функции.

Таким образом, ингибирующие эффекты нистатина на репродукцию как *daf+*, так и *daf-* клона эховируса 11 в культуре клеток RD имели одинаковую направленность и проявлялись в снижении скорости дезинтеграции капсида с высвобождением РНК, в удлинении расчётного интервала времени до начала явного роста инфекционной активности, в снижении скорости инкапсидации РНК и в снижении максимального уровня инфекционной активности к концу периода наблюдения. В отличие от *daf+* клона E11, у *daf-* клона наблюдалось снижение исходного уровня связывания с клетками в присутствии нистатина, что указывало на снижение уровня экспрессии связывающего рецептора hFcRn, а также наблюдались более выраженные проявления ингибирующих эффектов, чем у *daf+* клона.

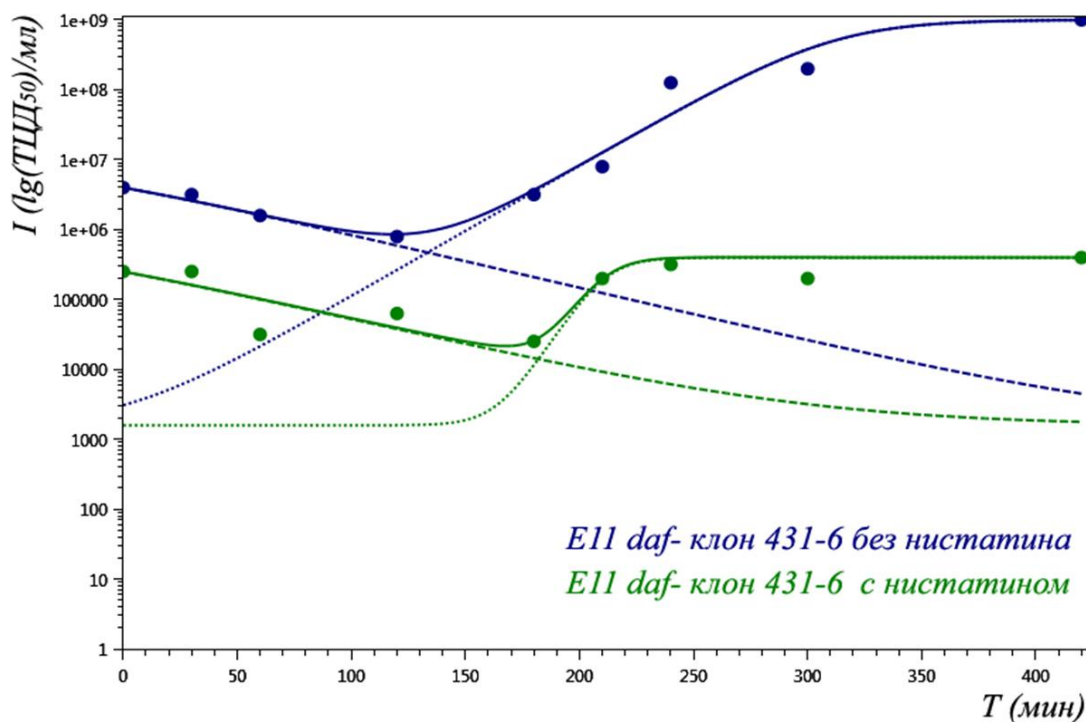


Рисунок 3.10. Моделирование изменений инфекционной активности в ОЦР для *daf-* клона 431-6 эховируса 11 в культуре клеток RD с нистатином и без него.

Примечание: Ось абсцисс – время в минутах; ось ординат – инфекционная

активность в $lg(TЦД_{50})/мл$. Сплошные линии – итоговые функции; штриховые – убывающие функции; пунктирные – возрастающие функции.

Сравнение изменений в форме графиков ОЦР у *daf*⁺ клона E11 под влиянием роданина и нистатина в фазе эклипса показывает, что роданин изменял угол наклона убывающей функции, приближая её к горизонтальной линии за счёт ингибирования процесса дезинтеграции, в то время как при воздействии нистатина такая тенденция не наблюдалась. Воздействие нистатина вызывало задержку начала явного роста инфекционной активности и снижение максимальной инфекционной активности в периоде наблюдения. Следовательно, основным механизмом ингибирующего эффекта нистатина на репродукцию *daf*⁺ клона E11 был связан не с блокированием процесса дезинтеграции капсида, а с подавлением репликации вируса, которая происходит в вирус-индуцированных везикулах, образующихся в результате реорганизации внутриклеточных мембран под влиянием неструктурного белка 3СD пикорнавирусов [5]. Аналогичным образом можно интерпретировать изменения в форме графиков ОЦР в фазе эклипса у *daf*⁻ клона E11 под влиянием нистатина. Снижение уровня экспрессии связывающего рецептора hFcRn для *daf*⁻ клона E11 при воздействии нистатина могло быть связано как с нарушением синтеза данного рецептора, так и с нарушением его транспортировки к плазматической мембране клеток.

3.3.3.3. 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 [115]. 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 [105, 111]. Stuart et al. [106] было показано, что нокодазол избирательно подавлял репродукцию *Daf*⁺ варианта E11,

задерживая его дезинтеграцию капсида в клетках RD, в то время как *Daf*⁻ вариант E11 был нечувствителен к действию нокодазола. В недавно опубликованной работе Vandesande et al. [114] также изучалось влияние нокодазола на репродукцию *Daf*⁺ варианта эховируса 30 в клетках RD.

Так как опубликованные результаты были получены методом иммунофлуоресценции при высокой множественности заражения (100 БОЕ/клетку) и только для двух моментов времени (60 минут и 6 часов после заражения клеток), то представляло интерес изучение влияния нокодазола на результаты экспериментов с ОЦР *daf*⁺ клона 431-1 и *daf*⁻ клона 431-6 E11 с применением математической модели.

Результаты экспериментов с нокодазолом представлены в таблице 3.11.

Таблица 3.11. 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 нокодазола и без него

Время ⁽¹⁾ [мин]	Инфекционная активность $lg(TЦД_{50})/мл$					
	Клон 431-1 (<i>daf</i> ⁺)			Клон 431-6 (<i>daf</i> ⁻)		
	$M \pm s$ ⁽²⁾ без ноко- дазола	$M \pm s$ ⁽²⁾ с ноко- дазолом	Эффект ингиби- тора ⁽³⁾	$M \pm s$ ⁽²⁾ без ноко- дазола	$M \pm s$ ⁽²⁾ с ноко- дазолом	Эффект ингиби- тора ⁽³⁾
0	6,8±0,24	6,9±0,21	+0,1	6,6±0,21	5,6±0,15	-1,0*
30	5,9±0,23	6,5±0,15	+0,6*	6,5±0,15	5,2±0,17	-1,3*
60	5,4±0,24	6,6±0,01	+1,2*	6,2±0,23	4,8±0,01	-1,4*
120	5,1±0,17	6,2±0,15	+1,1*	5,9±0,23	5,0±0,15	-0,9*
180	6,6±0,21	6,6±0,27	0	6,5±0,15	5,1±0,15	-1,4*
210	6,8±0,15	7,8±0,01	+1,0*	6,9±0,17	5,2±0,17	-1,7*
240	8,9±0,15	8,0±0,23	-0,9*	8,1±0,17	5,9±0,15	-2,2*
300	9,0±0,15	8,9±0,23	-0,1	8,3±0,15	7,2±0,21	-1,1*
420	9,0±0,21	9,2±0,23	+0,2	9,0±0,21	7,7±0,23	-1,3*

Примечание:

¹ Время от начала ОЦР с момента переноса флаконов с культурой клеток в CO₂-инкубатор (для нагрева до 37°C) после адсорбции вируса.

² M – средняя величина инфекционной активности; s – стандартная ошибка.

³ Разность средних значений инфекционной активности без ингибитора и с ингибитором на одинаковых интервалах времени.

* Статистически достоверное ($p < 0,05$) различие инфекционной активности при сравнении экспериментов с нокодазолом и без него на одинаковых интервалах времени инкубации.

Сравнение инфекционной активности *daf*⁺ клона 431-1 в культуре клеток RD в присутствии нокодазола и без него в начале ОЦР (0 минут) не выявило статистически достоверного различия ($p > 0,05$). В условиях одинаковой множественности заражения (10 БОЕ/клетку), адсорбции вирусов на охлаждённых до 4°C клетках с последующей отмывкой клеточного монослоя, полученные результаты указывали на отсутствие влияния нокодазола на уровень связывания *daf*⁺ клона E11 с клетками RD, что предполагало отсутствие влияния нокодазола на экспрессию рецептора DAF в условиях эксперимента.

В присутствии нокодазола наблюдалось достоверное ($p < 0,05$) увеличение инфекционной активности *daf*⁺ клона на интервале от 30 до 120 минут от начала ОЦР, что подтверждало ингибирование процесса дезинтеграции капсида с высвобождением РНК. К концу периода наблюдения у данного клона максимальная инфекционная активность в присутствии нокодазола не отличалась от таковой без него.

