

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРОБЛЕМ
ЗДОРОВЬЯ СЕМЬИ И РЕПРОДУКЦИИ ЧЕЛОВЕКА»
(ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ)

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
Хаснатинов М.А.

Иркутск – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Вирус клещевого энцефалита	15
1.1.1 Строение вириона и цикл репликации вируса клещевого энцефалита	20
1.1.2 Белок Е вируса клещевого энцефалита	28
1.1.3 Современные средства лечения, профилактики и контроля клещевого энцефалита.....	31
1.1.4 Потенциальные молекулы-ингибиторы вируса клещевого энцефалита	36
1.2 Лекарственные средства на основе растений	39
1.2.1 Биологические активные вещества, синтезируемые растениями.....	41
1.2.2 Противовирусные биологически активные вещества на основе растительных источников.....	43
1.2.3 Опасения, связанные с применением растительных источников	48
1.2.4 Получение лекарственных средств из растений	51
1.3 Аптамеры	57
1.3.1 Современное состояние изучения аптамеров	57
1.3.2 Отбор аптамеров (SELEX).....	64
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	68
2.1 Материалы	68
2.2 Методы.....	69
2.2.1 Проведение жидкостной хроматографии.....	69
2.2.2 Проведение высокоэффективной жидкостной хроматографии/ масс-спектрометрии	70

2.2.3	Определение инфекционной активности вируса по бляшкообразующим единицам	71
2.2.4	Оценка индекса вирулицидности	72
2.2.5	Определение цитотоксического действия проб на культуру клеток.....	72
2.2.6	Сравнение ингибирования веществ при ко-инкубации с зараженной культурой клеток	73
2.2.7	Проведение отбора ДНК-аптамеров (SELEX)	74
2.2.8	Клонирование и секвенирование библиотеки аптамеров	77
2.2.9	Оценка вирулицидной активности последовательностей аптамеров к вирусу клещевого энцефалита	78
2.2.10	Статистическая обработка данных	79
ГЛАВА 3 ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА ЭКСТРАКТОВ		80
3.1	Прямое вирулицидное действие растительных экстрактов	80
3.2	Панель вирулицидного действия фракций после хроматографического разделения	81
3.3	Анализ спектра масс вирулицидных фракций после жидкостной хроматографии	83
3.4	Анализ спектра масс вирулицидных фракций после высокоэффективной жидкостной хроматографии	85
ГЛАВА 4 ПРОВЕРКА ВИРУЛИЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ АПТАМЕРОВ И СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ <i>T. CHEBULA</i>		100
ЗАКЛЮЧЕНИЕ		110
ВЫВОДЫ		113
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ		114
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....		117

ВВЕДЕНИЕ

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 30 лет. Произошло расширение зон риска заболевания, а также обнаружены новые очаги [339]. 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 (ЦНС), однако полностью механизмы проникновения вируса в мозг остаются не выясненными [314, 359].

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 их выделяют из крови иммунизированных людей, вследствие чего препараты могут вызывать анафилактические реакции и антителозависимое усиление инфекции [22, 33, 49]. Кроме того, введение иммуноглобулинов считается эффективным только в первые 1–3 дня от начала заболевания [4, 5]. Наряду с этим существует и повышенный риск заражения неопределяемыми патогенами от сывороточного иммуноглобулина против КЭ [5]. Поэтому разработка новых средств надежной и специфической терапии КЭ является актуальнейшей задачей фундаментальной и прикладной науки [35, 37]. 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 [164, 208], вируса герпеса [336], вируса гепатита С [216], а также вирусов гриппа А [111, 346] 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 [55, 203, 218]. Такие фрагменты получили название ДНК-аптамеров [93, 152, 329]. Позднее исследователями были получены аптамеры, способные к связыванию и ингибированию вирусных агентов [134, 143]. Константы связывания аптамеров с белками сравнимы или выше, чем константы связывания антигенов с антителами, поэтому аптамеры часто называют ДНК-аналогами антител [89, 90]. При этом ДНК-аптамеры могут быть модифицированы введением флуоресцентных меток без изменения аффинных свойств [296]. Эти свойства аптамеров позволяют создавать на их основе новые специфические препараты для научных исследований, диагностики и терапии вирусных инфекций [217]. Для оценки противовирусной и биомаркерной активности аптамеров в настоящее время используют комплексный подход, сочетающий молекулярные, биохимические и вирусологические методы. На первом этапе производят отбор индивидуальных аптамеров, которые наиболее эффективно связываются с целевыми молекулами. Существует множество различных биохимических или молекулярно-биологических методов обратного скрининга – например,

