

*На правах рукописи*

**Соловаров Иннокентий Сергеевич**

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭКСТРАКТОВ РАСТЕНИЙ И ДНК-АПТАМЕРОВ  
В КАЧЕСТВЕ ИСТОЧНИКОВ НОВЫХ ПРЕПАРАТОВ,  
ОБЛАДАЮЩИХ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТЬЮ  
В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА**

1.5.10 – вирусология

Автореферат  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Кольцово – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ).

**Научный руководитель:** Хаснатинов Максим Анатольевич, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»

**Официальные оппоненты:** Пахарукова Мария Юрьевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, ИО руководителя коллектива лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Алексеев Александр Юрьевич, кандидат биологических наук, руководитель лаборатории экспериментальной биологии патогенных микроорганизмов, Научно-исследовательский институт вирусологии, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»

**Ведущая организация:** ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора

Защита состоится «29» марта 2024 г. в 11-30 часов на заседании диссертационного совета 64.1.001.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, тел. (383) 336-60-10.

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

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г.

И.о. учёного секретаря  
диссертационного совета  
доктор биологических наук, доцент

Т.Н. Ильичева

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность избранной темы.** Клещевой энцефалит (КЭ) – это инфекционное заболевание, вызываемое вирусом клещевого энцефалита (ВКЭ). Заболевание чаще всего проявляется как менингит, энцефалит или менингоэнцефалит. Более 13 000 клинических случаев КЭ отмечается по всей Европе и Азии ежегодно, причем количество случаев КЭ в эндемичных регионах Европы резко возросло в последние десятилетия. Произошло расширение зон риска заболевания, а также обнаружены новые очаги [Suss J., 2008]. Таким образом, КЭ остается актуальной проблемой здравоохранения. Несмотря на то, что возбудитель КЭ является нейротропным вирусом, первоначально он реплицируется в дендритных клетках, макрофагах, лимфоидных тканях, селезенке и других органах. Позднее вирус получает доступ к центральной нервной системе, однако полностью механизмы проникновения вируса в мозг остаются не выясненными [Ruzek D. et al., 2010; Dorrbecker B. et al., 2010].

Несмотря на очевидную эпидемическую значимость этого заболевания, до сих пор существует единственный препарат для специфического лечения и профилактики КЭ – донорский иммуноглобулин человека. Несмотря на показанную эффективность препаратов иммуноглобулина, он обладает рядом критических недостатков. В первую очередь это связано с тем, что иммуноглобулины человека выделяют из крови иммунизированных людей, вследствие чего препараты могут вызывать анафилактические реакции и антителозависимое усиление инфекции [Погодина В. В. и др., 2013, 2015; Субботин А. В. и др., 2014]. Кроме того, введение иммуноглобулинов считается эффективным только в первые 1–3 дня от начала заболевания [Борисов В. А. и др., 2002; Лучинина С. В. и др., 2016]. Наряду с этим существует и повышенный риск заражения неопределяемыми патогенами от сыровоточного иммуноглобулина против КЭ [Лучинина С. В. и др., 2016]. Поэтому разработка новых средств надежной и специфической терапии КЭ является актуальнейшей задачей фундаментальной и прикладной науки [Пеньевская Н. А. и др., 2018]. Мы обратили внимание на два перспективных источника новых препаратов против КЭ – ДНК-аптамеры и суммарные экстракты веществ из растительного сырья.

*Экстракты растений.* Комплексные исследования веществ растительного происхождения являются одним из активно развиваемых в последние годы направлений по нахождению и идентификации противовирусных средств. Так, показаны активные свойства цельных экстрактов и очищенных веществ растительного происхождения по ингибированию вирусов *in vitro*: вируса иммунодефицита человека [Lubbe A. et al., 2012; Kudo E. et al., 2013], вируса герпеса [Superti F. et al., 2008], вируса гепатита С [Jain R. K., 1998], а также вирусов гриппа А [Barak V. et al., 2001; Xie Y. et al., 2013] и других. При этом для огромного количества уже идентифицированных компонентов из растительных источников до сих пор не получены данные о биологических свойствах для тех или иных вирусных инфекций, что в свою очередь скрывает огромный потенциал для создания новых противовирусных препаратов.

*ДНК-аптамеры.* В конце XX века разработан метод получения коротких одноцепочечных фрагментов ДНК и РНК, способных к специфичному связыванию различных молекул [Ruckman J. et al., 1998; Bruno J. G. et al., 1999; Jayasena S. D., 1999]. Такие фрагменты получили название ДНК-аптамеров [Dumpis U. et al., 1999; Yang S. S. et al., 2002; Zhang X. et al., 2015]. Позднее исследователями были получены аптамеры, способные к связыванию и ингибированию вирусных агентов [Umehara T. et al., 2004; Chen F. et al., 2009;]. Константы связывания аптамеров с белками сравнимы или выше, чем константы связывания антигенов с антителами, поэтому аптамеры часто называют ДНК-аналогами антител [Nimjee S. M. et al., 2017; Kaur N. et al., 2018]. При этом ДНК-аптамеры могут быть модифицированы введением флуоресцентных меток без изменения аффинных свойств [Wang K. et al., 2013]. Эти свойства аптамеров позволяют создавать на их основе новые специфические препараты для научных исследований, диагностики и терапии вирусных инфекций [James W., 2007]. После проведения отбора аптамеров обычно проводят оценку аффинности полученных последовательностей. Эффективным способом проверки константы диссоциации могут быть

различные методы: гель-шифт в полиакриламидном геле или использование флуоресцентно меченных аптамеров с помощью проточной цитометрии суспензии клеток, экспрессирующих целевые эпитопы [Chen F. et al., 2009]. Для оценки связывания аптамеров к ферменту могут применять методы оценки специфической активности фермента после обработки аптамерами и без таковой [Umehara T. et al., 2004].

В случае аптамеров, получаемых для вирусных молекул-мишеней, часто производится оценка ингибирования биологической активности целевого вируса аптамерами. В исследованиях аптамеров широко используются различные вирусологические методы, такие как определение индекса ингибирования, установление концентрации 50%-го или 90%-го подавления бляшкообразования. Также часто проводят тесты по оценке жизнеспособности зараженных клеток при ко-инкубации с аптамером [Kaur H. et al., 2018], изменению цитотоксического действия на вирус [Muharemagic D. et al., 2014], определению скорости накопления инфекционного вируса при обработке аптамерами зараженной культуры клеток [Jeon S. H. et al., 2004], блокирования аптамерами адсорбции и проникновения вируса в клетки [Chen F. et al., 2009].

**Степень разработанности избранной темы.** В настоящее время ВКЭ является одним из хорошо изученных объектов современной вирусологии. Исследованы механизмы его циркуляции, проникновения в клетки, созревания и распространения [Чунихин С. П. и др., 1985; Злобин В. И. и др., 1996; Борисов В. А. и др., 2002; Злобин В. И., 2005; Леонова Г. Н. и др., 2007; Süß J., 2011; Коренберг Э. И. и др., 2013; Pulkkinen L. I. A. et al., 2018]. Описаны клеточные механизмы функционирования вируса, а также генотипические различия, ведущие к различным патологическим процессам у зараженных людей [Lindquist L. et al., 2008; Беликов С. И. и др., 2010; Ruzek D. et al., 2019]. При этом, несмотря на относительно глубокую степень изученности вируса, отмечается недостаток надежных и безопасных противовирусных препаратов для лечения и профилактики КЭ [Борисов В. А. и др., 2002; Погодина В. В. и др., 2013; Bogović P. et al., 2015; Лучинина С. В. и др., 2016].

Ранее нами были исследованы противовирусные свойства препарата тибетской медицины DEVA-5, состоящего из растений *Gentiana decumbens* L. (26,3 %), *Momordica cochinchinensis* L. (18,4 %), *Hypocoum erectum* L. (15,7 %), *Polygonum bistorta* L. (23,6 %) и *Terminalia chebula* Retz (15,7 %), а также его компонентов по отдельности. Впервые установлено, что экстракты *H. erectum*, *T. chebula* и *M. cochinchinensis* проявляют выраженные вирулицидные свойства в отношении вируса гриппа А [Schrauf S. et al., 2009]. На основе анализа литературных данных и собственных данных предварительных экспериментов мы предположили, что вегетативные части и семена растений *M. cochinchinensis*, *H. erectum*, *T. chebula*, *P. bistorta*, *Scutellaria baicalensis*, *G. decumbens* являются перспективными источниками новых противовирусных молекул к вирусу клещевого энцефалита.

В качестве альтернативного подхода для целенаправленного подбора молекул, специфически связывающихся с поверхностью вирионов ВКЭ, мы обратили внимание на современную технологию получения аффинных молекул к белкам на основе метода систематической эволюции лигандов при экспоненциальном обогащении (SELEX, Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment). Аффинные ДНК молекулы, получаемые в процессе отбора, могут быть различными способами модифицированы и доработаны для получения вирулицидных свойств. На настоящий момент в литературе нет данных о специфических ДНК- или РНК-аптамерах, полученных в отношении ВКЭ.

### **Цель исследования**

Выявление и идентификация в экстрактах растений и в библиотеках ДНК-аптамеров новых молекул и веществ, обладающих вирулицидной активностью в отношении вируса клещевого энцефалита.

### **Задачи исследования:**

1. Сформировать панель перспективного растительного сырья для проведения исследования, оценить противовирусную активность водных растительных экстрактов в отношении вируса клещевого энцефалита *in vitro*;

2. С помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии провести фракционирование экстракта, проявившего наибольшую противовирусную активность, и определить фракции, обладающие прямым вирулицидным действием;

3. С помощью масс-спектрометрического анализа активных фракций идентифицировать кандидатные компоненты, обуславливающие вирулицидное действие экстракта и оценить вирулицидные свойства идентифицированных компонентов в химически чистой форме;

4. Сформировать библиотеку вырожденных ДНК-аптамеров, провести отбор аптамеров к вирусу клещевого энцефалита с помощью технологии систематической эволюции лигандов с экспоненциальным обогащением (SELEX) оценить аффинность обогащенного пула, установить нуклеотидную последовательность аптамеров после проведенного отбора к вирусу и оценить прямые вирулицидные свойства синтетических олигонуклеотидов.

**Научная новизна работы.** В результате проведенной работы установлено, что водные экстракты трех лекарственных растений (*H. erectum*, *T. chebula*, *P. bistorta*) обладают прямым вирулицидным действием в отношении ВКЭ. Очистка и идентификация наиболее активно действующего экстракта (*T. chebula*) позволили идентифицировать три химических компонента (пуникалагин, тригаллоил глюкоза и корилагин). Подтверждено, что химически чистые компоненты – пуникалагин, тригаллоил глюкоза и корилагин – обладают прямым вирулицидным действием в отношении ВКЭ. Проведен сравнительный анализ вирулицидного действия компонентов на вирус и цитотоксического действия на используемую культуру клеток почек эмбриона свиньи (СПЭВ). Установлено, что тригаллоил глюкоза обладает наибольшим индексом селективности среди выявленных вирулицидных молекул.

**Теоретическая значимость.** В ходе работы получены данные о прямом вирулицидном действии шести лекарственных растений в отношении ВКЭ: *G. decumbens*, *H. erectum*, *T. chebula*, *P. bistorta*, *M. cochichinensis*, *S. baicalensis*. Идентифицированы химические формулы трех компонентов водного экстракта *T. chebula*, которые коррелируют с наличием ингибирующих свойств экстракта в отношении ВКЭ. Произведена оценка 50%-й эффективной концентрации, 50%-го цитотоксического действия и определены индексы селективности химически чистых компонентов, идентифицированных в составе водного экстракта *T. chebula*. Разработанные в ходе исследования методики пригодны для идентификации активных компонентов из многокомпонентных водных экстрактов других растений. Выявленные компоненты перспективны для создания новых препаратов для профилактики и лечения клещевого энцефалита.