Инфекционная активность *daf*⁻ клона 431-6 в культуре клеток RD в начале ОЦР (0 минут) в присутствии нокодазола была достоверно ниже ($p < 0,05$) на порядок величины по сравнению с инфекционной активностью без нокодазола. Учитывая, что условия эксперимента препятствовали проникновению вирус-рецепторных комплексов внутрь клеток на этапе адсорбции, полученный результат указывал на снижение уровня экспрессии рецептора hFcRn на поверхности клеток RD в присутствии нокодазола. Инфекционная активность *daf*⁻ клона в присутствии нокодазола продолжала снижаться на интервале 30 и 60 минут от начала ОЦР, что указывало на менее выраженный эффект ингибирования дезинтеграции *daf*⁻ клона по сравнению с *daf*⁺ клоном. В течение

всего периода наблюдения инфекционная активность у *daf*⁻ клона была приблизительно на порядок величины ниже в присутствии нокодазола при сравнении с инфекционной активностью для тех же интервалов времени без нокодазола.

Расчётные параметры моделей ОЦР для *daf*⁺ клона 431-1 E11 в культуре клеток RD в присутствии нокодазола и без него представлены в таблице 3.12.

Таблица 3.12. Расчётные параметры моделей ОЦР для *daf*⁺ клона 431-1 и *daf*⁻ клона 431-6 эховируса 11 в культуре клеток RD в присутствии нокодазола и без него

Параметры модели	Единицы измерения	Культура клеток RD			
		Клон 431-1 (<i>daf</i> ⁺)		Клон 431-6 (<i>daf</i> ⁻)	
		без нокодазола	с нокодазолом	без нокодазола	с нокодазолом
<i>T</i>_{min}	мин	100	125	119	152
<i>V</i>_u	(ТЦД ₅₀ /мл) /мин	3,116×10 ⁴ (0-202) ¹	1,881×10 ⁴ (0-420) ¹	9,467×10 ³ (0-420) ¹	9,315×10 ² (0-420) ¹
<i>T</i>_{over}	мин	11,619	0	0	35,8438
<i>V</i>_a	(ТЦД ₅₀ /мл) /мин	3,238×10 ⁶ (12-305) ¹	4,351×10 ⁶ (0-346) ¹	2,503×10 ⁶ (0-308) ¹	1,369×10 ⁵ (36-384) ¹
<i>T</i>_{max}	мин	305,015	346,037	379,516	383,733
Кэфф. Тейла	%	2,231	1,091	1,351	1,662

Примечание:

¹ Расчётный временной интервал процесса [минуты от начала ОЦР].

Влияние нокодазола на параметры ОЦР *daf*⁺ клона E11 проявилось в снижении скорости дезинтеграции капсида с высвобождением РНК 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 в 10,2 раза по сравнению с исходной, в удлинении расчётного 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 3.11 и 3.12.

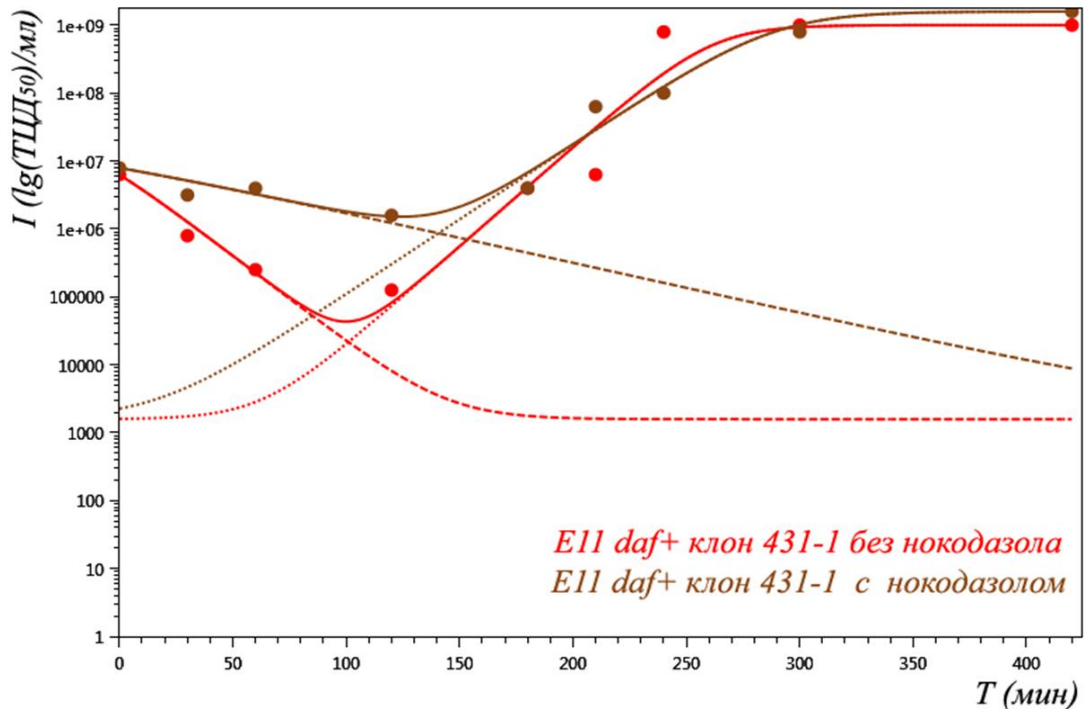


Рисунок 3.11. Моделирование изменений инфекционной активности в ОЦР для *daf*⁺ клона 431-1 эховируса 11 в культуре клеток RD с нокодазолом и без него.

Примечание: Ось абсцисс – время в минутах; ось ординат – инфекционная активность в $\lg(\text{ТЦД}_{50})/\text{мл}$. Сплошные линии – итоговые функции; штриховые – убывающие функции; пунктирные – возрастающие функции.

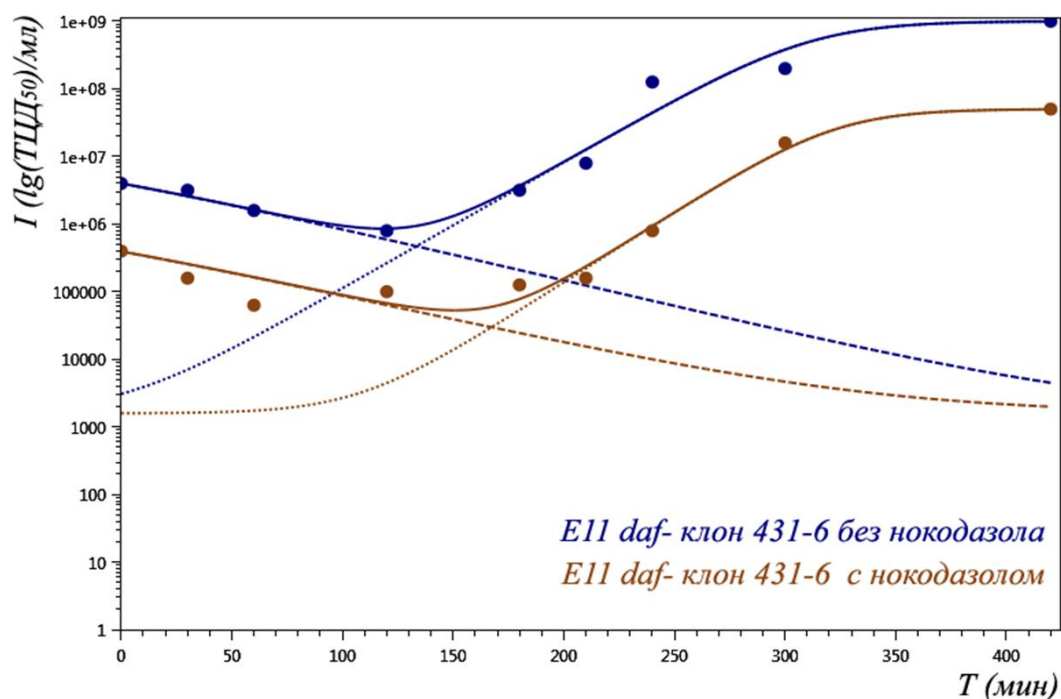


Рисунок 3.12. Моделирование изменений инфекционной активности в ОЦР для *daf-* клона 431-6 эховируса 11 в культуре клеток RD с нокодазолом и без него.

Примечание: Ось абсцисс – время в минутах; ось ординат – инфекционная активность в $\lg(\text{ТЦД}_{50})/\text{мл}$. Сплошные линии – итоговые функции; штриховые – убывающие функции; пунктирные – возрастающие функции.

Выполненное нами исследование изменений инфекционной активности в ОЦР *daf+* клона E11, использующего связывающий рецептор DAF и дезинтегрирующий капсид рецептор hFcRn, выявило следующие эффекты нокодазола: 1) отсутствие изменения начального уровня связывания вируса с клетками, указывавшее на отсутствие снижения уровня экспрессии DAF в присутствии нокодазола; 2) снижение скорости дезинтеграции капсида с высвобождением вирусной РНК и удлинение фазы эклипса, согласующиеся и дополняющие данные литературы, полученные методом иммунофлуоресценции; 3) отсутствие влияния нокодазола на максимальную инфекционную активность *daf+* клона за период наблюдения. Таким образом, нокодазол снижал пропускную способность пути входа *daf+* клона E11 в клетки RD только на этапе дезинтеграции капсида, не влияя на экспрессию рецептора DAF и на максимальную инфекционную активность.