иммуноферментный анализ связывания целевого антигена с иммобилизованными в 96-луночной планшете аптамерами [59]. 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 [134]. Для оценки связывания аптамеров к ферменту могут применять методы оценки специфической активности фермента после обработки аптамерами и без таковой [143].

В случае аптамеров, получаемых для вирусных молекул-мишеней, часто производится оценка ингибирования биологической активности целевого вируса аптамерами. Высокопродуктивный скрининг библиотек при использовании клеточных культур позволяет детально проанализировать большое количество индивидуальных препаратов аптамеров в короткие сроки. 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; тесты изменения цитотоксического действия вируса; тесты по определению скорости накопления инфекционного вируса при обработке клеток аптамером; тесты способности аптамера блокировать адсорбцию и проникновение вируса в клетку [59, 88, 90, 106, 134, 384].

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 [3, 4, 14, 16, 25, 50, 290, 338]. Описаны клеточные механизмы функционирования вируса, а также генотипические различия, ведущие к различным патологическим процессам у зараженных людей [2, 228, 314, 356]. При этом, несмотря на относительно

глубокую степень изученности вируса, отмечается недостаток надежных и безопасных противовирусных препаратов для лечения и профилактики КЭ [4, 5, 22, 101].

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 [165]. 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 работы

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

Для достижения поставленной цели сформулированы и решены следующие задачи:

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

В результате проведенной работы обнаружено, 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 глюкозу 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 итоге 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 существующих противовирусных средств в профилактике и лечении КЭ.

Методология и методы исследования

В данном исследовании изучалась 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 широкораспространенному сибирскому субтипу вируса [8].

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 [165]. В ходе работы получены данные о прямом вирулицидном действии шести водных растительных экстрактов. На основании полученных индексов ингибирования наиболее активный экстракт был подвергнут фракционированию с помощью методов жидкостной хроматографии с использованием различных подвижных фаз. 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 анализу. 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. В работе также проведено сравнение ингибирующей активности компонентов при обработке зараженной культуры клеток. В заключение 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 [8]. 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 на тест-системе «ВектоВКЭ-антиген» (Вектор-Бест, Новосибирск). 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 плазмидными праймерами. Ампликоны с целевым размером 80 н. о. отсеквенированы 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, иммуоферментный анализ;

- физико-химические – экстрагирование органическими растворителями, жидкостная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография;
- 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 тандемной 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 базе данных 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 учёных «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 в 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.

Благодарности

Автор признателен директору ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ член-корреспонденту РАН, д.м.н., профессору Л.В. Рычковой за предоставление возможности проведения исследований и, в частности, за поддержку исследовательской деятельности молодых ученых научного центра с помощью внутренних грантов «Молодежный проект года». Автор признателен заведующему лаборатории, д.б.н. Данчиновой Г.А. за общее руководство и курирование работы на всех ее этапах. Автор благодарен коллективу лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ за практическую помощь и поддержку в проведении исследований, сотруднику лаборатории персонализированной медицины, оператору масс-спектрометра к.х.н. Бельских А.В. Автор также выражает свою благодарность заведующему кафедрой эпидемиологии ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России д.м.н., профессору А.Д. Ботвинкину и ведущему научному сотруднику зоолого-паразитологического отдела ФКУЗ Иркутского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора д.б.н. А.Я. Никитину за детальный анализ рукописи и дельные замечания.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Вирус клещевого энцефалита