В ходе работы проведен отбор пула аптамеров, способных связываться с вирусными частицами клещевого энцефалита и определены нуклеотидные последовательности 16 новых аптамеров. В компьютерной биологии все больше внимания уделяется работам, посвященным анализу и предсказанию возможных 3D-структур при взаимодействии молекул-мишеней с молекулами-ингибиторами. Данная работа является частью исследований по анализу механизмов взаимодействия нуклеиновых кислот с молекулами-мишенями. Потенциально аптамеры могут стать более удобной и эффективной заменой иммуноглобулинов в диагностических системах к ВКЭ.

**Практическая значимость.** В процессе работы показана применимость использованных методов хроматографического разделения водных экстрактов для массового поиска и идентификации химических компонентов, обладающих противовирусной активностью. Данные о биологической активности химических компонентов *in vitro* позволяют перейти к проверке противовирусной активности веществ *in vivo*. По результатам исследований разработаны три средства, обладающее противовирусным действием в отношении вируса клещевого энцефалита, о чем поданы заявки на изобретение (регистрационные номера Роспента № 2022124073 от 09.09.2022, № 2022127567 от 24.10.2022, № 2022124073 от 09.09.2022).

Ожидается, что идентифицированные компоненты могут стать эффективным дополнением к существующим противовирусным средствам в профилактике и лечении КЭ.

**Методология и методы исследования.** В данном исследовании изучали способность ингибирования ВКЭ водными экстрактами растений и ДНК-аптамерами. Проведены оценка и сравнение прямого вирулицидного действия водных экстрактов шести лекарственных растений. Изучение противовирусной активности проведено на изоляте ВКЭ 92М, который относится к широко распространенному сибирскому субтипу вируса [Хаснатинов М. А. и др., 2012].

Работа основана на использовании недавно изученных в лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ) лекарственных растений, применяемых в традиционной Тибетской медицине, некоторые из которых обладают противовирусными свойствами в отношении вируса гриппа А [Oyuntsetseg N. et al., 2014]. В ходе работы получены данные о прямом вирулицидном действии шести водных растительных экстрактов. Фракционирование экстракта с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии позволило получить наиболее детальную картину распределения вирулицидных веществ по фракциям. Полученные фракции проанализированы на наличие вирулицидной активности, и активные фракции подвергнуты масс-спектрометрическому исследованию. Анализ распределения концентрации веществ, входящих в состав активных и фланкирующих неактивных фракций, позволил определить химические формулы трех потенциальных противовирусных компонентов. Химически чистые препараты идентифицированных веществ показали наличие прямого вирулицидного действия. Также проведено сравнение ингибирующей активности компонентов при обработке зараженной культуры клеток. В заключении проведен анализ наиболее эффективного вещества из идентифицированных компонентов.

В работе по отбору специфических аптамеров использована рандомизированная библиотека аптамеров в 40 нуклеотидных оснований (н. о.) с фланкирующими их адаптерными регионами в 20 н. о. Отбор проведен на изоляте ВКЭ 92М [Хаснатинов М. А. и др., 2012]. С помощью ультрафильтрации на центрифужных колонках Vivaspin 6, 100 кДа (Sartorius, Германия) выполнено семь раундов отбора аптамера к ВКЭ. Восьмой раунд отбора проведен на основе иммобилизованных вирусных частиц с помощью тест системы ВектоВКЭ-антиген (Вектор Бест, Новосибирск). Пул полученных аптамеров проверен на аффинность к ВКЭ. Двухцепочечный продукт амплификации после восьмого раунда отбора клонирован с помощью системы pJET1.2/blunt (Thermo Fisher Scientific, США). Клоны проанализированы на наличие вставки с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), с использованием плазмидных праймеров. Ампликоны с целевым размером 80 н. о. отсекутены по методу Сенгера. Первичные нуклеотидные последовательности аптамеров исследованы на возможную однородность и наличие общих нуклеотидных последовательностей.

В работе использовались следующие основные методы:

- вирусологические и микробиологические – прямая микроскопия, определение индекса вирулицидности, оценка ко-инкубации зараженных клеточных культур с ингибирующими компонентами, посев и хранение колоний *E. coli*;
- молекулярно-генетические – симметричная и ассиметричная ПЦР, клонирование коротких фрагментов ДНК, трансформация компетентных штаммов *E. coli*, секвенирование ДНК по Сенгеру, электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот в агарозном и полиакриламидном гелях, проведение SELEX-отбора, очистка ПЦР-продуктов, иммуноферментный анализ;
- физико-химические – экстрагирование органическими растворителями, жидкостная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ);
- цитологические – культивирование клеток, изучение морфологии клеток с помощью световой микроскопии окрашенных препаратов, определение цитотоксичности веществ;
- статистические (критерий оценки статистической значимости различий Манна – Уитни, корреляционный анализ *r*-Пирсона).

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Водные экстракты трех лекарственных растений обладают достоверной противовирусной активностью *in vitro* в отношении вируса клещевого энцефалита. Это *H. erectum*, *P. bistorta*, *T. chebula*. Наибольшим вирулицидным действием обладает водный экстракт *T. chebula*.

2. Экстракт *T. chebula* содержит три химических соединения, обуславливающие вирулицидные свойства в экспериментах *in vitro*, – корилагин, тригаллоил глюкозу и пуникалагин.

3. Химически чистые корилагин, тригаллоил глюкоза и пуникалагин оказывают прямое вирулицидное действие на вирус клещевого энцефалита *in vitro*. Корилагин и пуникалагин способны ингибировать репродукцию вируса клещевого энцефалита в зараженной вирусом культуре клеток СПЭВ.

4. Систематическая эволюция лигандов с экспоненциальным обогащением приводит к формированию полиморфного пула ДНК-аптамеров, способного аффинно связываться с вирионами вируса клещевого энцефалита.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность результатов исследования подтверждается четким исполнением экспериментов по научным стандартам. Каждый эксперимент проведен не менее чем в трех биологических повторах. Постановка каждого эксперимента осуществлялась с использованием отрицательных и положительных контрольных образцов. Статистическую значимость различий оценивали с помощью U-критерия Манна – Уитни. Статистический анализ выполнен с помощью программ MaxStat Lite (MaxStat Software, Германия) и Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corp., США). Массы идентифицированных компонентов подтверждали с помощью методов tandemной масс-спектрометрии.

По теме диссертации опубликовано 7 работ, в том числе 5 – в научных журналах, рекомендованных ВАК РФ, из которых 2 – в журналах, индексируемых в БД Web of Science.

Основные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на российских и зарубежных научных конференциях, в том числе: V Всероссийский с международным участием медико-биологический конгресс молодых ученых «Симбиоз – Россия 2012» (Тверь, 3–8 декабря 2012 г.); II Межрегиональная научно-практическая конференция молодых ученых «Фундаментальные и прикладные аспекты в медицине и биологии» (Иркутск, 28 октября 2016 г.); Международная научно-практическая конференция, посвященная 20-летию научного сотрудничества между Россией и Монголией «Разные страны – общие проблемы природно-очаговых инфекций» (Иркутск, 6–8 сентября 2018 г.); III Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты в медицине и биологии» (Иркутск, 18–19 октября 2018 г.); Международная научная конференция «Перспективы развития технологий в Байкальском регионе» (Иркутск, 5–7 февраля 2019 г.); V Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты в медицине и биологии» (Иркутск, 27–28 октября 2022 г.). Материал рекомендован к представлению на конференции «Актуальные проблемы эпидемиологии, микробиологии, природной очаговости болезней человека», посвященной 100-летию основания Омского НИИ природно-очаговых инфекций (Омск, 28–29 сентября 2021 г.) и к опубликованию в научно-практическом журнале «Национальные приоритеты России» (Омск, 2021).

**Личный вклад автора.** Личный вклад автора заключается в выполнении основных экспериментальных и теоретических работ, планировании исследований, проведении экспериментов, анализе и обработке полученных данных, а также оформлении результатов в виде публикаций и научных докладов, которые автор проводил персонально.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, списка использованной литературы; изложена на 159 страницах текста, иллюстрирована 34 рисунками и 1 таблицей. Список использованной литературы включает в себя 396 наименования, из них 53 – на русском языке, 343 – на иностранных языках.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

## Материалы и методы

В работе использовали высокоочищенные химические компоненты (Sigma-Aldrich): 1,3,6-три-О-галлоил-бета-D-глюкоза (PubChem – 452707), пуникалагин (PubChem – 16129869), корилагин (PubChem – 73568). Все лиофилизированные компоненты перед исследованием растворяли в 1 мл стерильной бидистиллированной воды и стерилизовали фильтрованием.

Материалы шести лекарственных растений, которые применяют в традиционной тибетской медицине – *Hypocoum erectum*, *Polygonum bistorta*, *Terminalia chebula*, *Gentiana decumbens*, *Scutellaria baicalensis*, *Momordica cochinchinensis*, – использовали в качестве источников противовирусных молекул. Препараты семян и частей растений любезно предоставлены Н. Оунтсетег (Монгольский государственный медицинский университет) в высушенном и измельченном виде. Рабочие экстракты растительных препаратов приготавливали в виде 2%-го водного отвара (масса/объем) в соответствии с данными Н. Оунтсетег [Oyuntseteg N. et al., 2014]. Для этого 30 г каждого препарата растительного происхождения приготавливали путем кипячения на слабом огне до достижения объема жидкости 100 мл. Отвары процеживали через марлю и центрифугировали, после чего проводили фильтрование через ряд грубых фильтров. Полученные отвары стерилизовали фильтрацией через шприцевой фильтр 0,22 мкм. Финальные растворы отваров хранили при –20 °С до использования.

Высокоэффективную жидкостную хроматографию выполняли с использованием обращенно-фазовой колонки Zorbax 300 SB-C18 (Agilent, США) размерами 21 × 150 мм и с размером частиц 5 мкм и системой Shimadzu LCMS-8060 (Shimadzu, Япония). Разделение осуществляли в градиенте ацетонитрила от 2,5 % до 88 % в течение 80 минут с добавлением 0,1%-го раствора муравьиной кислоты и со скоростью потока 0,5 мл/мин. Объем 30%-го экстракта препаративного вкола образца – 50 мкл. Сбор фракций проводили по 250 мкр, начиная с 2,5 минуты. Полученные фракции выдерживали при 70 °С в течение 6 часов для удаления растворителя. После в пробирки вносили по 300 мкл diH<sub>2</sub>O. Всего в ходе разделения получено 125 фракций. Полученные препараты от фракций анализировали на вирулицидное действие.

В работе использовали изолят 92М ВКЭ сибирского подтипа [Хаснатинов М. А. и др., 2012]. Пассирование ВКЭ и определение концентрации инфекционного вируса проводили на клеточной линии почек эмбриона свиньи (СПЭВ), приобретенной из «Коллекции линий клеток человека и животных» для исследований в области вирусологии» (ФГУ НИИ гриппа, Санкт-Петербург). Культуру клеток поддерживали на среде RPMI 1640 с добавлением антибиотиков и фетальной телячьей сыворотки (Thermo Fisher Scientific, США). Концентрацию инфекционного вируса в исходной суспензии определяли путем титрования бляшкообразующих единиц (БОЕ) в культуре клеток и выражали в виде десятичного логарифма БОЕ на миллилитр суспензии (lg БОЕ/мл). В качестве референс-образца (К–) использовали стерильный бидистиллят, в качестве положительного контроля или контрольного образца (К+) – иммуноглобулин G против ВКЭ, в конечном разведении 1:80. Каждый эксперимент проводили в трех повторах.