Известно, что блокирование нокодазолом везикулярного транспорта, зависящего от микротрубочек, не препятствует закислению внутренней среды транспортных везикул, что было продемонстрировано по отсутствию ингибирующего действия нокодазола на депротенинизацию риновируса RV-A2 в клетках HeLa [6]. Отсутствие влияния нокодазола на закисление внутренней среды везикул позволяет предположить другую вероятную причину снижения скорости депротенинизации *daf+* клона E11 в присутствии нокодазола: нарушение созревания эндосомы с вирусом в процессе её внутриклеточного трафика, который сопровождается заменой компонентов мембраны эндосом.

Выполненное нами исследование изменений инфекционной активности в ОЦР *daf-* клона E11, использующего hFcRn в качестве связывающего и дезинтегрирующего капсид рецептора, позволило выявить следующие эффекты нокодазола: 1) снижение начального уровня связывания вируса с клетками, обусловленное снижением экспрессии hFcRn на поверхности клеток; 2) снижение скорости дезинтеграции капсида с высвобождением РНК и удлинение фазы эклипса; 3) снижение скорости инкапсидации вирусной РНК; 4) снижение максимального уровня инфекционной активности, достигнутого за период наблюдения. Наблюдавшееся в экспериментах с ОЦР *daf-* клона 431-6 снижение инфекционной активности на всех интервалах времени в присутствии нокодазола можно интерпретировать как нарушение функции репликативных комплексов E11, для формирования которых необходимы COP1 везикулы [31], перемещающиеся внутри клеток с участием микротрубочек, разрушаемых нокодазолом.

Таким образом, показано различное влияние нокодазола на репродукцию субтиповых вариантов E11 в культуре клеток RD, связанное с различной чувствительностью путей входа *daf+* и *daf-* вариантов E11 к блокированию везикулярного транспорта, зависящего от микротрубочек. Ингибирующее действие нокодазола на репродукцию *daf+* варианта E11 (клона 431-1) проявлялось в выраженном снижении скорости дезинтеграции капсида с высвобождением РНК, что может быть следствием нарушения внутриклеточного

трафика и созревания эндосом, образующихся в результате взаимодействия E11 со связывающим рецептором DAF. Ингибирующее действие нокодазола на репродукцию *daf*⁻ варианта E11 (клона 431-6) может быть следствием снижения экспрессии hFcRn на поверхности клеток и следствием нарушения функции репликативных комплексов E11, для формирования которых необходим транспорт COP1 везикул.

3.3.4. Итоги изучения особенностей одиночного цикла репродукции клонированных субтиповых вариантов эховируса 11 с различной рецепторной специфичностью

1. В культуре клеток RD была обнаружена более высокая пропускная способность пути входа в клетки и более высокая скорость инкапсидации у DAF-зависимого клона эховируса 11 по сравнению с клоном, не использующим связывающий рецептор DAF. Выявленные различия в кинетике репродукции двух клонов согласуются с полученными ранее данными о позитивной селекции *Daf*⁺ вариантов эховирусов в культуре клеток RD.

2. В культуре клеток Л-41 КД/84 была показана более высокая пропускная способность пути входа в клетки и более высокая скорость сборки вирионов у клона эховируса 11, не использующего связывающий рецептор DAF, по сравнению с DAF-зависимым клоном. Выявленные различия в кинетике репродукции двух клонов согласуются с полученными ранее данными о позитивной селекции *Daf*⁻ вариантов эховирусов в культуре клеток Л-41 КД/84.

3. Продемонстрирован ингибирующий эффект роданина на скорость дезинтеграции капсида с высвобождением РНК эховируса 11, что подтвердило адекватность использованной экспериментальной и математической модели для исследований кинетики дезинтеграции капсида с высвобождением РНК эховирусов в одиночном цикле репродукции при воздействии химических ингибиторов.

4. Показана различная выраженность ингибирующего эффекта роданина в зависимости от пути входа вариантов эховируса 11 в клетки: более выраженное ингибирующее действие наблюдалось у DAF-зависимого клона эховируса 11, использующего связывающий рецептор DAF и дезинтегрирующий рецептор hFcRn, по сравнению с клоном, использующим hFcRn в качестве связывающего и дезинтегрирующего рецептора.

5. Обнаружена одинаковая направленность эффектов нистатина в одиночном цикле репродукции вариантов эховируса 11 с различным сродством к рецептору DAF: снижение скорости дезинтеграции капсида с высвобождением РНК, задержка начала инкапсидации и снижение скорости инкапсидации вирусной РНК, снижение продуктивности инфекции. Количественное сравнение ингибирующих эффектов нистатина выявило более выраженные эффекты в отношении варианта эховируса 11, использующего hFcRn в качестве связывающего и дезинтегрирующего рецептора.

6. Исследование изменений инфекционной активности в одиночном цикле репродукции у DAF-зависимого варианта эховируса 11 выявило снижение скорости дезинтеграции капсида с высвобождением вирусной РНК в присутствии нокодазола, не сопровождавшееся снижением начального уровня связывания вируса с клетками или снижением максимально достигнутого уровня инфекционной активности.

7. У варианта эховируса 11, использующего hFcRn в качестве связывающего и дезинтегрирующего рецептора, в присутствии нокодазола наблюдалось снижение начального уровня связывания вируса с клетками, снижение скорости дезинтеграции капсида с выходом РНК и скорости инкапсидации вирусной РНК, а также снижение максимального уровня инфекционной активности, достигнутого за период наблюдения.

8. Таким образом, использование клонированных вариантов эховируса 11 с различной рецепторной специфичностью в экспериментах с одиночным циклом репродукции и варьируемыми условиями (тип культуры клеток, воздействие химических ингибиторов), позволило выяснить количественные

различия пропускной способности путей входа эховирусов в клетки, инициируемых рецепторами DAF и hFcRn.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эховирусы характеризуются большим потенциалом изменчивости в отношении способности к взаимодействию с отдельными связывающими рецепторами на поверхности клеток, такими как DAF, HSPG и интегрин $\alpha V\beta 3$, наряду с потенциалом вариабельной мультирецепторной специфичности. В лабораторных условиях селекция субтиповых вариантов эховирусов с изменённым тропизмом к отдельным связывающим рецепторам способствует адаптации эховирусов к различным культурам клеток. Вместе с тем, экспрессия исключительно связывающих рецепторов, в отсутствие дезинтегрирующих капсид рецепторов (таких как PVR, CAR или ICAM-1), не обеспечивает пермиссивность клеток для заражения энтеровирусами, поскольку лишь дезинтегрирующие капсид рецепторы приводят к трансформации вирионов энтеровирусов в А-частицы с последующим освобождением вирусной РНК. Способность к взаимодействию с определённым дезинтегрирующим рецептором является высоко консервативным признаком субвидовых групп энтеровирусов, однако до недавнего времени дезинтегрирующий рецептор для эховирусов оставался неизвестным.

Первой задачей диссертационной работы была проверка гипотезы о роли hFcRn в качестве общего дезинтегрирующего капсид рецептора для эховирусов. Для решения данной задачи были проведены эксперименты, показавшие специфичность и избирательность (по спектру энтеровирусов) подавления репродукции эховирусов с помощью блокирования hFcRn либо его физиологическим лигандом – альбумином, либо антителами к hFcRn, обеспечивавшими защитный эффект в культуре клеток RD. Спектр протективной активности альбумина и антител к hFcRn, выявленный нами при заражении культур клеток RD отдельными типами эховирусов и коксакивирусов, соответствовал спектру протективной активности описанных ранее моноклональных антител к гликопротеину gp44 [67]. Поскольку моноклональные

антитела к gp44 ингибировали репродукцию практически всех типов эховирусов и коксакивируса А9, и gp44 был идентифицирован как FCGRT (альфа-цепь hFcRn), то полученные нами результаты для отдельных типов эховирусов и коксакивируса А9 оказалось возможным экстраполировать на всю группу эховирусов.

Защитный эффект человеческого альбумина и антител к hFcRn был продемонстрирован нами для двух ранее полученных и охарактеризованных [73] близкородственных клонов эховируса 11, отличавшихся единственной аминокислотной заменой в сайте связывания вириона с рецептором DAF и имевших одинаковую структуру капсидных белков в области каньона. Так как было известно, что репродукция обоих клонов эховируса 11 подавлялась антителами к бета-2-микроглобулину, то это наблюдение позволило предположить существование либо общего механизма дезинтеграции капсида с высвобождением РНК, либо существование общего клеточного рецептора, связывающегося с каньоном, функциональность которого зависела от бета-2-микроглобулина. Поскольку бета-2-микроглобулин является бета-субъединицей рецептора hFcRn, а блокирование данного рецептора альбумином или антителами к hFcRn подавляло репродукцию обоих клонов, то общий клеточный рецептор, связывающийся с каньоном у двух клонов, мог быть идентифицирован как hFcRn.