Вирус клещевого энцефалита – природно-очаговая инфекция, характеризующаяся лихорадкой, интоксикацией и поражением серого вещества головного мозга (энцефалит) или оболочек головного и спинного мозга [46, 282]. Открыт и описан ВКЭ в 1937 году известным русским вирусологом Л.А. Зильбером в ходе его экспедиции по Дальнему Востоку [13, 40]. ВКЭ подразделяют на три основных субтипа: Дальневосточный (ДВ-ВКЭ), Сибирский (СИБ-ВКЭ) и Европейский (Е-ВКЭ). Разделение на субтипы ведется в соответствии с генетическими и фенотипическими свойствами вируса [234]. Генетически субтипы ВКЭ очень тесно связаны; отличия в аминокислотной последовательности их полипротеина составляют 5–6 % [319]. Но несмотря на их близкородственную связь, тяжесть протекания и патогенез заболевания при инфицировании разными субтипами вируса могут отличаться [32, 101].

Не так давно предложено выделить ещё два субтипа ВКЭ – «Тибетский» и «Байкальский». Географически «Тибетский» субтип (ТИБ-ВКЭ) описан для северо-восточной части Китая (Тибет), провинция Цинхай. Данный субтип был описан для дикого гималайского сурка. Исследователи утверждают, что данный субтип не может быть отнесен ни к одному из трех выделенных субтипов. Идентичность «Тибетского» субтипа по нуклеотидной последовательности белка Е к другим субтипам составляет 82,6–84,6 %, а по аминокислотной последовательности – 92,7–95,0 % [64].

По-видимому, «Байкальский» субтип вируса клещевого энцефалита является переходной формой вируса от ДВ-ВКЭ субтипа к СИБ-ВКЭ субтипу, который обитает на территории в Восточной Сибири и Монголии. «Байкальский» субтип получил свое название благодаря типовому штамму ВКЭ – 884-86, который выделен вблизи озера Байкал. Филогенетически «Байкальский» субтип

ближе к ДВ-ВКЭ субтипу, однако маркерная замена аминокислоты лейцина в 206 положении белка E позволяет отнести его к СИБ-ВКЭ субтипу [10, 24, 223].

Основным резервуаром, поддерживающим существование возбудителя в природе, являются иксодовые клещи – *Ixodes persulcatus* (преимущественно в азиатском регионе России) [47] и *Ixodes ricinus* (преимущественно в европейском регионе) [228]. Значительно меньшую роль в распространении и поддержании ВКЭ играют клещи рода *Dermacentor*. На территории Японии ВКЭ обнаружен в клещах *Ixodes ovatus* [213]. Так как распространение вируса напрямую коррелирует с распространением его главного переносчика – клещей, случаи заражения клещевым энцефалитом не регистрируются в тропиках и южном полушарии.

Главными прокормителями личинок и нимф являются грызуны, такие как красная полевка, бурозубка, красно-серая полевка, азиатская мышь и другие [21]. От клещей вирус может передаваться более чем 130 видам различных диких и домашних животных (грызуны, зайцы, насекомоядные, хищники и копытные), а также птицам. Клещи, которые получили вирус от животных-носителей, через укус могут передать его человеку. Для данного вирусного заболевания характерна строгая весенне-летняя сезонность, поскольку она напрямую связана с активностью и их главных переносчиков – клещей. После укуса клеща вирус проходит первичную репродукцию в макрофагах и гистиоцитах, далее он подвергается вторичной репродукции в региональных лимфоузлах, клетках печени, селезенки и эндотелия сосудов и в конечном итоге может попасть в двигательные нейроны передних рогов шейного отдела спинного мозга, клетки мозжечка и мягкой оболочки [356].

Передача вируса КЭ возможна при совместном питании от одного клеща другому, даже в отсутствие вирусемии у животного-прокормителя [1]. Данный тип передачи вируса называется транспитиальной передачей. Такой тип питания объясняет возможность передачи вируса другим субтипам иксодовых клещей, а также клещам других родов. Считается, что несистемная передача ВКЭ через совместное питание является основным путем поддержания вируса, циркулирующего в природных очагах [186]. Также описаны трансвариальная

передача ВКЭ [138, 155] и невероятическая передача от одного поколения к следующему [200, 253, 362]. Трансовариальный тип передачи показан на личинках, которые не успели напитаться, но несли в себе ВКЭ от самок, содержащих вирус [286]. Позднее показано, что такой тип передачи вируса для поддержания его циркуляции в природе не является основным [337]. В случае же приобретения клещом вируса клещевого энцефалита (заражения), он остается его носителем до конца его жизни [114]. Известны случаи передачи ВКЭ через переливание крови [382] и кормление грудью [378].