Прямое вирулицидное действие – это действие препарата непосредственно на вирусные частицы, которое приводит к инаktivации инфекционности вируса. Оценку прямого вирулицидного действия проводили с помощью реакции нейтрализации по Э.Гоулду [Gould E. A. et al., 1985] с модификациями. В частности, 100 мкл суспензии вируса, содержащей  $5 \times 10^4$  БОЕ ВКЭ, смешивали со 100 мкл тестируемого, референс- или контрольного образца. В качестве положительного контроля вирулицидности использовали донорский иммуноглобулин G человека против ВКЭ (ФГУС «НИЦ Микроген», Томск) в концентрации 1 мг/мл. Стерильную бидистиллированную воду использовали в качестве референс-образца. Смесь ВКЭ и образец инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. Определение концентрации инфекционного вируса проводили подсчетом БОЕ в каждом эксперименте. Индекс ингибирования рассчитывали как разницу титров (в логарифмическом выражении) в референс-

образце и титра ВКЭ в образце, обработанном исследуемым препаратом. Каждый эксперимент проводили в трех независимых повторах.

Для изучения ингибирования вируса веществами при ко-инкубации с зараженной культурой клеток монослой культуры клеток СПЭВ заражали  $5 \times 10^4$  БОЕ инфекционных вирусных частиц на миллилитр среды RPMI 1640 без сыворотки. Заражение монослоя клеток проводили при комнатной температуре в течение 30 минут, после чего вирусную суспензию убирали, а монослой клеток промывали средой. Далее вносили раститровки тестируемых препаратов. Клетки инкубировали трое суток в атмосфере 5%-го  $\text{CO}_2$  при  $37^\circ\text{C}$ . Затем культуральную среду собирали и определяли количество инфекционного вируса титрованием БОЕ. Индекс ингибирования рассчитывали как разницу титров ВКЭ (в логарифмическом выражении) в исследуемом и контрольном образцах.

Оценку цитотоксического действия препаратов на монослой клеток СПЭВ выполняли в 24-луночных планшетах, выращенных в питательной среде RPMI 1640, с добавлением 5%-й фетальной бычьей сыворотки и антибиотиков. Монослой клеток инкубировали со 100 мкр тестируемых образцов в серии двукратных разведений в течение 3 суток в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при  $37^\circ\text{C}$  в атмосфере 5%-го  $\text{CO}_2$ . Концентрация фетальной бычьей сыворотки в поддерживающей среде была снижена до 2%. Параллельно инкубировали контрольные образцы клеток, в которых вместо тестируемых компонентов использовали стерильный фосфатно-солевой буфер (ФСБ;  $\text{pH} = 7,4$ ) в соответствующих разведениях. Эксперимент воспроизводили в трех независимых повторах. Инкубацию проводили в течение 3 дней, после чего клетки фиксировали и окрашивали раствором кристаллического фиолетового. Для сравнительной оценки количества жизнеспособных клеток проводили экстракцию красителя в 100 мкл метанола и измеряли оптическую плотность (ОП) экстрактов при длине волны 540 нм. Измерения производили с помощью спектрофотометра Immunochem 2100 (High Technology Inc., США). Выживаемость клеток при контакте с исследуемым препаратом в заданной концентрации рассчитывали как отношение ОП экстракта кристаллического фиолетового в лунке с препаратом к ОП экстракта кристаллического фиолетового в лунке с контрольным монослоем в соответствующем разведении и выражали в процентах. Максимальную концентрацию, при которой выживаемость клеток составляла более 80%, считали максимальной нетоксичной концентрацией.

Для проведения отбора аптамеров на основе технологии SELEX использовали ДНК-библиотеку аптамеров. Длина исходной одноцепочечной молекулы ДНК составляла 80 нуклеотидов. Исходный пул синтетических одноцепочечных ДНК (оцДНК) олигонуклеотидов получен путем прямого синтеза (ЗАО Евроген, Москва). Концентрация исходной одноцепочечной библиотеки, взятая в первый раунд отбора, составила 1200 пМ. Центральный рандомизированный фрагмент длиной 40 н. о. фланкирован адаптерами последовательностями в 20 н. о., под праймеры (5'-СТССТТGACTGTAACCACG-3' и 5'-GGCTTCTGG СТАССТАТGC-3'). В качестве мишени для позитивной селекции использовали изолят ВКЭ сибирского субтипа 92М [Хаснатинов М. А. и др., 2012]. Перед первым раундом отбора оцДНК библиотеку термически денатурировали, с последующей инкубацией в ледяной бане. Перед непосредственной инкубацией с мишенью аптамеры выдерживали при комнатной температуре в течение 15 минут.

Подготовленный раствор пула аптамеров переносили в 1 мл культуральной жидкости RPMI с изолятом ВКЭ 92М. После инкубации суммарный объем переносили в центрифужные концентраторы Vivaspin 6 (Sartorius, Германия) с отсекающей массой в 100 кДа. Объем верхней камеры доводили до 6 мл ФСБ, после чего проводили центрифугирование. После завершения центрифугирования объем верхней камеры доводили ФСБ до 6 мл. Данный раунд отмывки/центрифугирования повторяли 6 раз. Сконцентрированный объем из верхней камеры (~150 мкр) служил матрицей для наработки двуцепочечного ДНК (дцДНК) аптамера. ПЦР проводили на реал-тайм амплификаторе Realtime CFX (Bio-Rad, США) с детекцией сигнала интеркалирующего красителя SYBR Green. Условия амплификации включали предварительный прогрев смеси при  $96^\circ\text{C}$  в течение 3 мин с последующими 25 циклами ПЦР:

96 °С в течение 10 с; 50 °С в течение 10 с; 60 °С в течение 1 мин. Реакционная смесь была составлена на основе набора Epcyclo PCR (ЗАО Евроген Москва) в объеме 25 мкл. По завершении реакции амплификации проводили электрофорез в 2%-м агарозном геле или в 12%-м полиакриламидном геле с использованием маркера молекулярного веса (100 bp DNA Ladder, Invitrogen). Полосу с предполагаемой массой вырезали и использовали в качестве матрицы для наработки одноцепочечного ДНК-аптамера. Нарботка оцДНК для следующего раунда отбора проводилась методом неравновесного ПЦР, с 50х-преобладанием одного из праймеров. Фрагмент оцДНК очищали от реакционной смеси с помощью электрофореза в 2%-м агарозном геле, вырезанную оцДНК – с помощью набора для очистки ДНК (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN).

В ходе работы проведено семь раундов отбора аптамера к ВКЭ. Восьмой раунд отбора выполнен к ВКЭ, который предварительно был иммобилизован на планшете через моноклональные антитела (тест-система «ВектоВКЭ-антиген», ВекторБест, Новосибирск). Аналогично после инкубации вируса с аптамером несвязавшиеся последовательности аптамеров отмывали раствором ФСБ. Связавшиеся с вирусом последовательности аптамеров выделяли с планшета с помощью комплекта для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва). Выделенная проба нуклеиновых кислот служила матрицей для амплификации дцДНК-аптамера. Полосу дцДНК после финального раунда отбора электрофоретически разделяли, а фрагмент ДНК с необходимой длиной клонировали. Клонирование проводили в химически компетентные клетки *E. coli* (XL1 Blue), 10 мкл лигазной смеси набором CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Отдельные клоны бактериальных колоний анализировали на наличие вставки с помощью ПЦР-анализа с использованием плазмидных праймеров. Полученные от амплификации ПЦР-продукты разделяли в 2%-м агарозном геле, ДНК-фрагменты нужной длины вырезали и использовали в качестве матрицы для секвенирования. Секвенирование проводили по методу Сенгера, с помощью капиллярного секвенатора «Нанофор 05» (ФГБНУ ИЦ ПЗСРЧ, Иркутск) и набора BigDye (Thermo Fisher Scientific, США).

Результаты экспериментов представлены в виде средних значений трех независимых воспроизведений. Для оценки вариабельности наблюдений рассчитывали стандартное отклонение средних значений. Оценку статистической значимости различий между двумя независимыми выборками проводили с помощью U-критерия Манна – Уитни; различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Корреляционные взаимосвязи между интенсивностью ионов и вирулицидным действием фракций оценивали по методу Пирсона. Интенсивность пиков веществ (количество ионов попавших на детектор масс) принимали пропорциональными концентрации вещества. Корреляционную связь считали статистически значимой при коэффициенте корреляции  $r \geq 0,7$ . Расчеты проводили с помощью программы MS Excel (Microsoft Corp., США), а также программы MaxStat Lite (MaxStat Software, Германия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Прямое вирулицидное действие растительных экстрактов

Из шести приготовленных нами водных растительных экстрактов три обладали достоверной прямой вирулицидной активностью в отношении вируса клещевого энцефалита – это водные экстракты *H. erectum*, *P. bistorta*, *T. chebula*. На рисунке 1А представлена остаточная инфекционность после инкубации вирусных частиц с соответствующими экстрактами. Для того чтобы оценить наиболее активный растительный экстракт из трех активных, были приготовлены их водные растворы с концентрацией растворенного вещества в 1 мг/мл (Рисунок 1Б). В результате оценки бляшкообразующих единиц, наибольшую активность показал водный экстракт *T. chebula*. Дальнейшие работы по выделению и идентификации проводили на водном экстракте *T. chebula*.

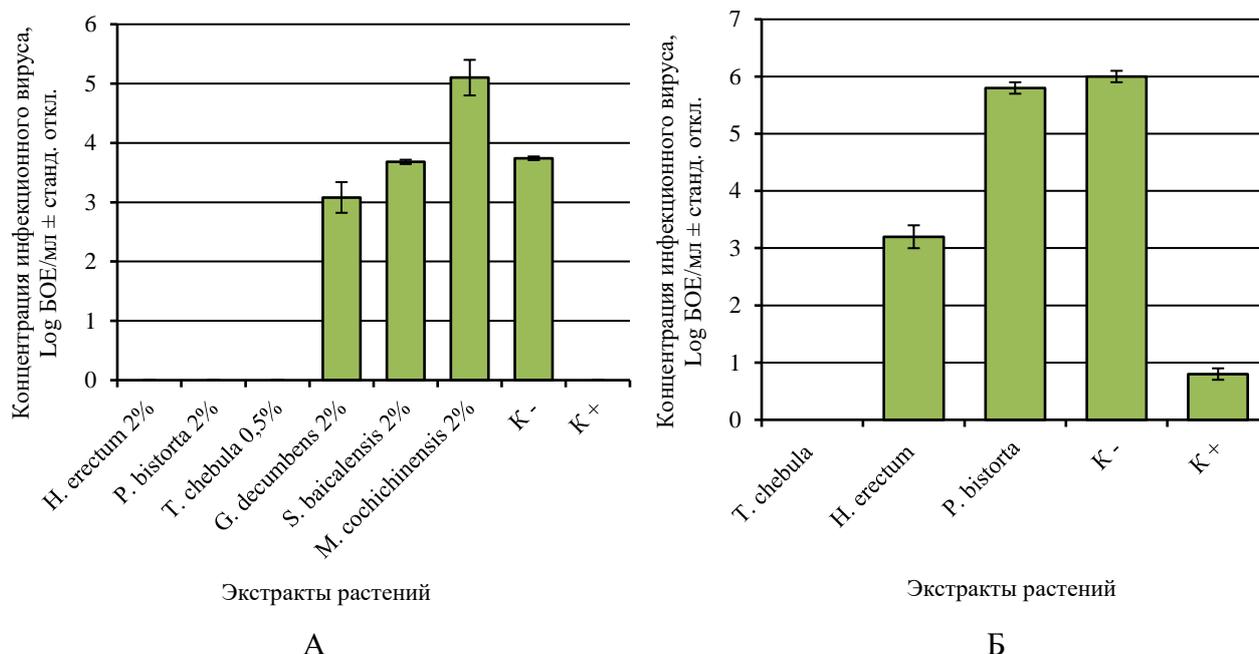


Рисунок 1 – Инфекционность вируса клещевого энцефалита: А – после инкубации с водными экстрактами растений *H. erectum*, *P. bistorta*, *T. chebula*, *G. decumbens*, *S. baicalensis*, *M. cochichinensis*;  $\text{diH}_2\text{O}$  (K–), референс-образец (K–), положительный контрольный образец (K+); Б – после инкубации с водными экстрактами растений *T. chebula*, *H. erectum*, *P. bistorta*;  $\text{diH}_2\text{O}$  (K–), иммуноглобулин G (K+). Планки погрешностей отражают стандартное отклонение по результатам трех независимых воспроизведений.