Незадолго до принятия к публикации полученных нами данных о роли hFcRn в сборник материалов конференции (04.03.2019) [138], была принята к публикации (09.01.2019) работа Morosky et al. [71], в которой другими методами и на других культурах клеток была показана роль hFcRn в качестве «первичного», «пан-эховирусного» рецептора. В частности, было установлено прямое взаимодействие рекомбинантной молекулы rFcRn-B2M (состоявшей из внеклеточного домена hFcRn и бета-2-микроглобулина) с вирионами эховирусов 11 и 30 типа, а также показано вируснейтрализующее действие молекулы rFcRn-B2M. Немного позже (16.04.2019) была принята к публикации работа Zhao et al. [127], где была определена роль hFcRn в качестве «универсального дезинтегрирующего рецептора для эховирусов, коксакивируса А9 и других

физиологически близкородственных энтеровирусов группы В», а также методом криоэлектронной микроскопии была получена модель комплекса эховируса 6 и hFcRn с высоким разрешением в области контакта FCGRT и каньона эховируса 6.

Длительность и величина наблюдавшихся нами протективных эффектов альбумина или антител к hFcRn в культуре клеток RD были менее выраженными у эховирусов, способных к связыванию с DAF, по сравнению с эховирусами, не взаимодействовавшими с DAF. Это наблюдение согласуется с описанным ранее низким уровнем спонтанной элюции А-частиц у DAF-зависимого варианта эховируса 7 в культуре клеток RD [80], подразумевавшим преимущественно внутриклеточную локализацию неизвестного в то время дезинтегрирующего рецептора hFcRn. Нами наблюдалась перинуклеарная локализация hFcRn в клетках RD методом непрямой иммунофлуоресценции, что не противоречит предположению о преимущественно внутриклеточной локализации данного рецептора. В соответствии с двухэтапной схемой взаимодействия DAF-зависимых эховирусов с рецепторами при входе в клетку, сначала происходит взаимодействие со связывающим рецептором DAF, затем – с дезинтегрирующим рецептором hFcRn. При условиях неполного блокирования hFcRn альбумином или антителами к hFcRn (при слабой экспрессии hFcRn на плазматической мембране клеток), варианты эховирусов, взаимодействовавшие с рецептором DAF, были способны входить в клетки более эффективно, взаимодействуя с hFcRn уже внутри клеток, по сравнению с Daf- вариантами эховирусов, взаимодействовавшими только с hFcRn в качестве связывающего и дезинтегрирующего рецептора. Таким образом, при слабой экспрессии дезинтегрирующего рецептора на плазматической мембране клеток, более эффективный вход в клетки осуществлялся эховирусами, взаимодействовавшими со связывающим рецептором.

Учитывая высокий потенциал изменчивости (мульти)рецепторной специфичности эховирусов, возможную вариабельность уровня экспрессии клеточных рецепторов для эховирусов в зависимости от типа клеток, а также функционирование в клетках нескольких путей эндоцитоза, представляла интерес

задача сравнительной оценки пропускной способности отдельных путей входа эховирусов в клетки при различных экспериментальных условиях. Для решения этой задачи была разработана математическая модель, позволяющая количественно описывать объект моделирования – изменение инфекционной активности эховирусов в одиночном цикле репродукции – как результат двух процессов: дезинтеграции капсида с высвобождением РНК эховирусов при входе в клетку и инкапсидации вирусной РНК при сборке новых вирионов.

Задачей математической модели являлся подбор двух логистических (S -образных) функций, сумма значений которых приближалась бы к экспериментальному графику. Убывающая логистическая функция соответствовала процессу дезинтеграции капсида с высвобождением РНК из исходных вирионов, возрастающая функция – процессу инкапсидации вирусной РНК при сборке новых вирионов. Оптимизация приближения теоретических функций к экспериментальному графику выполнялась численным методом роя частиц (particle swarm optimization) с расчётом коэффициента расхождения Тейла. Математическая модель была реализована в виде компьютерной программы «SCRP» (номер регистрации в Федеральной службе интеллектуальной собственности: 2020660270), которая позволяет вычислять кинетические параметры репродукции энтеровирусов в одиночном цикле, в частности – среднюю скорость дезинтеграции капсида с высвобождением РНК, расчётный момент времени начала явного роста инфекционной активности, среднюю скорость инкапсидации РНК и ряд других параметров. Пользовательский интерфейс программы обеспечивает наглядное представление результатов моделирования как в табличной, так и в графической форме.

Идентификация общего дезинтегрирующего рецептора для эховирусов и создание программного обеспечения для математического моделирования изменения инфекционной активности эховирусов в одиночном цикле репродукции позволили перейти к следующему этапу диссертационной работы – сравнительному анализу особенностей кинетики дезинтеграции капсида с

высвобождением РНК и инкапсидации РНК эховирусов с различной рецепторной специфичностью.

В культуре клеток RD была выявлена более высокая пропускная способность пути входа в клетки и более высокая скорость инкапсидации РНК у DAF-зависимого клона эховируса 11, использовавшего связывающий рецептор DAF и дезинтегрирующий рецептор hFcRn, по сравнению с клоном, использовавшим только рецептор hFcRn в качестве связывающего и дезинтегрирующего. В культуре клеток Л-41 КД/84 была показана более высокая пропускная способность пути входа в клетки и более высокая скорость инкапсидации у клона эховируса 11, не взаимодействовавшего с рецептором DAF. Полученные результаты позволили обосновать кинетические механизмы позитивной селекции субтиповых Daf⁺ вариантов эховирусов в культуре клеток RD и позитивной селекции субтиповых Daf⁻ вариантов эховирусов в культуре клеток Л-41 КД/84.

Результаты экспериментов в культуре клеток RD с известным ингибитором дезинтеграции капсида эховирусов 7 и 12 типов – роданином – подтвердили адекватность используемой экспериментальной системы и математической модели для исследования влияния химических (фармакологических) ингибиторов на скорость дезинтеграции капсида с высвобождением эховирусов. Была показана различная выраженность ингибирующего эффекта роданина в зависимости от пути входа субтиповых вариантов эховируса 11 в клетки: более выраженное ингибирующее действие наблюдалось у DAF-зависимого клона эховируса 11, использующего связывающий рецептор DAF и дезинтегрирующий рецептор hFcRn, по сравнению с клоном, использующим hFcRn в качестве связывающего и дезинтегрирующего рецептора.

Обнаружена одинаковая направленность эффектов нистатина, нарушающего функции липидных плотов плазматических мембран, в отношении субтиповых вариантов эховируса 11 с различным сродством к рецептору DAF: снижение скорости дезинтеграции капсида с высвобождением РНК, задержка начала инкапсидации и снижение скорости инкапсидации вирусной РНК,

снижение продуктивности инфекции. Следовательно, общий механизм ингибирующего эффекта нистатина на репродукцию субтиповых вариантов эховируса 11 с различной рецепторной специфичностью не был связан с блокированием процесса дезинтеграции, но проявлялся в задержке начала инкапсидации вирусной РНК и в снижении продуктивности инфекции.

Исследование влияния нокодазола, подавляющего полимеризацию микротрубочек и связанный с ними везикулярный транспорт, на кинетику дезинтеграции DAF-зависимого варианта эховируса 11 выявило снижение скорости дезинтеграции капсида с высвобождением вирусной РНК, не сопровождавшееся снижением начального уровня связывания вируса с клетками или снижением максимально достигнутого уровня инфекционной активности. У варианта эховируса 11, использовавшего только hFcRn в качестве связывающего и дезинтегрирующего рецептора, в присутствии нокодазола наблюдалось снижение начального уровня связывания вируса с клетками, снижение скорости дезинтеграции капсида с высвобождением РНК и скорости инкапсидации вирусной РНК, а также снижение максимального уровня инфекционной активности, достигнутого за период наблюдения. Полученные нами результаты позволили подтвердить наблюдения других авторов [106], выполненные методом иммунофлуоресцентной микроскопии, и представить количественные данные о снижении скорости дезинтеграции капсида с высвобождением РНК у DAF-зависимого варианта эховируса 11 в присутствии нокодазола. Также были выявлены различия эффектов нокодазола на репродукцию субтиповых вариантов E11 в культуре клеток RD, связанные с различной чувствительностью путей входа эховирусов к блокированию внутриклеточного транспорта везикул, зависимо от микротрубочек.

Таким образом, использование клонированных субтиповых вариантов эховируса 11 с различной рецепторной специфичностью в экспериментах с одиночным циклом репродукции и варьируемыми условиями (разные культуры клеток, воздействие химических ингибиторов репродукции), позволило выяснить

количественные различия пропускной способности путей входа эховирусов в клетки, инициируемых рецепторами DAF и hFcRn.