Еще одним способом заражения ВКЭ человека может быть употребление непастеризованного молока зараженных вирусом животных [261, 360]. Это периодически подтверждается эпизоотическими вспышками от употребления непастеризованных сыров и молока коров, коз и овец в разных странах на территории Европы [261]. Такие случаи алиментарной передачи вируса описаны для Австрии, Чехии, Словакии, Германии, Словении, Польши и России [58, 219, 263, 353, 354, 357]. Данные факты заражения подтверждаются обнаружением иммуноглобулинов М и G против ВКЭ в сыворотке крови и в цереброспинальной жидкости [83]. Еще одно подтверждение такого пути передачи подкреплено данными о способности ВКЭ сохранять свою инфекционность после инкубации вирусных частиц в низком рН желудочного сока [281]. Алиментарный путь заражения вирусом считается незначительным для поддержания циркуляции вируса в природе. Однако населению, которое ведет домашнее хозяйство вблизи потенциальных природно-очаговых источников ВКЭ, следует иметь в виду такой способ передачи заболевания, для того чтобы обезопасить свое здоровье, а также ограничить возможные вспышки инфекции.

Клещи обычно паразитируют на любом млекопитающем или птицах, которые встречаются на их пути, однако взрослые особи предпочитают больших животных, таких как олени или крупный рогатый скот [17, 242]. Как правило, ВКЭ в грызунах имеет кратковременную системную инфекцию [293]. При этом небольшие дикие млекопитающие способны поддерживать стойкое наличие в них вируса в течение года [246].

В природных очагах вирус может циркулировать между клещами-переносчиками и некоторыми их хозяевами, в основном мелкими млекопитающими, такими как грызуны и насекомоядные. Основным же компетентным резервуарным хозяином считаются мелкие млекопитающие [358]. Более крупные млекопитающие, такие как овцы и крупный рогатый скот или люди, являются случайными хозяевами, поскольку у них развивается лишь кратковременная виремия с низкими вирусными титрами, а порой и с отсутствием виремии. Как следствие, они не участвуют в полной мере в поддержании и распространении вируса в природе [272].

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), ежегодно регистрируется около 10000–12000 клинических случаев заболевания клещевым энцефалитом на территории Европы и Азии [392]. Считается, что эта цифра ниже фактической общего числа клинических случаев. В связи с увеличением туристических потоков наблюдается тенденция увеличения числа обращений с КЭ в эндемичных ареалах Европы и Азии, а также расширения ареала инфекции за пределы определенных для нее ранее границ [25, 101, 102, 313, 338]. К сожалению, на данный момент эта проблема может быть решена только с помощью вакцинации [101, 327].

Несмотря на тренды снижения заболеваемости КЭ в последние годы, на сегодняшний день признано, что эпидемиологическая ситуация по вирусу клещевого энцефалита в Российской Федерации остается неблагоприятной, поскольку меры специфической профилактики по сравнению с прошлыми годами сильно не изменились в качественном и объемном отношении. При этом площадь акарицидных работ на территории РФ по снижению численности клещей за последнее время увеличилось. За 2019 год число зараженных КЭ людей составило 1559 человек, что в пересчете в относительных показателях соответствует 1,02 случая на 100 тыс. населения [34]. С момента открытия вируса и выделения КЭ в самостоятельную патологию прошло уже более 80 лет, но проблема профилактики и лечения данного заболевания остается актуальной и до настоящего времени, что требует проведения интенсивных исследований в этом направлении.