### Анализ спектра масс вирулицидных фракций после ВЭЖХ

Активность фракций после ВЭЖХ водного экстракта *T. chebula* продемонстрировала следующую картину распределения вирулицидного действия на ВКЭ, представленную на Рисунках 2А–В). По результатам анализа из 125 проверенных фракций от разделения выделено 12 областей, которые снижали инфекционность вируса на два порядка. В панели активностей определены четыре области, которые полностью ингибировали вирус в экспериментах, – это фракции 35, 39, 46–47, 86–89.

Чтобы проследить распределение и идентифицировать компоненты, обладающие вирулицидным действием, для масс-спектрометрического анализа были выбраны 29 фракций. Это фракции с наиболее высоким значением ингибирования вируса, с фланкирующими их фракциями. В результате сконструирована панель значений вирулицидного действия фракций, с которыми происходило сравнение концентраций компонентов, присутствующих во фракции (Рисунок 2Г). В среднем в вирулицидных фракциях обнаружены массы более 50 различных компонентов. Графики количественного распределения компонентов составлены для каждой фракции. Приоритетным режимом для построения закономерности масс-спектрометрического распределения выбран негативный режим ионизации веществ. При разборе интенсивности показателей масс не найдено корреляции одного компонента, который полностью совпадал с ингибирующей активностью всех фракций. Вместо этого найден ряд компонентов, которые хорошо подходили под распределение отдельных фракций. Такие данные могут указывать на то, что в анализируемом экстракте *T. chebula* присутствует не один вирулицидный компонент, а несколько.

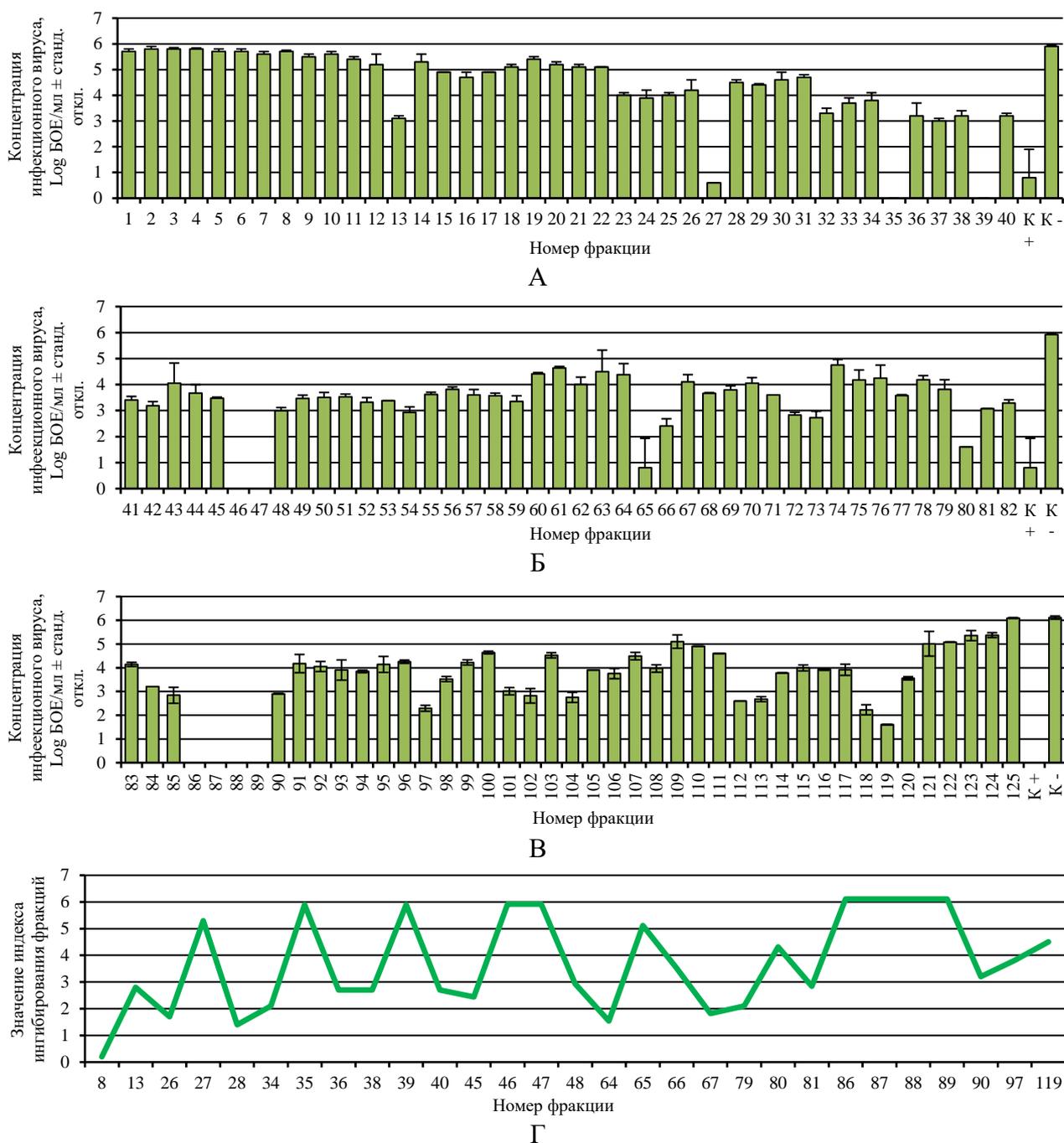


Рисунок 2 – Панель вирулицидного действия фракций экстракта *T. chebula* после разделения с помощью ВЭЖХ;  $\text{diH}_2\text{O}$  (К-), иммуноглобулин G (К+). Планки погрешностей отражают стандартное отклонение по результатам трех независимых воспроизведений (А, Б, В) и значения индексов вирулицидности фракций от ВЭЖХ-разделения водного экстракта *T. chebula*, выбранных для масс-спектрометрического анализа (Г)

Поскольку фракции 35, 39, 46–47, 86–89 полностью ингибировали вирус, а следовательно, имели одинаковый индекс вирулицидности, нельзя было сравнить их активности между собой. Для сравнения наиболее активных вирулицидных фракций для каждой фракции определены значения полумаксимальной эффективной концентрации (EC50). Поскольку точную концентрацию веществ в каждой фракции установить не представлялось возможным, то в сравнении использовали серийные двукратные разведения фракций в стерильном ФСБ в диапазоне от 1:8 до 1:1024. Далее рассчитывали концентрацию EC50 по методу Рида и Менча [Reed L. J. et al., 1938] и выражали в виде обратного титра. Оказалось, что наибольшей вирулицидной активностью обладает фракция 46, которая вдвое

снижает инфекционность ВКЭ при разбавлении ее в 293 раза, тогда как для остальных фракций ЕС50 варьировала в диапазоне от 1:22 до 1:80 (Рисунок 3А).

Ион компонента в 635 а. е. м. был найден от ВЭЖХ разделения 86–89 с наибольшей концентрацией в фракции 87 (Рисунок 3Б). Однако значение его корреляции не совсем отображало вирулицидную активность фракций. Коэффициент корреляции  $r$  по Пирсону составил 0,456. Кроме того, в тех же фракциях обнаружено наличие компонента с массой 636 а. е. м., коэффициент корреляции для которого составил  $r = 0,96$  (Рисунок 3В). Максимальная концентрация иона 636 а. е. м. наблюдалась в фракции 87. Такое же количественное распределение наблюдалось для масс 837 и 838 а. е. м. по фракциям 86–89. При дополнительном фрагментационном анализе масс 635, 636, 637 и 638 обнаружено, что все эти ионы являются изотопами одного и того же компонента, так как давали идентичные картины фрагментации.

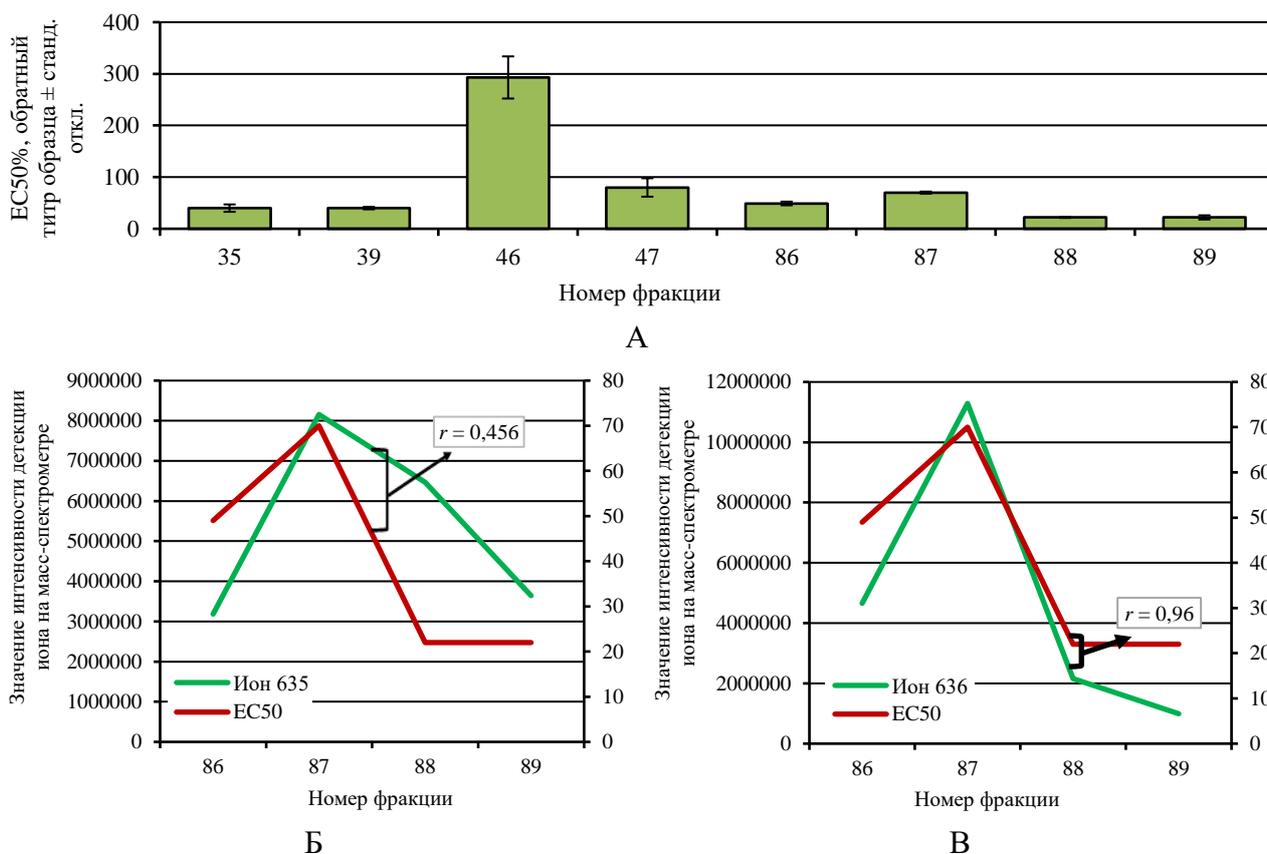


Рисунок 3 – Сравнение ЕС50 наиболее активных фракций *T. chebuli* в отношении вируса клещевого энцефалита: вирулицидную активность определяли для идентичных серийных двукратных разведений каждой фракции в диапазоне от 1:8 до 1:1024; ЕС50 фракции рассчитывали по методу Рида – Менча и выражали в виде обратного титра, при котором концентрация инфекционного вируса снижается на 50 %. Планки погрешностей отражают стандартное отклонение по результатам трех независимых воспроизведений (А), корреляции значений ЕС50 фракций 86–89 и интенсивности детекции иона 635 а. е. м.: по вспомогательной оси – показатели ЕС50 выбранных фракций (Б), корреляции значений ЕС50 фракций 86–89 и интенсивности детекции иона 636 а. е. м.: по вспомогательной оси – показатели ЕС50 выбранных фракций (В)

При анализе масс спектров найдены корреляции между позитивным (+) и негативным (–) режимами сканирования, которые показали сильную связь в распределении концентраций ионов 355,05 и 357 (Рисунок 4А). Это может указывать на то, что данные массы могут принадлежать одному и тому же компоненту. Однако с общей картиной вирулицидного

действия фракций полное совпадение данных прослеживалось не во всех фракциях. Поэтому данные массы в дальнейшем анализе не учитывались.