Количественные особенности кинетики дезинтеграции капсида с высвобождением РНК эховирусов с известной рецепторной специфичностью позволяют использовать эховирусы в качестве молекулярных зондов при оценке пропускной способности отдельных путей эндоцитоза в конкретных культурах клеток, что может иметь важное значение при разработке онколитических эховирусов. В частности, при меланоммах избирательное терапевтическое действие препарата Rigvir, созданного на основе адаптированного эховируса 7, может быть связано с гиперэкспрессией рецептора DAF клетками меланомы человека [18, 93].

Данные, полученные с использованием эховирусов в качестве «молекулярных зондов» при изучении отдельных путей эндоцитоза в культурах клеток, могут способствовать разработке более эффективных невирусных векторов для доставки генов (интерферирующих РНК, антисмысловых олигонуклеотидов и других) в клетки человека. Так как рецептор hFcRn способен транспортировать свои лиганды (IgG и альбумин) внутри клеток по рециркуляционному пути, уклоняясь от деградиационного пути, ведущего в лизосомы, то дальнейшее изучение особенностей внутриклеточной маршрутизации hFcRn может открыть возможности для его применения при создании более эффективных невирусных векторов для доставки генов в клетки человека.

Таким образом, представленные в диссертационной работе результаты имеют важное теоретическое и практическое значение, так как способствуют более глубокому пониманию молекулярных механизмов патогенеза эховирусных инфекций, связанных с функцией дезинтегрирующего рецептора hFcRn, а также открывают новые возможности для совершенствования терапевтических средств на основе эховирусных векторов и невирусных векторов для доставки генов в клетки человека.

ВЫВОДЫ

1. Клеточный рецептор hFcRn является общим рецептором для эховирусов и коксакивируса А9, 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*⁻ варианта echovirus 11.

6. Ингибирующее действие нокодазола на репродукцию *daf*⁺ варианта echovirus 11 проявлялось в выраженном снижении скорости высвобождения геномной РНК вирусов. При репродукции *daf*⁻ 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Akpınar F., Timm A., Yin J. High-throughput single-cell kinetics of virus infections in the presence of defective interfering particles // *J. Virol.* - 2015. – Vol. 90, N 3. – P. 1599-1561.
2. Amy E. Hulme, Z Kelley, Eneziogochukwu A. Okocha, Thomas J. Hope. Identification of Capsid Mutations That Alter the Rate of HIV-1 Uncoating in Infected Cells // *J. Virol.* - 2015. - Vol. 89, N 1. – P. 643–651.
3. Arola A., Santti J., Ruuskanen O., et al. Identification of enteroviruses in clinical specimens by competitive PCR followed by genetic typing using sequence analysis // *J. Clin. Microbiol.* – 1996. – Vol. 34, N 2. – P. 313-318.
4. Baggen J., Thibaut H.J., Strating J.R.P.M., et al. The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2018. – Vol. 16, N 6. – P. 368-381.
5. Banerjee S., Aponte-Diaz D., Yeager C., et al. Hijacking of multiple phospholipid biosynthetic pathways and induction of membrane biogenesis by a picornaviral 3CD protein // *PLoS Pathog.* – 2018. Vol. 14, N 5. e1007086.
6. Bayer N., Schober D., Prchla E., et al. Effect of bafilomycin A1 and nocodazole on endocytic transport in HeLa cells: implications for viral uncoating and infection // *J. Virol.* – 1998. – Vol. 72, N.12. – P.9645–9655.
7. Bergelson J.M., Coyne C.B. Picornavirus entry // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2013. – Vol. 790. – P. 24-41.
8. Carson S.D., Chapman N.M., Hafenstein S., et al. Variations of coxsackievirus B3 capsid primary structure, ligands, and stability are selected for in a coxsackievirus and adenovirus receptor-limited environment // *J. Virol.* – 2011. – Vol. 85, N 7. – P. 3306-3314.
9. Carson S.D., Cole A.J. Albumin enhances the rate at which coxsackievirus B3 strain 28 converts to A-particles // *J. Virol.* – 2020. Vol. 94, N 6. e01962-19.

10. Chevaliez S., Balanant J., Maillard P., et al. Role of class I human leukocyte antigen molecules in early steps of echovirus infection of rhabdomyosarcoma cells // *J. Virol.* – 2008. – Vol. 381, N 2. V P. 203– 214.
11. Chow M., Newman J.F., Filman D., et al. Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance // *Nature.* – 1987. – Vol. 327, N 6122. – P. 482-486.
12. Dahllund L., Nissinen L., Pulli T., et al. The genome of echovirus 11 // *Virus Res.* – 1995. – Vol. 35, N 2. – P.215-222.
13. Danthi P., Tosteson M., Li Q.H., et al. Genome delivery and ion channel properties are altered in VP4 mutants of poliovirus // *J. Virol.* – 2003. – Vol. 77, N 9. – P. 5266-5274.
14. Davis M.P., Bottley G., Beales L.P., et al. Recombinant VP4 of human rhinovirus induces permeability in model membranes // *J. Virol.* – 2008. – Vol. 82, N 8. – P. 4169-4174.
15. De Palma A.M., Vliegen I., De Clercq E., Neyts J. Selective inhibitors of picornavirus replication // *Med. Res. Rev.* – 2008. – Vol. 28, N 6. – P. 823-884.
16. Delorme-Axford E., Sadovsky Y., Coyne C.B. Lipid raft- and SRC family kinase-dependent entry of coxsackievirus B into human placental trophoblasts // *J. Virol.* – 2013. – Vol. 87, N 15. – P. 8569-8581.
17. Doermann A.H. The intracellular growth of bacteriophages. I. Liberation of intracellular bacteriophage T4 by premature lysis with another phage or with cyanide // *J. Gen. Physiol.* – 1952. – Vol. 35, N 4. – P. 645-656.
18. Donina S., Strele I., Proboka G., et al. Adapted ECHO-7 virus Rigvir immunotherapy (oncolytic virotherapy) prolongs survival in melanoma patients after surgical excision of the tumour in a retrospective study // *Melanoma Res.* – 2015. – Vol. 25, N 5. – P. 421-426.
19. Dos Santos A.G., Marques J.T., Carreira A.C., et al. The molecular mechanism of Nystatin action is dependent on the membrane biophysical properties and lipid composition // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2017. – Vol. 19, N 44. – P. 30078-30088.

20. Dho S.H., Lim J.C., Kim L.K. Beyond the role of CD55 as a complement component // *Immune Netw.* – 2018. – Vol. 18, N 1. – P. 1-13.
21. Egger D., Teterina N., Ehrenfeld E., Bienz K. / Formation of the poliovirus replication complex requires coupled viral translation, vesicle production, and viral RNA synthesis. // *J. Virol.* – 2000. – Vol. 74, N 14. – P. 6570-6580.
22. Eggers H.J. Selective inhibition of uncoating of echovirus 12 by rhodanine. A study on early virus-cell interactions // *J. Virol.* – 1977. – Vol. 78, N 1. – P. 241-252.
23. Eggers H.J., Koch M.A., Furst A., et al. Rhodanine: a selective inhibitor of the multiplication of echovirus 12 // *Science.* – 1970. – Vol. 167, N 3916. – P. 294-297.
24. Elkin S.R., Lakoduk A.M., Schmid S.L. Endocytic pathways and endosomal trafficking: a primer // *Wien Med. Wochenschr.* – 2016. – Vol. 166, N 7-8. – P. 196-204.
25. Ellis E.L., Delbrück M. The growth of bacteriophage // *J. Gen. Physiol.* – 1939. – Vol. 22, N 3. – P. 365-384.
26. El-Sayed A., Harashima H. Endocytosis of gene delivery vectors: from clathrin-dependent to lipid raft-mediated endocytosis // *Mol. Ther.* – 2013. – Vol. 21, N 6. P. – 1118-30.
27. Eyster C.A., Higginson J.D., Huebner R., et al. Discovery of new cargo proteins that enter cells through clathrin-independent endocytosis // *Traffic.* – 2009. – Vol. 10, N 5. – P. 590–599.
28. Fay MP, Malinovsky Y. Confidence intervals of the Mann-Whitney parameter that are compatible with the Wilcoxon-Mann-Whitney test // *Stat. Med.* – 2018. – Vol. 37, N 27. – P. 3991-4006.
29. Flint S.J., Racaniello V.R., Rall G.F., et al. Principles of Virology. (4th edition). Vol. I. Molecular Biology. Chapter 5. Attachment and entry. Washington, DC: ASM Press, 2015. – P.122-154.
30. Flint S.J., Racaniello V.R., Rall G.F., et al. Principles of Virology. (4th edition). Vol. I. Molecular Biology. Chapter 2. The infectious cycle. Washington, DC: ASM Press, 2015. – P.24-52.