Инфекционное заболевание – **клещевой энцефалит**, – вызываемое вирусом клещевого энцефалита, может привести к различной степени тяжести неврологическим нарушениям, к психиатрическим осложнениям (слабоумие), а в более тяжелых случаях течения даже к смерти зараженного человека [15, 184]. В основном клинические проявления КЭ разнообразны и определяются свойствами возбудителя и особенностями иммунной реакции человека. Как правило, это проявление симптомов интоксикации с лихорадочным синдромом, а также с симптоматикой поражения периферической и центральной нервной системы [124]. Детали процесса и механизмы повреждения мозга вирусом клещевого энцефалита остаются до конца не раскрытыми [21]. Примерное количество летальных исходов от КЭ для субтипов составляют: Европейский субтип – 1–2 %; Сибирский субтип – не более 8 %; Дальневосточный субтип – редко более 20 % [164, 184, 219, 228, 358]. Показано, что как высокой, так и низкой вирулентностью могут обладать штаммы всех субтипов ВКЭ [7, 30, 41].

Высокая степень вариабельности анатомической локализации клещевого энцефалита может приводить к огромному полиморфизму клинических симптомов. Поэтому до настоящего времени нет общепризнанной классификации клещевого энцефалита. Однако существуют классификации КЭ по форме, степени тяжести болезни и характеристике течения заболевания [4, 12, 29, 51, 52]. По степени тяжести клещевой энцефалит делят на стертый, легкий, средней тяжести и тяжелый. По форме КЭ выделяют инаппаратную, лихорадочную, менингеальную, менингоэнцефалитическую, полиомиелитическую и полирадикулоневритическую формы [6, 23, 27, 53]. По характеристике течения КЭ могут выделять: острое, двухволновое, хроническое и прогрессивное течения [31]. Инкубационный период при клещевом энцефалите может варьировать от 1 до 68 суток [40]. Иммуноглобулины М появляются после заражения вирусом в первую неделю и могут сохраняться в крови до 10 месяцев [4]. Иммуноглобулины G обнаруживаются в крови больного на 7–14-й день после заражения и могут сохраняться в максимальном значении до двух месяцев [41].

1.1.1 Структура вириона и цикл репликации вируса клещевого энцефалита

Вирус клещевого энцефалита – вирус семейства Флавивирусов (Flaviviridae), который, согласно Международному комитету по таксономии вирусов (ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses), состоит из 4 родов – это Флавивирусы (Flavivirus, 53 вида), Пестивирусы (Pestivirus, 11 видов), Пегивирусы (Pegivirus, 11 видов) и (Hepacivirus, 14 видов). Наиболее известными представителями данного семейства являются: вирус желтой лихорадки, вирус японского и клещевого энцефалита, вирус Зика, вирус лихорадки Денге и вирус гепатита С [110, 133, 227]. Данное семейство вирусов характеризуется способностью вызывать различные поражения нервной системы – от эфемерной лихорадки до геморрагической лихорадки и энцефалитов. Геном вируса клещевого энцефалита кодирует 3 структурных белка (С, рМ и Е) и 7 неструктурных белков (NS1, NS2А, NS2В, NS3, NS4А, NS4В и NS5) [228]. Вирусная частица представляет собой капсид – икосаэдр диаметром 50 нанометров. Вирионы флавивирусов представляют собой наночастицы, состоящие всего из трех структурных белков – белка С (капсидный), белка М (мембранный) и белка Е (поверхностный), а также из молекулы РНК вируса, упакованной внутри вирусной частицы. Геном вируса клещевого энцефалита представляет собой одноцепочечную РНК положительной полярности, размером в среднем около 11 тысяч пар нуклеотидов и кодирует один полипротеин длиной 3414 аминокислот. Молекула РНК вируса сама по себе может запускать производство потомства (вирусных частиц), если будет помещена в чувствительные (восприимчивые) клетки [206]. Вирусный полипротеин подвергается в клетке хозяина посттрансляционному процессингу с образованием 10 индивидуальных белков, представленных на рисунке 1 [104].