Также обнаружена взаимосвязь между некоторыми массами анионов при анализе негативного режима. Так, ионы с массами 1083,1 и 541,05 имели похожую картину распределения между собой в анализируемых фракциях (Рисунок 4Б). Позднее установлено, что ион 541 – продукт иона 1083, обладающий двойным зарядом.

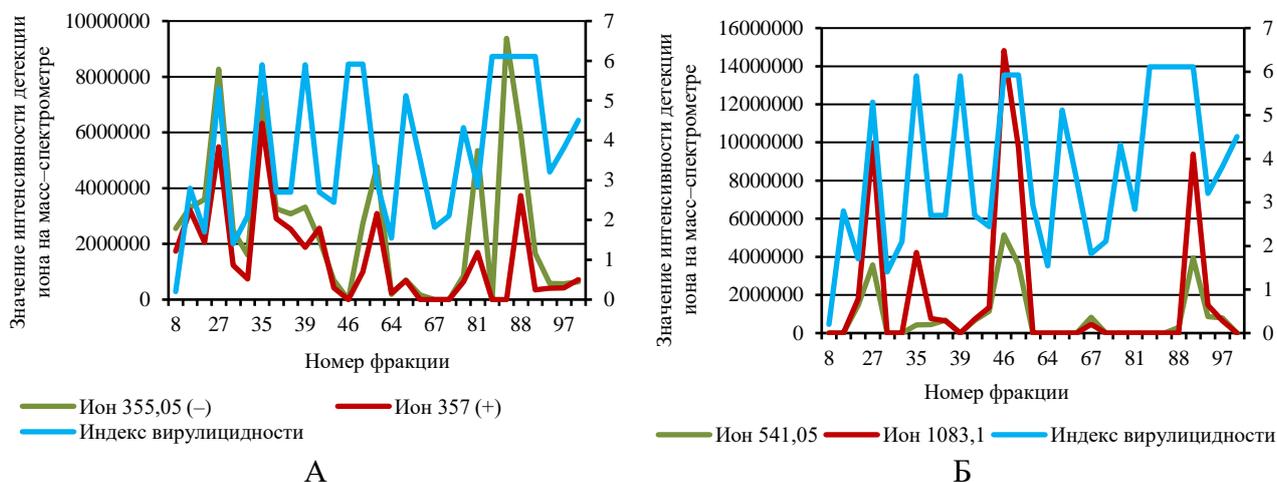


Рисунок 4 – Распределение концентраций ионов 355 (–) и 357 (+) (А); распределение ионов 541 и 1083 в негативном режиме сканирования (Б) по фракциям с вирулицидной активностью фракций. По вспомогательной оси – индексы вирулицидности фракций от ВЭЖХ-разделения водного экстракта *T. chebula*, выбранных для масс-спектрометрического анализа

Так как при проверке 50%-й вирулицидности наиболее активных фракций фракция 46 показала наибольшее значение ингибирования вируса, мы уделили более пристальное внимание ее изучению. При тщательном анализе концентраций ионов в данной фракции наиболее подходящим под картину ингибирования оказался ион с массой 1083,1. Данный компонент представлен в фракции 46 в мажоре. Другие массы ионов, найденные в фракции 46, представлены в значительно меньшей концентрации. Анализ минорных компонентов в фракции 46 не дал сильной корреляции со значениями вирулицидности. Кандидатный ион с массой в 1083,1 присутствовал в максимальных значениях в двух фракциях – 27 и 46 (Рисунок 4В). Значений распределения иона с массой 1083,1, противоречащих общей картине вирулицидного действия, не выявлено. Целевой ион массой 1083,1 был подвергнут масс-спектрометрической фрагментации. Результаты тандемной спектрометрии иона 1083,1 из фракций 27 и 46 показали, что исходным компонентом является пуникалагин (*punicalagin*, номер по базе PubChem – 16129869) с молекулярной массой 1084. Химическая структура вещества представлена на Рисунке 5А.

Несмотря на то, что концентрация иона с одной массой находится в двух фракциях (27 и 46), их вирулицидная активность была различной. Так, фракция 46 обладала в разы большей вирулицидной активностью, чем 27. Чтобы найти объяснение данному наблюдению, ионы из двух фракций также подвергли фрагментации. Сравнение картин фрагментаций иона 1083,1 из фракций 27 и 46 между собой показало небольшие отличия в наборе полученных фрагментов масс (Рисунок 5Б, 5В). Общими оказались фрагменты массы 575 и 600,95. Отличительным фрагментом стал ион 721,05 из фракции 27, вместо которой в фракции 46 был ион 781.

Полученные различия в данных могут указывать на то, что пуникалагин присутствует в двух изомерных состояниях. В литературных источниках найдена статья, подтверждающая данную теорию. Так, для водно-этанольного экстракта из кожуры граната проведено подобное разделение в аналогичных условиях ВЭЖХ [Lu J. et al., 2008]. В статье представлены данные о времени удержания  $\alpha$ - и  $\beta$ -изомеров пуникалагина (Рисунок 6А). Мы предположили, что в нашем случае в фракции 27 может находиться изомер  $\alpha$ , а в фракции 46 – изомер  $\beta$ . Позднее это было подтверждено.

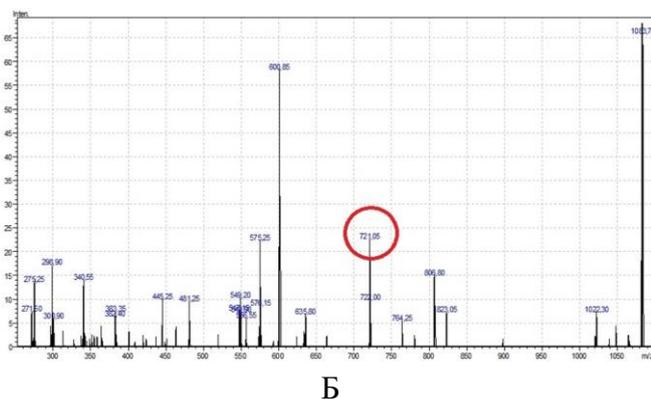
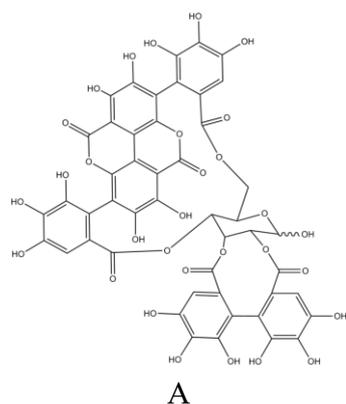
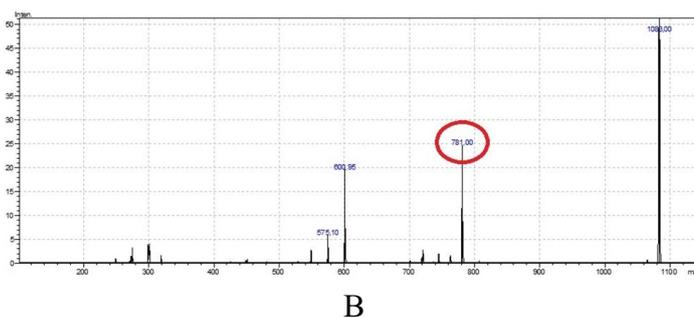


Рисунок 5 – Схема химической структуры пуникалагина (А); спектр масс иона 1083,01 из фракций 27 (Б) и 46 (В): по вертикали – значения интенсивности масс-спектрометрического сигнала; по горизонтали – значения молекулярной массы ионов; красным кружком отмечена масса, получаемая от фрагментаций ионов 1083,01 из фракций 27 и 46



Как можно заметить из спектрограммы фрагментации иона 1083 из фракции 27, в наборе масс обнаружена масса 635 а. е. м. в минорной части. Было выдвинуто предположение, что пуникалагин может быть предшественником, тригаллоил глюкозы, обнаруженной в активных фракциях 86–89. Следует также отметить, что по химической структуре пуникалагин напоминает тригаллоил глюкозу, только с добавлением еще одной галловой кислоты и наличием дополнительной эллаговой кислоты между двумя остатками галловых кислот. Данные по фрагментации иона 635 (продукт от 1083,1) и фрагменты от иона 636 показали, что данные ионы дают разные набор масс (Рисунок 6Б, 6В). Это может указывать на независимое происхождение компонента 636 от предшественника пуникалагина иона 1083,1.

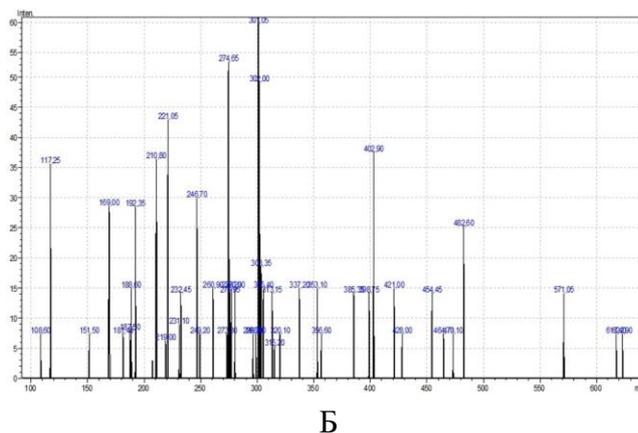
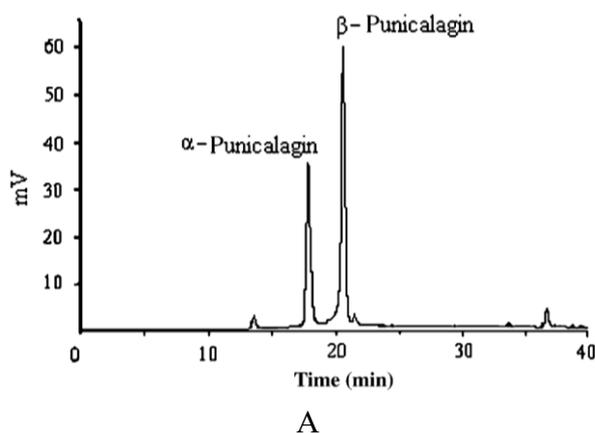
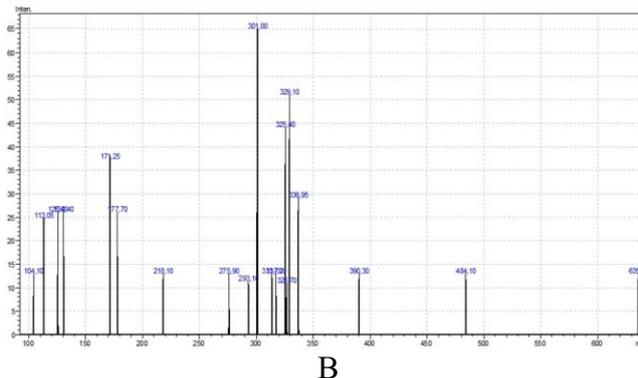


Рисунок 6 – Хроматограмма изомеров  $\alpha$ - и  $\beta$ -пуникалагина из кожуры граната, по данным J. Lu et al. (А); спектр масс ионов, полученных от фрагментации иона 635 (продукт иона 1083,1 из фракции 27): Б – фрагментация иона 636; В – фракция 87; по вертикали – значения интенсивности масс-спектрометрического сигнала; по горизонтали – значения молекулярной массы ионов



Как и ожидалось, приобретенный химически чистый пуникалагин показал наличие двух пиков на хроматограмме, аналогично двум ожидаемым  $\alpha$ - и  $\beta$ -формам пуникалагина. При проверке масс спектров, обнаружено, что химически чистый пуникалагин дает аналогичный спектр масс, что и обнаруженная  $\beta$ -изоформа пуникалагина из фракции 46 (Рисунок 7А).