31. Gazina E.V., Mackenzie J.M., Gorrell R.J. Differential requirements for COPI coats in formation of replication complexes among three genera of *Picornaviridae* // *J. Virol.* – 2002. – Vol.76, N.21. – P. 11113–11122.
32. Genus: Enterovirus – *Picornaviridae* – *Picornavirales* - International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). – URL: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/picornavirales/w/picornaviridae/681/genus-enterovirus (дата обращения 10.10.2020).
33. Gharbi J., Hiar R. el, M'hadheb M.B., et al. Nucleotide sequences of IRES domains IV and V of natural ECHO virus type 11 isolates with different replicative capacity phenotypes // *Virus Genes.* – 2006. – Vol. 32, N 3. – P. 269-276.
34. Goodfellow I.G., Powell R.M., Ward T., et al. Echovirus infection of rhabdomyosarcoma cells is inhibited by antiserum to the complement control protein CD59 // *J. Gen. Virol.* – 2000. – Vol. 81, Pt 5. – P. 1393-1401.
35. Goodfellow I.G., Sioofy A.B., Powell R.M., et al. Echoviruses bind heparan sulfate at the cell surface // *J. Virol.* – 2001. – Vol. 75, N 10. – P. 4918-4921.
36. Grant B.D., Donaldson J.G. Pathways and mechanisms of endocytic recycling // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2009. – Vol. 10, N 9. – P. 597–608.
37. Gromeier M., Wetz K. Kinetics of poliovirus uncoating in HeLa cells in a nonacidic environment // *J. Virol.* – 1990. – Vol. 64, N 8. – P. 3590-3597.
38. Gropelli E., Levy H.C., Sun E., et al. Picornavirus RNA is protected from cleavage by ribonucleases during virion uncoating and transfer across cellular and model membranes // *PLoS Pathog.* – 2017. – Vol. 13, N 2. e1006197.
39. Grove J, Marsh M. The cell biology of receptor-mediated virus entry // *J. Cell Biol.* – 2011. – Vol. 195, N 7. – P. 1071-1082.
40. Helenius A. Virus entry and uncoating. Chapter 4 / In: Knipe D.M., Howley P.M. (editors). *Fields virology.* (6th edition). Vol. 1. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. – 2013. – P. 87–104.
41. Helenius A. Virus entry: looking back and moving forward // *J. Mol. Biol.* – 2018. – Vol. 430, N 13. – P. 1853-1862.

42. Holland J.J. Irreversible eclipse of poliovirus by HeLa cells // *J. Virol.* – 1962. – Vol. 16. – P. 163-176.
43. Holland J.J., McLaren L.C. The mammalian cell-virus relationship. II. Adsorption, reception, and eclipse of poliovirus by HeLa cells // *J. Exp. Med.* – 1959. – Vol. 109, N 5. – P. 487-504.
44. Howes M.T., Kirkham M., Riches J., et al. Clathrin-independent carriers form a high capacity endocytic sorting system at the leading edge of migrating cells. // *J. Cell Biol.* – 2010. – Vol. 190, N 4. – P. 675–691.
45. Husson-van Vliet J., Roussel Ph. Pipetting errors in viral titrations: a useful approach // *J. Virol. Meth.* – 1988. – Vol. 22. – P. 183–190.
46. Imamura J., Suzuki Y., Gonda K., et al. Single particle tracking confirms that multivalent Tat protein transduction domain-induced heparan sulfate proteoglycan cross-linkage activates Rac1 for internalization // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286, N 12. – P. 10581–10592.
47. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). – URL: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (дата обращения 10.10.2020).
48. Israelsson S., Gullberg M., Jonsson N., et al. Studies of echovirus 5 interactions with the cell surface: heparan sulfate mediates attachment to the host cell // *Virus Res.* – 2010. – Vol. 151, N 2. – P. 170-176.
49. Jokhadar S.Z., Bozic B., Kristanc L., et al. Osmotic Effects induced by pore-forming agent nystatin: from lipid vesicles to the cell // *PLoS ONE* – 2016. – Vol. 11, N 10. e0165098.
50. Jokinen J., White D.J., Salmela M., et al. Molecular mechanism of alpha2beta1 integrin interaction with human echovirus 1 // *EMBO J.* – 2010. – Vol. 29, N 1. – P. 196-208.
51. Jolly C.L., Sattentau Q.J. Attachment Factors // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2013. – Vol. 790. – P. 1-23
52. Kennedy J., Eberhart R.C., Shi Y. *Swarm Intelligence.* – Morgan Kaufmann. – 2001. – 541 pp.

53. Kim C., Bergelson J.M. Echovirus 7 entry into polarized Caco-2 intestinal epithelial cells involves core components of the autophagy machinery // *J. Virol.* – 2014. – Vol. 88, N 1. – P. 434-443.
54. Kim C., Bergelson J.M. Echovirus 7 entry into polarized intestinal epithelial cells requires clathrin and Rab7 // *mBio* – 2012. – Vol. 3, N 2. e00304-11.
55. Kim H.J., Zhong Q., Sheng Z.-H., et al. Beclin-1-interacting autophagy protein Atg14L targets the SNARE-associated protein Snapin to coordinate endocytic trafficking // *J. Cell Sci.* – 2012. – Vol. 125, N 20. – P. 4740–4750.
56. Kingsland, S., Weisstein, Eric W. Logistic Equation // From MathWorld-A Wolfram Web Resource. Retrieved on 2021-04-08.
57. Kraus W., Zimmermann H., Eggers H.J., et al. Rhodanine resistance and dependence of echovirus 12: a possible consequence of capsid flexibility // *J. Virol.* – 1997. – Vol. 71, N 2. – P. 1697-1702.
58. Krieger S.E., Kim C., Zhang L., et al. Echovirus 1 entry into polarized Caco-2 cells depends on dynamin, cholesterol, and cellular factors associated with micropinocytosis // *J. Virol.* – 2013. – Vol. 87, N 16. – P. 8884-8895.
59. Leveque N., Norder H., Zreik Y., et al. Echovirus 6 strains derived from a clinical isolate show differences in haemagglutination ability and cell entry pathway // *Virus Res.* – 2007. – Vol. 130, N 1-2. – P. 1-9.
60. Levintow L., Thoren M.M., Darnell J.E. Jr., et al. Effect of p-fluorophenylalanine and puromycin on the replication of poliovirus // *J. Virol.* – 1962. – Vol. 16. – P. 220-229.
61. Lim K., Lang T., Lam V., et al. Model-based design of growth-attenuated viruses // *PLoS Comput. Biol.* – 2006. – Vol. 2, N 9. e116.
62. Limpens R.W., van der Schaar H.M., Kumar D., et al. The transformation of enterovirus replication structures: a three-dimensional study of single- and double-membrane compartments // *mBio* – 2011. – Vol. 2, N 5. e00166-11.
63. Pedrazzi M., Nash B., Meucci O., et al. Molecular features contributing to virus-independent intracellular localization and dynamic behavior of the herpesvirus transport protein US9 // *PLoS One* – 2014. – Vol. 9, N 8. e104634.

64. Marchant D., Sall A., Si X., et al. ERK MAP kinase-activated Arf6 trafficking directs coxsackievirus type B3 into an unproductive compartment during virus host-cell entry // *J. Gen. Virol.* – 2009 – Vol. 90, Pt 4. – P. 854-862.
65. Marjomaki V., Pietiainen V., Matilainen H., et al. Internalization of Echovirus 1 in caveolae // *J. Virol.* – 2002. – Vol. 76, N 4. – P. 1856–1865.
66. Marjomaki V., Turkki P., Huttunen M. Infectious entry pathway of Enterovirus B species // *Viruses.* – 2015 – Vol. 7. – P. 6387–6399.
67. Mbida A.D., Gaudin O.G., Sabido O., et al. Monoclonal antibody specific for the cellular receptor of echoviruses // *Intervirology.* – 1992. – Vol. 33, N 1. – P. 17-22.
68. Mbida A.D., Pozzetto B., Gaudin O.G., et al. A 44,000 glycoprotein is involved in the attachment of Echovirus-11 onto susceptible cells // *J. Virol.* – 1992. – Vol. 189, N 1. – P. 350-353.
69. McLeish N.J., Williams C.H., Kaloudas D., et al. Symmetry-related clustering of positive charges is a common mechanism for heparan sulfate binding in enteroviruses // *J. Virol.* – 2012. – Vol. 86, N 20. – P. 11163–11170.
70. Mehand MS, Al-Shorbaji F, Millett P, et al. The WHO R&D Blueprint: 2018 review of emerging infectious diseases requiring urgent research and development efforts // *Antiviral Res.* – 2018. – Vol. 159. – P. 63-67.
71. Morosky S., Wells A.I., Lemon K., et al. The neonatal Fc receptor is a pan-echovirus receptor // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2019. – Vol. 116, N 9. – P. 3758-3763.
72. Nelsen-Salz B., Eggers H.J., Zimmermann H. Integrin alpha(v)beta3 (vitronectin receptor) is a candidate receptor for the virulent echovirus 9 strain Barty // *J. Gen. Virol.* – 1999. – Vol. 80, Pt 9. – P. 2311-2313.
73. Novoselov A.V., Rezyaykin A.V., Sergeev A.G., et al. A single amino acid substitution controls DAF-dependent phenotype of echovirus 11 in rhabdomyosarcoma cells // *Virus Res.* – 2012. – Vol. 166, N 1-2. – P. 87-96.