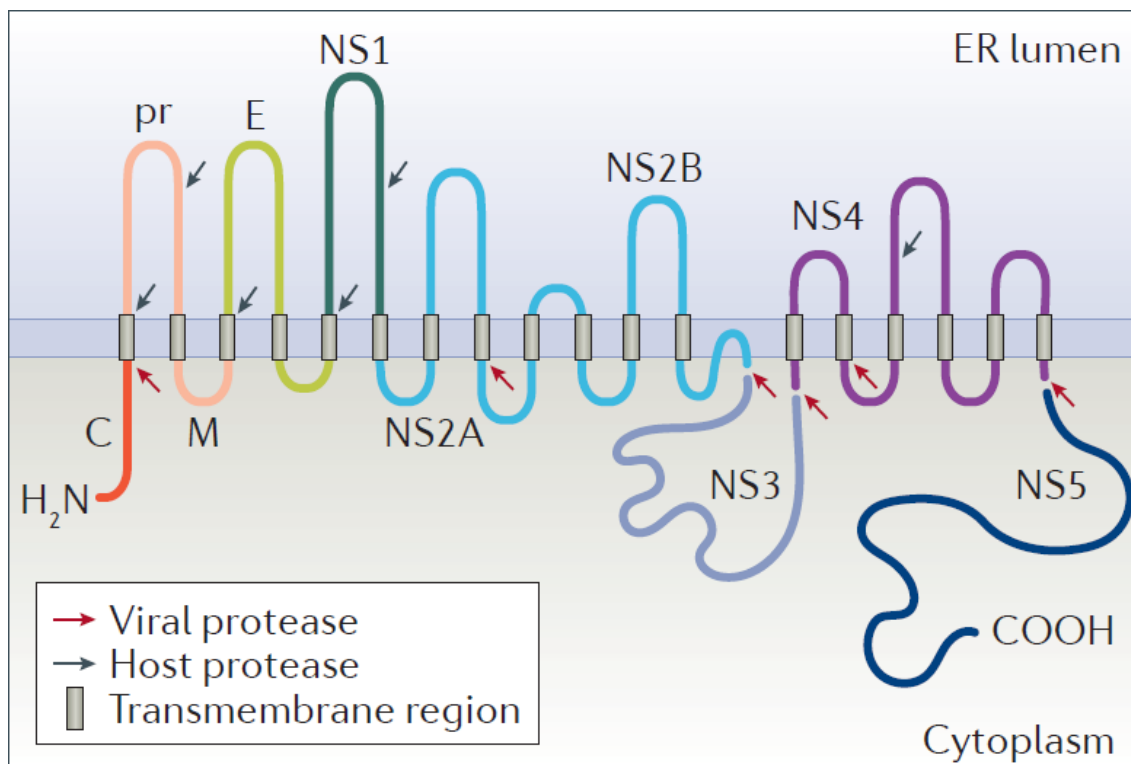


Рисунок 1 – Схема организации вирусного полипротеина флавивирусов на мембране эндоплазматического ретикулума с указанием сайтов расщепления протеаз хозяина и вируса [104]

Молекулярный вес структурных белков E, C и M составляет 55, 15 и 8 соответственно. Идентичность аминокислотных последовательностей белка E между субтипами ВКЭ составляет от 95 до 98 % [64]. Вирусный нуклеокапсид окружен билипидным слоем, в который встроены два гликопротеина – поверхностный E и мембранный M. Два белка E и два белка M формируют гетеротетрамер, который является строительным блоком поверхности вириона [335].

Основные этапы жизненного цикла вируса клещевого энцефалита хорошо изучены, хотя и в меньшей степени, чем для других флавивирусов [199, 236, 326, 331, 347]. При этом надо учитывать, что основной массив данных получен в экспериментах на клетках млекопитающих, хотя центральной частью биологического цикла вируса являются клетки клещей. Процесс проникновения флавивирусов происходит в основном через рецептор-опосредованный эндоцитоз;