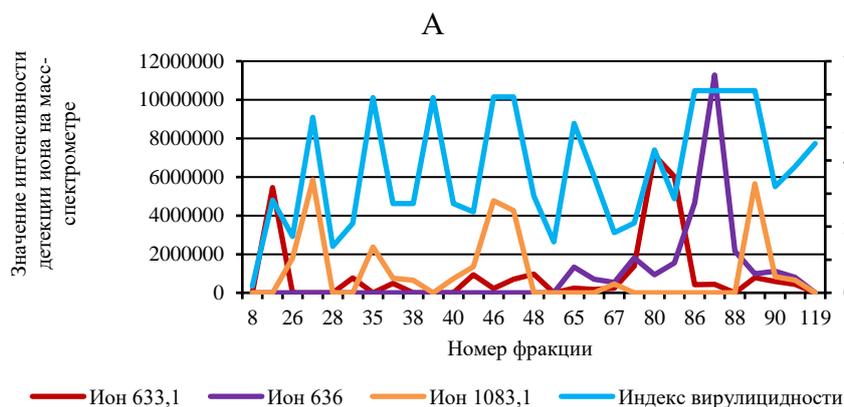
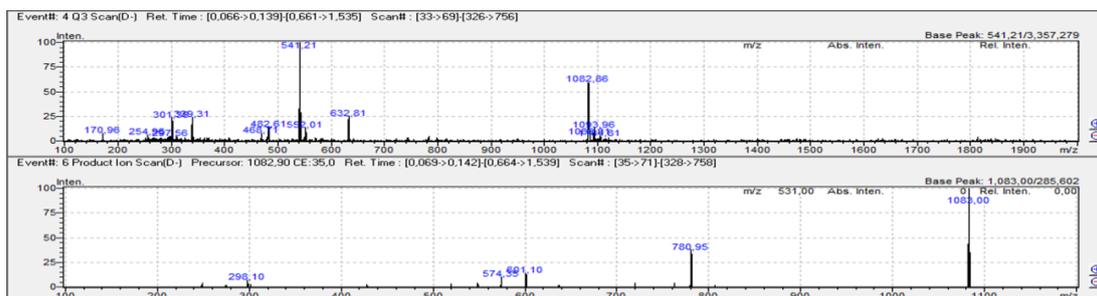


Рисунок 7 – Масс-спектр химически чистого пуникалагина (А): сверху – суммарный спектр масс ионов, снизу – продукты ионов от массы 1083,1 коммерческого пуникалагина; распределение вирулицидного действия фракций и ионов 633,1 (корилагин), 636 (тригаллоил глюкоза) и 1083,1 (пуникалагин) (Б)

В ходе анализа спектра масс активных фракций обнаружены ионы корилагина (633,1), которые присутствовали во фракциях 13 и 80. В результате масс-спектрометрического анализа получена картина распределения идентифицированных веществ в активных фракциях, представленная на Рисунке 7Б. Выбранная панель вирулицидных фракций с восьмью значимыми пиками вирулицидности позволила объяснить активность для шести из них.

### Проверка вирулицидного действия химических чистых аналогов компонентов экстракта *T. chebula* и аптамеров

*Идентифицированные компоненты.* Проведена проверка и сравнение прямой вирулицидной активности потенциальных веществ – пуникалагина, корилагина и тригаллоил глюкозы, – идентифицированных из водного экстракта *T. chebula*. Все три химически чистых компонента (Sigma-Aldrich) показали прямое вирулицидное действие в отношении вируса клещевого энцефалита в опытах *in vitro*. Надо учитывать, что при первичной проверке прямого вирулицидного действия компоненты взяты в разных концентрациях (Рисунок 8А). Так, концентрация тригаллоил глюкозы, использованная в тесте, была в два раза меньше, чем концентрация корилагина; при этом концентрация пуникалагина была в 50 раз меньше концентрации корилагина. По результатам сравнения вирулицидной активности компонентов следует отметить, что самым биологически активным компонентом из идентифицированных веществ является пуникалагин. Вторым по активности идет корилагин, и менее выраженную вирулицидную активность проявляет тригаллоил глюкоза.

В результате определения значений  $EC_{50}$  химически чистых компонентов, идентифицированных из водного экстракта *T. chebula*, получены следующие значения. Так, наибольшее вирулицидное действие ( $EC_{50}$ ) продемонстрировал пуникалагин –

0,0007 мг/мл. Следующим по эффективности оказался корилагин – 0,002 мг/мл. Наименьшим вирулицидным значением EC50 обладала тригаллоил глюкоза – 0,009 мг/мл (Рисунок 8Б).

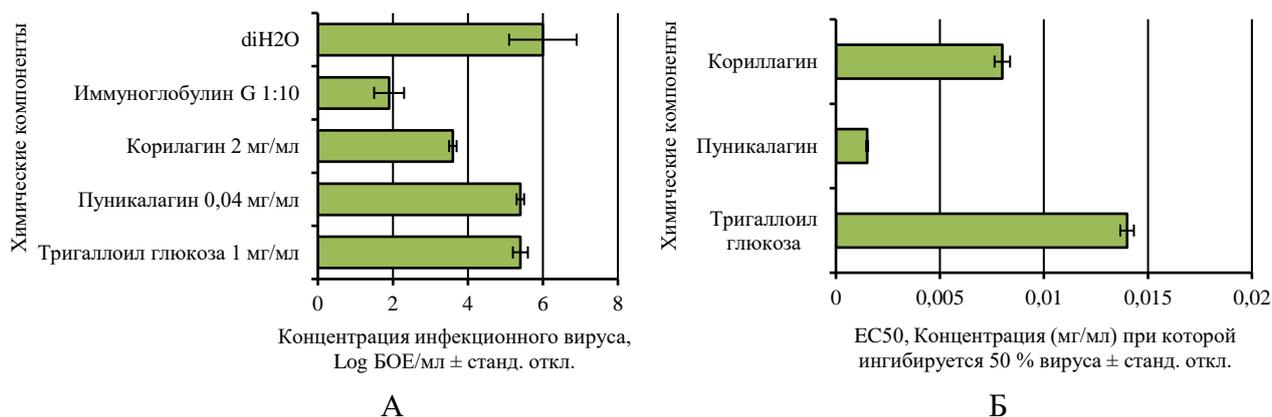


Рисунок 8 – Прямая вирулицидная активность химически чистых компонентов, идентифицированных веществ: пуникалагин, корилагин и тригаллоил глюкоза (А) и сравнение значений EC50 идентифицированных компонентов (Б). Прямую вирулицидную активность определяли для серийных двукратных разведений, полумаксимальную эффективную концентрацию (EC50) компонентов рассчитывали по методу Рида – Менча (мг/мл), при которой концентрация инфекционного вируса снижается на 50 %. Планки погрешностей отражают стандартное отклонение по результатам трех независимых воспроизведений

Проведена оценка ингибирующего действия компонентов в разной концентрации при ко-инкубации с зараженной культурой клеток. В качестве референса в эксперименте использован раствор ФСБ. Распределение остаточной инфекционности вируса клещевого энцефалита представлено на Рисунок 9.

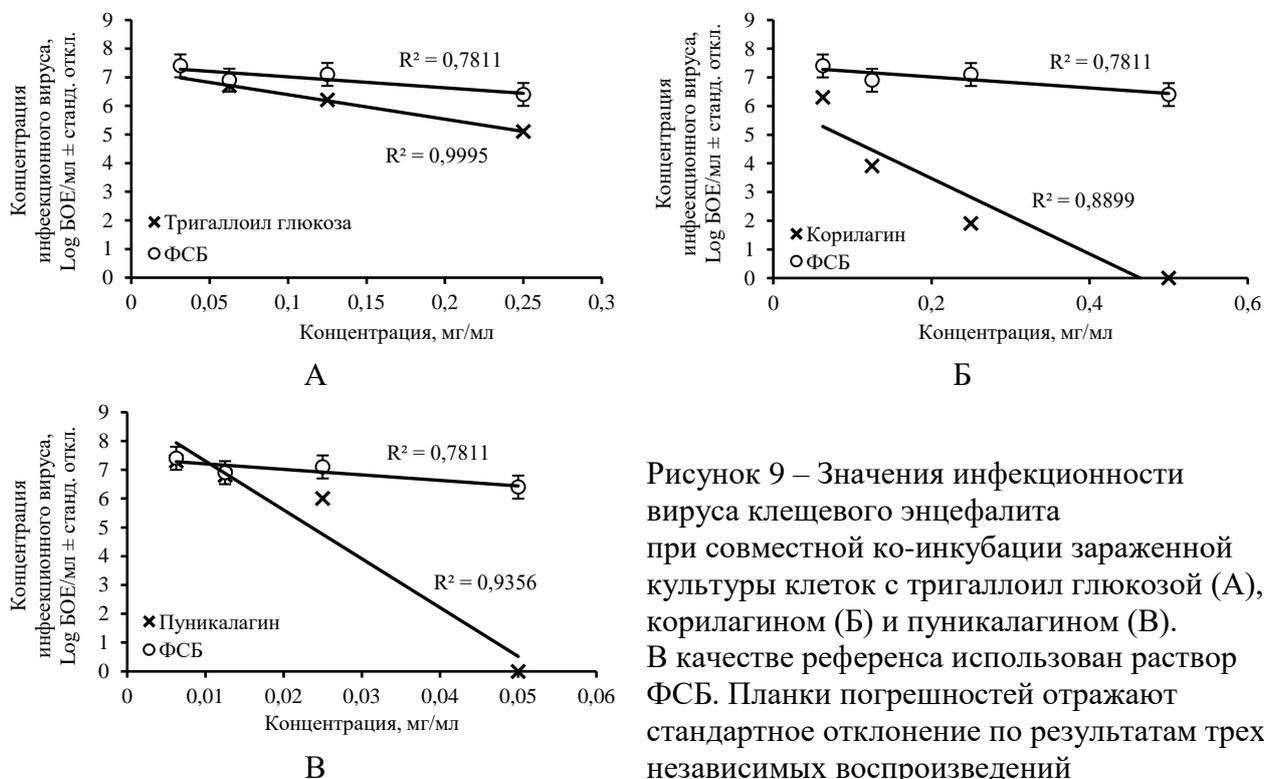


Рисунок 9 – Значения инфекционности вируса клещевого энцефалита при совместной ко-инкубации зараженной культуры клеток с тригаллоил глюкозой (А), корилагином (Б) и пуникалагином (В). В качестве референса использован раствор ФСБ. Планки погрешностей отражают стандартное отклонение по результатам трех независимых воспроизведений

Как видно из графиков, наиболее выраженным ингибирующим действием, как и при прямом вирулицидном действии компонентов, обладали пуникалагин и корилагин. Тригаллоил глюкоза в данной проверке показала линейную, но слабо выраженную функцию

зависимости инфекционности от концентрации компонента. Коэффициент статистической значимости аппроксимации компонентов ( $R^2$ ) показывает степень соответствия значений к прямой линии тренда. По результатам экспериментов можно сказать, что при проверке биологической активности компонентов при совместной экспозиции зараженных вирусом клеток с тестируемыми компонентами дополнительной ингибирующей активности веществ в отношении вируса не обнаружено.