74. Palacios G., Casas I., Tenorio A., et al. Molecular identification of enterovirus by analyzing a partial VP1 genomic region with different methods // *J. Clin. Microbiol.* – 2002. – Vol. 40, N 1. – P. 182-192.
75. Payne C.K., Jones S.A., Chen C., et al. Internalization and trafficking of cell surface proteoglycans and proteoglycan-binding ligands // *Traffic* – 2007. – Vol. 8. – P. 389–401.
76. Picornaviridae – Picornavirales - International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). – URL: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/picornavirales/w/picornaviridae (дата обращения 10.10.2020).
77. Pietiainen V., Marjomaki V., Upla P., et al. Echovirus 1 endocytosis into caveosomes requires lipid rafts, dynamin II, and signaling events // *Mol. Biol. Cell* – 2004. – Vol. 15, N 11. – P. 4911-4925.
78. Pike L.J. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function // *J. Lipid Res.* – 2006. – Vol. 47, N 7. – P. 1597-1598.
79. Pike L.J. The challenge of lipid rafts // *J. Lipid Res.* – 2009. – Vol. 50. – Suppl: S323-328.
80. Powell R.M, Ward T., Evans D.J., et al. Interaction between echovirus 7 and its receptor, decay- accelerating factor (CD55): evidence for a secondary cellular factor in A-particle formation // *J. Virol.* – 1997. – Vol. 71, N 12. – P. 9306–9312.
81. Pyzik M., Rath T., Lencer W.I., et al. FcRn: The architect behind the immune and nonimmune functions of IgG and albumin // *J. Immunol.* – 2015. – Vol. 194, N 10. – P. 4595-4603.
82. Racaniello V.R. Picornaviridae: the viruses and their replication. // In: Knipe D.M., Howley P.M. (editors). *Fields virology*. (6th edition). Chapter 16. – Vol. 1. – Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. – 2013. – P. 453–489.
83. Renois F., Hong S.S., Le Naour R., et al. Development of a recombinant CHO cell model for the investigation of CAR and DAF role during early steps of echovirus 6 infection // *Virus Res.* – 2011. – Vol. 158, N 1-2. – P. 46-54.

84. Rezaikin A.V., Novoselov A.V., Sergeev A.G., et al. Two clusters of mutations map distinct receptor-binding sites of echovirus 11 for the decay-accelerating factor (CD55) and for canyon-binding receptors // *Virus Res.* – 2009. – Vol. 145, N 1. P. – 74-79.
85. Richards A.L., Soares-Martins J.A., Riddell G.T., et al. Generation of unique poliovirus RNA replication organelles // *mBio.* – 2014. – Vol. 5, N 2. e00833-13.
86. Rintanen N., Karjalainen M., Alanko J., et al. Calpains promote integrin turnover in nonrecycling integrin pathway // *Mol. Biol. Cell.* – 2012. – Vol. 23, N 3. – P. 448–463.
87. RSCB PDB Homepage. – URL: <https://www.rcsb.org/> (дата обращения 25.10.2020).
88. Ruokolainen V., Domanska A., Laajala M., et al. Extracellular albumin and endosomal ions prime enterovirus particles for uncoating that can be prevented by fatty acid saturation // *J. Virol.* – 2019. – Vol. 93. – e00599-19.
89. Sand K.M., Bern M., Nilsen J., et al. Unraveling the interaction between FcRn and albumin: opportunities for design of albumin-based therapeutics // *Front. Immunol.* – 2015. – Vol. 5. – Article 682.
90. Sandvig K., Kavaliauskiene S., Skotland T. Clathrin-independent endocytosis: an increasing degree of complexity // *Histochem. Cell Biol.* – 2018. – Vol. 150, N 2. – P.107-118.
91. Schulte M.B., Andino R. Single-cell analysis uncovers extensive biological noise in poliovirus replication // *J. Virol.* – 2014. – Vol. 88, N 11. – P. 6205-6212.
92. Sergeev A.G., Novoselov A.V., Bubenschikov A.V., et al. Genetic analysis of echovirus 11 variability in adsorption to human erythrocytes // *Arch. Virol.* – 1994. – Vol. 134, N 1–2. – P. 129–139.
93. Shafren D.R., Au G.G., Nguyen T., et al. Systemic therapy of malignant human melanoma tumors by a common cold-producing enterovirus, coxsackievirus A21 // *Clin. Cancer Res.* – 2004. – Vol. 10. – P. 53-60.

94. Shafren D.R., Dorahy D.J., Ingham R.A., et al. Coxsackievirus A21 binds to decay-accelerating factor but requires intercellular adhesion molecule 1 for cell entry // *J. Virol.* – 1997. – Vol. 71, N 6. – P. 4736–4743.
95. Shi Y., Ruan H. Toward a membrane-centric biology // *Front. Immunol.* – 2020. – Vol. 11. – Article 1909.
96. Shieh J.T., Bergelson J.M. Interaction with decay-accelerating factor facilitates coxsackievirus B infection of polarized epithelial cells // *J. Virol.* – 2002. – Vol. 76, N 18. – P. 9474-9480.
97. Siljamaki E., Rintanen N., Kirsi M., et al. Dependence of collagen and Echovirus 1 trafficking along the novel $\alpha 2\beta 1$ integrin internalization pathway // *PLoS One* – 2013. – Vol. 8, N 2. e55465.
98. Simmonds P., Gorbalenya A.E., Harvala H., et al. Recommendations for the nomenclature of enteroviruses and rhinoviruses // *Arch. Virol.* – 2020. – Vol. 165, N 3. – P. 793-797.
99. Simons K., Ikonen E. Functional rafts in cell membranes // *Nature.* – 1997. – Vol. 387, N 6633. – P. 569-572.
100. Sin J., Mangale V., Thienphrapa W., et al. Recent progress in understanding coxsackievirus replication, dissemination, and pathogenesis // *J. Virol.* – 2015. – Vol. 484. – P. 288-304.
101. Sobo K., Rubbia-Brandt L., Brown T.D.K., et al. Decay-accelerating factor binding determines the entry route of echovirus 11 in polarized epithelial cells // *J. Virol.* – 2011. – Vol. 85, N 23. – P. 12376-12386.
102. Sockolosky J.T., Szoka F.C. The neonatal Fc receptor, FcRn, as a target for drug delivery and therapy // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2015. – Vol. 91. – P. 109-124.
103. Soonsawad P., Paavolainen L., Upla P., et al. Permeability changes of integrin -containing multivesicular structures triggered by picornavirus entry // *PLoS ONE* – 2014. – Vol. 9, N 10. e108 948.
104. Staring J., von Castelmur E., Blomen V.A., et al. PLA2G16 represents a switch between entry and clearance of *Picornaviridae* // *Nature.* – 2017. – Vol. 541, N 7637. – P. 412-416.

105. Storrie B., Yang W. Dynamics of the interphase mammalian Golgi complex as revealed through drugs producing reversible Golgi disassembly // *Biochim. Biophys. Acta* – 1998. – Vol. 1404, N 1-2. – P. 127-137.
106. Stuart A.D., Eustace H.E., McKee T.A., et al. A novel cell entry pathway for a DAF-using human enterovirus is dependent on lipid rafts // *J. Virol.* – 2002. – Vol. 76, N 18. – P. 9307–9322.
107. Stuart A.D., McKee T.A., Williams P.A., et al. Determination of the structure of a decay accelerating factor-binding clinical isolate of echovirus 11 allows mapping of mutants with altered receptor requirements for infection // *J. Virol.* – 2002. – Vol. 76, N 15. – P. 7694-7704.
108. Tardieu M., Epstein R.L., Weiner H.L. Interaction of viruses with cell surface receptors // *Int. Rev. Cytol.* – 1982. – Vol. 80. – P. 27-61.
109. Timm A., Yin J. Kinetics of virus production from single cells // *J. Virol.* – 2012. – Vol. 424, N 1. – P. 11–17.
110. Timm C., Gupta A., Yin J. Robust kinetics of RNA virus: transcription rates are set by genome levels // *Biotechnol. Bioeng.* – 2015. – Vol. 112, N 8. – P. 1655–1662.
111. Tomas M., Martinez-Alonso E., Ballesta J., et al. Regulation of ER-Golgi intermediate compartment tubulation and mobility by COPI coats, motor proteins and microtubules // *Traffic* – 2010. – Vol. 11, N 5. – P. 616-625.
112. Triantafilou K., Fradelizi D., Wilson K., et al. GRP78, a coreceptor for coxsackievirus A9, interacts with major histocompatibility complex class I molecules which mediate virus internalization // *J. Virol.* – 2002. – Vol. 76, N 2. – P. 633-643.
113. UniProt homepage. – URL: <https://www.uniprot.org/> (дата обращения 31.10.2020)
114. Vandesande H., Laajala M., Kantoluoto T., et al. Early entry events in echovirus 30 infection // *J. Virol.* – 2020. – Vol. 94, N 13. e00592-20.
115. Vasquez R.J., Howell B., Yvon A.M., et al. Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability in vivo and in vitro // *Mol. Biol. Cell.* – 1997. – Vol. 8, N 6. – P. 973–985.