При проверке 50%-го цитотоксического действия (CC50) химически чистых компонентов, идентифицированных из экстракта *T. chebula*, получены следующие результаты (Рисунок 10). Как видно из графиков, наибольшим цитотоксическим действием обладал пуникалагин в концентрации 0,02 мг/мл. Следующим по возрастанию токсического действия на клетки идет корилагин (0,05 мг/мл), и наименее цитотоксическим компонентом для клеток оказался компонент тригаллоил глюкоза (0,5 мг/мл).

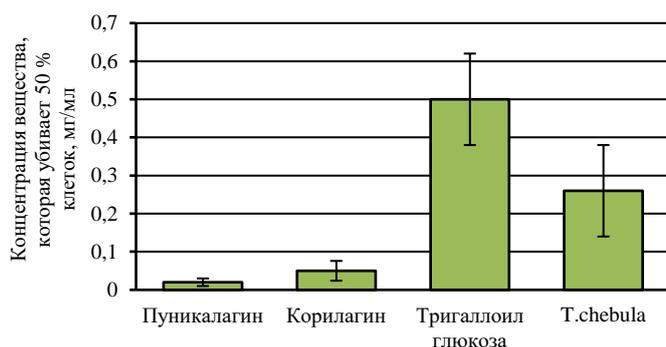


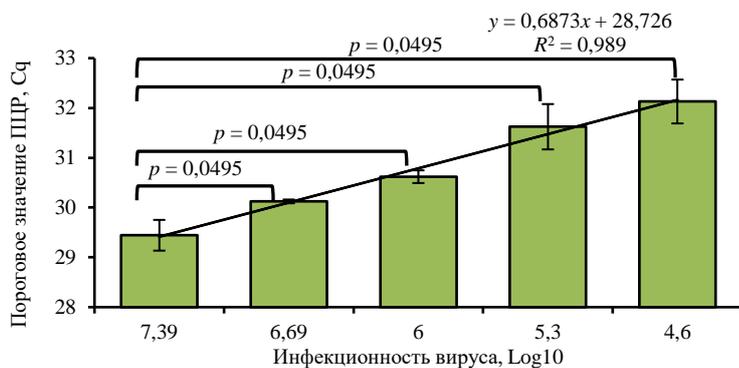
Рисунок 10 – Значения CC50 (мг/мл) химически чистых компонентов: пуникалагина, корилагина и тригаллоил глюкозы. Экстракт *T. chebula* с концентрацией 1 мг/мл. Планки погрешностей отражают стандартное отклонение по результатам трех независимых воспроизведений

Для каждого идентифицированного химического компонента определен индекс селективности. Он рассчитывается отношением концентрации 50%-го цитотоксического действия компонента на клетки к его концентрации 50%-го эффективного действия на вирус. Сравнение индексов селективности идентифицированных вирулицидных молекул к ВКЭ показало, что наиболее перспективным является применение тригаллоил глюкозы с индексом селективности 55,5. Следующим по соотношению цитотоксичность/вирулицидность вируса является пуникалагин с индексом 29; корилагин показал наименьший индекс селективности – 25.

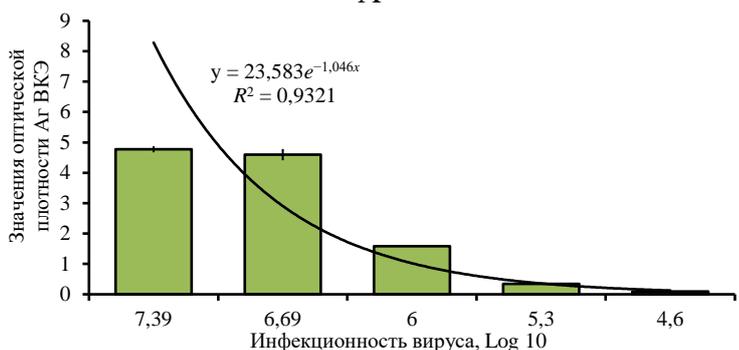
**Аптамеры.** Нарботанный оцДНК-аптамер после 8-го раунда проверен на аффинность к вирусу клещевого энцефалита. Суспензия 1 мл вируса клещевого энцефалита очищена и сконцентрирована до объема ~150 мкл, который использовался для оценки аффинности пула аптамеров. Раститровка ВКЭ прикреплялась к планшету (тест-система «АГКЭ», Вектор-Бест, Новосибирск) через иммобилизованные иммуноглобулины G. Раститровка вируса была поставлена в повторе для подтверждения иммобилизации вирусных частиц в лунки тестируемого планшета. Концентрация инфекционного вируса, внесенная в одну реакционную лунку в трех повторах, имела следующие значения ( $\lg_{10}$  БОЕ/мл): 1 – 7,39; 2 – 6,69; 3 – 6; 4 – 5,3; 5 – 4,6. Для контроля иммобилизации вирусных частиц проведена оценка количества антигеновых детерминант ВКЭ в повторах на тест-системе «АГКЭ» (Вектор-Бест, Новосибирск), согласно инструкции. Для этого вирус инкубировали в течение 1 часа на термошейкере на 400 об./мин при температуре 26 °С. После этого лунки промывали 5 раз 400 мкл буфера для промывок. Добавляли 100 мкл раствора конъюгата. После проводили инкубацию в течение 1 часа на термошейкере на 400 об./мин при температуре 26 °С (PST-60HL Plus, Biosan, Латвия). Затем лунки промывали 5 раз 400 мкл буфера для промывок. Далее вносили 100 мкл раствора тетраметилбензидина. Оставляли в темном месте на 25 минут при комнатной температуре. Добавляли 100 мкл стоп-реагента, проводили учет значений ОП на спектрофотометре Immunochem 2100 (High Technology Inc., США) при длине волны 450 нм.

Экспериментальные лунки с иммобилизованным вирусом инкубировали с подготовленным пулом оцДНК-аптамеров в концентрации 5 нг/мкл (Qubit 4.0, Thermo Fisher

Scientific, США). По завершении инкубации лунки с вирусом и аптамером промывали 400 мкл буфера для промывки 15 раз, после чего проводили выделение нуклеиновых кислот с помощью набора для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва). Выделенные образцы служили матрицей в ПЦР. Детекция накопления ампликона проводилась в режиме реального времени на амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad, США) с детекцией интеркалирующего красителя SYBR Green (США). Концентрацию аптамера считали как прямую обратную зависимость от порогового значения специфической ПЦР (Cq). В результате проверки получен следующий набор данных, который представлен в виде диаграммы (Рисунок 11А).



А



Б

Рисунок 11 – Диаграмма зависимости концентрации аптамеров (Cq) от концентрации иммобилизованного вируса клещевого энцефалита на полистероловый планшет (А), диаграмма зависимости контроля антигенных детерминант ВКЭ от концентрации иммобилизованного вируса клещевого энцефалита на полистероловый планшет (Б)

Как видно из графика, с ростом концентрации инфекционных вирусных частиц в лунке снижается пороговое значение ПЦР, что означает нарастание концентрации аптамеров. Нами отмечена обратная пропорциональная зависимость концентрации аптамера, выделенного из лунок полистеролового планшета, от концентрации вирусных частиц, иммобилизованных на планшет. Так, коэффициент корреляции по Пирсону составил  $r = 0,98$ .

Контроль иммобилизации ВКЭ показал логарифмическую зависимость значения антигенных детерминант от концентрации иммобилизованного вируса в лунки планшета. В результате наблюдается прямая корреляция; коэффициент корреляции по Пирсону составил  $r = 0,93$  (Рисунок 11Б).

Результаты секвенирования последовательностей пула аптамеров после 8-го раунда отбора представлены в Таблице 1. Нами получено 16 клонов аптамеров. По своей структуре все представленные последовательности разнородны. Общих структур или последовательностей внутри центрального региона аптамера не выявлено. У большинства секвенированных последовательностей количество нуклеотидных оснований внутри центрального региона сохранилось (40 пар нуклеотидов (п. н.)). При этом у двух клонов (№ 3 и № 6) центральный регион составил 39 п. н. Еще у одного клона (№ 12) центральный регион составил 37 п. н. Праймерные регионы всех аптамеров остались неизменными, как и у исходной библиотеки аптамеров.

Таблица 1 – Номера и структура секвенированных аптамеров после завершения отбора к вирусу клещевого энцефалита

Номер	Структура
1	CGTGGTTACAGTCAGAGGAGCCATCCAAGTGTGATTCAAATTTAATGTTACCCATAAGTTGCA TAGGTAGTCCAGAAGCC
2	GGCTTCTGGACTACCTATGCGCTTATGTAATAATATCCCTTGAGAGTTAAATGGTTATTATCGTG GTTACAGTCAGAGGAG
3	GGCTTCTGGACTACCTATGCGTTCAACTTTTGCAGCAACAAAATACATACGGCATACTACCGTG GTTACAGTCAGAGGAG
4	CGTGGTTACAGTCAGAGGAGTGTGTTTCATTTCTTAGAGAGCTGTTACCACAATAGTCAGCATA GGTAGTCCAGAAGCC
5	CTCCTCTGACTGTAACCACGGGCTAAAATCATAAGCTCCGTGCAGGCACTTAAGGAAGGTGCA TAGGTAGTCCAGAAGCC
6	GGCTTCTGGACTACCTATGCTAATGTACGAACAAAACTTAATAGAAGTCCATCTCATACGT GGTACAGTCAGAGGAG
7	CTCCTCTGACTGTAACCACGAAATACTGCTGATCGGTGGTGGGGGGGTGTGGTGAGATAAGCA TAGGTAGTCCAGAAGCC
8	CTCCTCTGACTGTAACCACGATATATTGTAATGTTGGCAAGTGTTTTATTTTTTGTACGCATAG GTAGTCCAGAAGCC
9	CTCCTCTGACTGTAACCACGCATAGGTAGTCCAGAAGCCACCTCCTCTGACTGTGGCCACGCAT AGGTAGTCCAGAAGCC
10	CTCCTCTGACTGTAACCACGGATGGTGTGACATTTTGCCGAGTTAGCTTCTATAATTGCAGCAT AGGTAGTCCAGAAGCC
11	CTCCTCTGACTGTAACCACGTAGGTCCGGGGGGGGTGGGTGTGGAGGACAGTGAGTTACTGCA TAGGTAGTCCAGAAGCC
12	CTCCTCTGACTGTAACCACGCATAGGTAGTCCAGAAACCATCTCCTCTGACTGTAACCTACGCAT AGGTAGTCCAGAAGCC
13	CTCCTCTGACTGTAACCACGAGTTGATGGACCATATATAAATATTCTCGATCTTATAAGAGCAT AGGTAGTCCAGAAGCC
14	CTCCTCTGACTGTAACCACGGGATTTTGTATTTGTGGGATTTTATTGGGGGATCGTAGCATAGG TAGTCCAGAAGCC
15	CTCCTCTGACTGTAACCACGGCACAATATAACTAAACATAATTCTGAACCCCTGACTGTAAGCA TAGGTAGTCCAGAAGCC
16	CTCCTCTGACTGTAACCACGCATAGGTAGTCCAGAAGCCATCTCCTCTGACTGTAACCACGCAT AGGTAGTCCAGAAGCC

Нами выбраны четыре последовательности аптамера, которые были проверены на вирулицидную активность в отношении вируса клещевого энцефалита. Результаты проверки не выявили прямого вирулицидного действия в отношении ВКЭ (Рисунок 12).

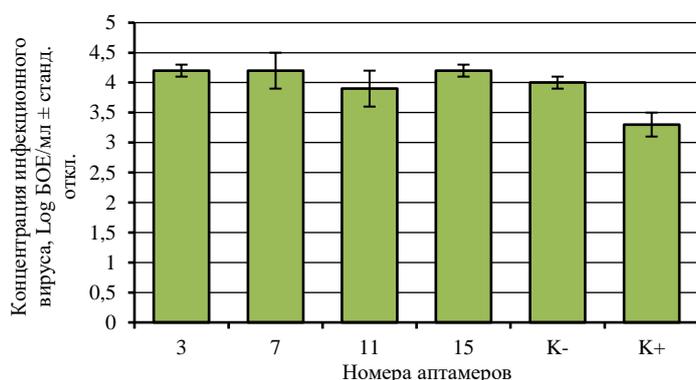


Рисунок 12 – Значения прямого вирулицидного действия на ВКЭ аптамерами 3, 7, 11, 15; diH<sub>2</sub>O (K<sup>-</sup>), иммуноглобулин G (K<sup>+</sup>). Планки погрешностей отражают стандартное отклонение по результатам трех независимых воспроизведений

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проверки шести водных экстрактов лекарственных растений нами обнаружено, что три экстракта (*H. erectum*, *P. bistorta*, *T. chebula*) показали прямое вирулицидное действие на изолят 92М вируса клещевого энцефалита в опытах на культуре клеток СПЭВ. При сравнительном анализе прямого вирулицидного действия активных экстрактов определено,

что водный экстракт *T. chebula* является наиболее эффективным ингибитором вируса. Экстракт *T. chebula* стал приоритетным экстрактом в идентификации активных компонентов.

С помощью метода ВЭЖХ было проведено фракционирование водного экстракта *T. chebula*. Результаты проверки прямого вирулицидного действия фракций позволили выделить наиболее активные фракции для масс-спектрометрического исследования. Анализ распределения компонентов в выделенных фракциях позволил определить три потенциальных противовирусных вещества – корилагин (633,1), тригаллоил глюкозу (635) и пуникалагин (1083,1). Химически чистые компоненты трех идентифицированных веществ (корилагин, тригаллоил глюкоза, пуникалагин) показали статистически значимую прямую вирулицидную активность против ВКЭ в опытах на культуре клеток СПЭВ.

В литературных источниках найдена информация о противовирусной активности двух компонентов, выделенных из *T. chebula* (харитаки, хебула, терминалия), – хебулиевой кислоты и пуникалагина [Lin L. T. et al., 2013]. Показано, что эти вещества способны инактивировать свободные частицы вируса Денге. Активность данных компонентов в экспериментах оказывала влияние на процессы прикрепления и слияния вируса с клеткой в ранние стадии проникновения вируса. Не исключено, что механизм вирулицидного действия пуникалагина, обнаруженного в наших экспериментах для ВКЭ и описанного авторами из статьи для вируса Денге, является общим.

Проверка концентрации СС50 компонентов показала, что наименьшим цитотоксическим действием обладала тригаллоил глюкоза. Однако при проверке значений ЕС50 она также показала наименьшее вирулицидное действие в отношении ВКЭ. Чуть большую вирулицидную активность проявил корилагин, при этом он показал и большее цитотоксическое действие на культуру клеток, чем тригаллоил глюкоза. Наибольшее прямое вирулицидное действие среди обнаруженных веществ показал пуникалагин, при этом он обладал наибольшим цитотоксическим действием на культуру клеток. При дополнительной проверке пуникалагин и корилагин показали возможность их применения в условиях ко-инкубации с зараженной вирусом культурой клеток СПЭВ. Дополнительного ингибирующего действия на вирус активными компонентами при ко-инкубации с зараженной культурой не выявлено. Данное наблюдение может указывать на то, что обнаруженные компоненты обладают преимущественно прямым вирулицидным действием на вирусные частицы, а не на его внутриклеточную стадию развития.

Сравнение индексов селективности идентифицированных вирулицидных молекул к ВКЭ показало, что наиболее перспективным является применение тригаллоил глюкозы с индексом селективности 55,5. Следующим по соотношению цитотоксичность/вирулицидность вируса является пуникалагин с индексом 29; корилагин показал наименьший индекс селективности – 25.

В результате изучения противовирусных свойств шести растительных экстрактов идентифицированы три химических компонента. Кандидатные вещества проверены и охарактеризованы на прямое вирулицидное действие. Наибольшую прямую вирулицидную активность на ВКЭ показал пуникалагин. Таким образом, три идентифицированных компонента из водного экстракта *T. chebula* могут стать основой для создания новых противовирусных препаратов к вирусу клещевого энцефалита. Требуется дальнейшие работы по исследованию противовирусного действия компонентов на модели живых организмов.

В ходе работы проведено восемь раундов специфического отбора ДНК-аптамеров методом SELEX на вирусные частицы клещевого энцефалита. Проверка аффинности пула аптамеров показала, что одноцепочечные аптамеры способны связываться с частицами вируса клещевого энцефалита. Селектированный пул аптамеров был успешно клонирован. Полученные клоны аптамеров секвенированы по Сенгеру. Анализ последовательностей не позволил выделить аптамеры, которые были представлены в нескольких копиях. Выделить повторяющиеся элементы среди отсеквенированных клонов аптамеров также не удалось. Одноцепочечные фрагменты от четырех последовательностей аптамеров выбраны для проверки возможного вирулицидного действия. К сожалению, при проверке прямого

вирулицидного действия ДНК-аптамеров против вируса клещевого энцефалита не обнаружено. При этом разработанный нами метод получения ДНК-аптамеров к вирусным частицам применим для других вирусных инфекций.

## ВЫВОДЫ

1. На основе составленной панели перспективных лекарственных растений (*G. decumbens*, *H. erectum*, *T. chebula*, *P. bistorta*, *M. cochichinensis*, *S. baicalensis*) доказано, что водные экстракты трех лекарственных растений – *H. erectum*, *P. bistorta* и *T. chebula* – проявляют достоверное вирулицидное действие против вируса клещевого энцефалита в экспериментах на культуре клеток СПЭВ.

2. Разработанная методика анализа многокомпонентных растительных экстрактов в микрообъемах позволяет оценить противовирусное действие экстракта, фракционировать компоненты смеси и идентифицировать биологически активные вещества в составе экстракта. Полученные данные о вирулицидной активности водных экстрактов *H. erectum* и *P. bistorta* могут послужить источниками для идентификации новых противовирусных компонентов к вирусу клещевого энцефалита.

3. С помощью метода хромато-масс-спектрометрического анализа вирулицидных фракций экстракта *T. chebula* идентифицированы кандидатные вещества, обуславливающие ингибирующие свойства экстракта: корилагин, тригаллоил глюкоза и пуникалагин.

4. Установлено, что чистые препараты корилагина, тригаллоил глюкозы и пуникалагина в разной степени обладают вирулицидной активностью в отношении вируса клещевого энцефалита. Идентифицированные в ходе работы гидролизуемые танины являются перспективными для дальнейшей разработки новых противовирусных средств в отношении вируса клещевого энцефалита. При этом наиболее активным противовирусным действием обладает пуникалагин.

5. Показано, что использованный метод отбора SELEX к вирусу клещевого энцефалита с помощью фильтрационных колонок Vivaspin делает возможной селекцию аффинных ДНК-аптамеров.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### В научных журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. Obtaining aptamers to a fragment of surface protein E of tick-borne encephalitis virus / I. G. Kondratov, U. V. Potapova, **I. S. Solovarov** [et al.] // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – 2013. – Vol. 448, № 1. – P. 19–21.

2. Получение аптамеров к фрагменту поверхностного белка E вируса клещевого энцефалита / И. Г. Кондратов, М. А. Хаснатинов, **И. С. Соловаров** [и др.] // Доклады Академии наук. – 2013. – Т. 448, № 3. – С. 355.

3. Антивирусная активность экстрактов трав против вируса клещевого энцефалита (обзор литературы) / **И. С. Соловаров**, М. А. Хаснатинов, А. В. Ляпунов [и др.] // *Acta biomedica scientifica*. – 2017. – Т. 2, № 5-1 (117). – С. 93–99.

4. Оценка вируснейтрализующих свойств ДНК-аптамеров и экстрактов лекарственных растений в отношении вируса клещевого энцефалита / **И. С. Соловаров**, М. А. Хаснатинов, Г. А. Данчинова [и др.] // *Acta biomedica scientifica*. – 2017. – Т. 2, № 1 (113). – С. 84–88.

5. Fractionating the plant extract in mini volumes to purify the potential antivirals from *Terminalia chebula* / **I. S. Solovarov**, М. А. Khasnatinov, Т. А. Shishlyannikova [et al.] // *International Journal of Biomedicine*. – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 57–60.

6. Разработка подходов к селекции ДНК-аптамеров на основе мембранной ультрафильтрации комплекса аптамер – мишень / **И. С. Соловаров**, М. А. Хаснатинов, Н. А. Ляпунова, И. Г. Кондратов, Г. А. Данчинова // *Acta biomedica scientifica*. – 2022. – Т. 7, № 7 (6). – С. 119–127.

### Публикации в иных изданиях

1. Разработка технологии поиска новых потенциальных противовирусных средств в растительных экстрактах / **И. С. Соловаров**, М. А. Хаснатинов, Г. А. Шишлянникова [и др.] // Перспективы развития биомедицинских технологий в Байкальском регионе : Сборник тезисов Международной научной конференции. – 2019. – С. 94–95.

2. **Соловаров, И. С.** Поиск и идентификация противовирусных молекул из *Terminalia chebula* к вирусу клещевого энцефалита / **И. С. Соловаров**, М. А. Хаснатинов, Г. А. Данчинова // Национальные приоритеты России. – 2021. – № 3 (42). – С. 272–275.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

CC50	– 50%-я цитотоксичность препарата (50 % cytotoxicity concentration)
diH <sub>2</sub> O	– деионизованная вода
EC50	– 50%-я эффективная концентрация (50 % effective concentration)
SELEX	– систематическая эволюция лигандов при экспоненциальном обогащении (systematic evolution of ligands by exponential enrichment)
БОЕ	– бляшкообразующая единица
ВКЭ	– вирус клещевого энцефалита
ВЭЖХ	– высокоэффективная жидкостная хроматография
дцДНК	– двуцепочечная дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
КЭ	– клещевой энцефалит
н. о.	– нуклеотидные основания
ОП	– оптическая плотность
оцДНК	– одноцепочечная дезоксирибонуклеиновая кислота
п. н.	– пары нуклеотидов
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РНК	– рибонуклеиновая кислота
ФСБ	– фосфатно-солевой буфер

---

Подписано в печать 25.01.2024. Бумага офсетная. Формат 60×84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>.

Гарнитура Таймс. Усл. печ. л. 1,0

Тираж 100 экз. Заказ № ###-##.

---

РИО ИНЦХТ

(Иркутск, ул. Борцов Революции, 1. Тел. 29-03-37. E-mail: arleon58@gmail.com)