116. Ward T., Powell R.M., Chaudhry Y., et al. Fatty acid-depleted albumin induces the formation of echovirus A particles // *J. Virol.* – 2000. – Vol. 74, N 7. – P. 3410–3412.
117. Ward T., Powell R.M., Evans D.J., et al. Serum albumin inhibits echovirus 7 uncoating // *J. Gen. Virol.* – 1999. – Vol. 80, Pt2. – P. 283-290.
118. Ward T., Powell R.M., Pipkin P.A., et al. Role for beta2-microglobulin in echovirus infection of rhabdomyosarcoma cells // *J. Virol.* – 1998. – Vol. 72, N 7. – P. 5360–5365.
119. Wulff N.H., Tzatzaris M., Young P.J. Monte Carlo simulation of the Spearman-Kaerber TCID50 // *J. Clin. Bioinforma.* – 2012. – Vol. 2, N 1. – P. 1-5.
120. Xing L., Huhtala M., Pietiainen V., et al. Structural and functional analysis of integrin alpha2I domain interaction with echovirus 1 // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, N 12. – P. 11632–11638.
121. Xu Z, Schaedel L, Portran D, et al. Microtubules acquire resistance from mechanical breakage through intraluminal acetylation // *Science.* – 2017. – Vol. 356, N6335. – P. 328-332.
122. Yamauchi Y., Greber U.F. Principles of virus uncoating: cues and the snooker ball // *Traffic.* – 2016. – Vol. 17, N 6. – P. 569-592.
123. Yin J, Redovich J. Kinetic modeling of virus growth in cells // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2018. – Vol. 82. e00066-17.
124. Ylipaasto P., Eskelinen M., Salmela K., et al. Vitronectin receptors, alpha v integrins, are recognized by several non-RGD-containing echoviruses in a continuous laboratory cell line and also in primary human Langerhans' islets and endothelial cells // *J. Gen. Virol.* – 2010. – Vol. 91, N 1. – P. 155-165.
125. You L., Yin J. Simulating the growth of viruses. // *Pac. Symp. Biocomput.* – 2001. – P. 532-543.
126. Zell R., Delwart E., Gorbalenya A.E., et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae // *J. Gen. Virol.* – 2017. – Vol. 98. – P. 2421–2422.

127. Zhao X., Zhang G., Liu S., et al. Human neonatal Fc receptor is the cellular uncoating receptor for Enterovirus B // *Cell* – 2019. – Vol. 177, N 6. – P. 1553–1565. e16.
128. Zhu X., Peng J., Raychowdhury R., et al. The heavy chain of neonatal Fc receptor for IgG is sequestered in endoplasmic reticulum by forming oligomers in the absence of beta2-microglobulin association // *Biochem. J.* – 2002. – Vol. 367, N 3. – P. 703-714.
129. Биргер О.М. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / Под ред. М.О. Биргера. – М.: Медицина, 1982.– 464 с.
130. Ботвиньева В.В., Намазова-Баранова Л.С., Гордеева О.Б., Ботвиньев О. К., Коноплева Т. Н. Современные возможности диагностики, профилактики и лечения энтеровирусной инфекции Коксаки у детей // *Педиатрическая фармакология.* – 2012. – Т. 9, № 3. – С. 40-45.
131. Звонарев С.В. Основы математического моделирования: учебное пособие / С. В. Звонарев.— Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2019. — 112 с.SBN 978-5-7996-2576-4
132. Канаева О.И. Энтеровирусная инфекция: многообразие возбудителей и клинических форм // *Инфекция и иммунитет.* – 2014. – Vol. 4, N 1. –P. 27-36.
133. Лисицын, Е.Н. Руководство по социальной гигиене и организации здравоохранения: в 2 томах. Т1. / Ю.П. Лисицын, Е.Н. Шиган, И.С. Случанко и др.; под ред. Ю.П. Лисицына. – М.: Медицина, 1987. – 432 с.
134. Новоселов А.В. Генетический анализ гемагглютинирующих свойств энтеровирусов (на модели вируса ЕСНО 11): автореферат дисс. ... канд. мед. наук: 03.00.06: защищена 10.06.1994 / Новоселов Алексей Владимирович; Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН – М., 1994. – 23 с.
135. Резайкин А.В., В.И. Чалапа, П.С. Усольцева, Н.Н. Сбитнева. Энтеровирусная инфекция в Уральском федеральном округе и Западной Сибири в 2019 году // *Информационный бюллетень за 2019 год.* – Екатеринбург, 2020. С.37.

136. 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.

137. Ройзман Б. Размножение вирусов: общие представления (Глава 5) // Вирусология: в 3-х т. / Т. 1: Пер с англ.; под ред. Б.Филдса, Д. Найпа. – М.: Мир, 1989. – 492 с.

138. Усольцева П.С., Новоселов А.В., Резайкин А.В. Неонатальный рецептор для Fc фрагмента иммуноглобулина G человека (FcRn) – общий депротенинизирующий рецептор для вирусов ЕСНО. // 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», 10-12 апреля 2019 г. – Екатеринбург, 2019. – С.144-148.

139. Усольцева П.С., Новоселов А.В., Резайкин А.В., и др. Механизмы интернализации энтеровирусов вида В // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2018. – Т. 15, № 3. – С. 455-469.

140. Усольцева П.С., Сергеев А.Г. Влияние неионных детергентов на определение инфекционной активности эховируса методом конечных разведений. // Сб. «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"». – Екатеринбург. – 2018. – С. 168-173.

141. Фадеев Ф.А. Изменчивость рецепторной специфичности вируса ЕСНО11: автореферат дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.06: защищена 27.10.2008 / Фадеев Федор Алексеевич; Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН. – М., 2008. – 24 с.

142. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство. – М. : Лаборатория знаний, пер. 6-го англ. изд., 4-е изд., испр. и доп., 2018. – 760 с.

143. Чалапа В.И., Резайкин А.В., Усольцева П.С., и др. Энтеровирусная инфекция в Уральском федеральном округе и Западной Сибири: результаты эпидемиологического наблюдения с применением молекулярногенетических методов // Медицинский алфавит. – 2020. – № 18. – С. 38-43.

1	2	3	4	5	6	7	8
CVB5 3122	24	25,0±0,0	25,0±0,0	25,0±0,0	25,0±0,0	25,0±0,0	25,0±0,0
	48	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
	72	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
	96	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
	120	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0

Примечание к таблице:

^a Средний процент ЦПЭ по 8 репликам в 2 повторах эксперимента ± стандартная ошибка средней величины;

* Различия средних величин ЦПЭ в ячейке таблицы и ЦПЭ при концентрации поликлональных антител 0,0 мкг/мл статистически достоверны (U-тест Манна-Уитни).

Приложение 2. Протективный эффект альбумина HSA-GF в клетках RD, инфицированных различными энтеровирусами вида В

Тип клон/штамм	Время после заражения, ч	Концентрация альбумина HSA-GF, %					
		0,0	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0
E11 431-1	24	12,5±4,7	12,5±4,7	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	48	100,0±0,0	100,0±0,0	81,3±4,1*	46,9±3,1*	12,5±4,7*	0,0±0,0*
	72	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	96,9±3,1	81,3±4,1*	0,0±0,0*
	96	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	50,0±0,0*
	120	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	90,6±4,6
E11 431-6	24	18,8±4,1	18,8±4,1	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	48	100,0±0,0	81,3±4,1*	40,6±4,6*	40,6±4,6*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	72	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	65,6±4,6*	59,4±4,6*	0,0±0,0*
	96	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	81,3±4,1*	6,3±4,1*
	120	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	12,5±4,7*
E3 206	24	40,6±4,6	12,5±4,7*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	48	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	37,5±4,7*	6,3±4,1*	0,0±0,0*
	72	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	43,8±4,1*	0,0±0,0*
	96	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	90,6±4,6	12,5±4,7*
	120	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	62,5±4,7*
E9 8100	24	18,8±4,1	6,3±4,1	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	48	93,8±4,1	18,8±4,1*	12,5±4,7*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	72	100,0±0,0	100,0±0,0	43,8±4,1*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	96	100,0±0,0	100,0±0,0	81,3±4,1*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	120	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	6,3±4,1*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
CVA9 3000	24	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	48	37,5±4,7	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	72	100,0±0,0	43,8±4,1*	12,5±4,7*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	96	100,0±0,0	100,0±0,0	65,6±4,6*	31,3±4,1*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	120	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	65,6±4,6*	9,4±4,6*
CVB5 3122	24	12,5±4,7	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	48	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	87,5±4,7
	72	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
	96	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
	120	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0

Примечание к таблице:

^a Средний процент ЦПЭ по 8 репликам в 2 повторах эксперимента ± стандартная ошибка средней величины;

* Различия средних величин ЦПЭ в ячейке таблицы и ЦПЭ при 0% HSA-GF статистически достоверны (U-тест Манна–Уитни).