возможно проникновение и через микропиноцитоз [69, 147]. Достоверно не определено, какие рецепторы выполняют главную роль в проникновении вируса, однако существует несколько предположений. Так, предложены два основных кандидата в рецепторы для клеток млекопитающих – ламинин-связывающий белок и интегрин $\alpha V\beta 3$. Однако до сих пор не предложено кандидатов в рецепторы для клеток клещей [135, 177, 197]. Рядом работ показано, что, кроме известных молекул, существуют и другие кандидатные рецепторы, которые могут помогать в прикреплении вируса к поверхности клетки-хозяина [67, 197, 233]. Ряд рецепторов (рецепторы лектина С-типа, фосфатидилсерина, ряд рецепторов муцина и Т-клеточный иммуноглобулин), участвующие в проникновении некоторых флавивирусов, также могут быть задействованы в проникновении ВКЭ [176]. Гепарансульфаты и гликозаминогликаны могут связывать вирус на поверхности клетки, не инициируя эндоцитоз, действуя как фактор прикрепления для множества других вирусов [179, 191, 309]. В опытах на культуре клеток показано, что гликозилирование белка Е является необходимым условием для эффективного проникновения ВКЭ внутрь клетки, а отсутствие гликозилирования приводит к снижению нейроинвазивности в экспериментах на мышах [252]. Эти данные указывают на то, что взаимодействие клеток хозяина с углеводной частью белка Е играет существенную роль в прикреплении вируса. Дополнительно это подтверждается экспериментами по введению мутаций вируса шотландского энцефаломиелита овец по сайтам гликозилирования, что снижает его вирулентность [322].

На сегодня, лектиновый рецептор DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin), известный как CD209, является еще одним рецептором для проникновения ВКЭ. Так, обнаружена связь между частотой встречаемости AA-гомозиготы, А-аллели однонуклеотидного полиморфизма rs2287886 гена *CD209* и тяжестью течения клещевого энцефалита [323]. В редких случаях адсорбцию и помощь в эндоцитозе вирусных частиц в клетки хозяина могут вызывать не нейтрализующие иммуноглобулины G к ВКЭ [274]. Данное явление получило название антител-зависимое усиление инфекции,

которое продемонстрировано *in vitro* для множества флавивирусов [65, 150]. Антител-зависимое усиление происходит через связывание комплекса вирус – антитело с рецепторами Fcγ на поверхности клеток-хозяев. Недавно показано усиление инфекции антителами, не зависящее от рецепторов Fcγ, происходящее за счет взаимодействия петли слияния белка E, которая затем связывается непосредственно с мембраной хозяина [65].

После того, как вирусная частица попала в клетку, вирион локализуется внутри эндоцитарных пузырьков. Снижение уровня pH в эндосоме приводит к серьезным перестройкам вириона [113, 115]. Так, с помощью точечного мутагенеза белка E и криоэлектронной микроскопии показано, что протонирование His323 (и, возможно, His146) является основным механизмом определения pH, хотя и не исключается роль других гистидинов в реконструкции вируса. Со структурной точки зрения, кажется логичным, что протонирование гистидиновых остатков His216 и His248 белка E, а также His7 и His17 белка M будут вызывать их взаимное отталкивание друг от друга, дестабилизируя вирусный гетеротетрамер [333]. Затем с помощью отделения периферических спиралей белка E от мембраны вируса петля слияния встраивается в мембрану эндосомы [94, 116]. После закрепления петли слияния с мембраной белок E тримеризируется посредством взаимодействия петель слияния, образуя структуру, напоминающую шпильку [341]. Получившиеся тримеры слияния стабилизируются посредством взаимодействий с доменами I и II, а также с периферическими и трансмембранными спиральями других субъединиц [234, 348]. Данная цепь событий делает возможным слияние вирусной и эндосомной мембран через прохождение промежуточной стадии гемифузии. В конечном счете, происходит высвобождение нуклеокапсида вируса в цитозоль [329]. Как только нуклеокапсид попадает в цитозоль, он распадается и высвобождает вирусную РНК. События, ведущие к высвобождению вирусной РНК, остаются нераскрытыми, однако диссоциация нуклеокапсида вируса Денге требует неструктивного убиквитинирования [141]. Трансляция вирусной РНК происходит в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) в виде единого

полипротеина, после чего он подвергается расщеплению с помощью вирусных ферментов и ферментов хозяина, с образованием структурных белков, которые образуют новые вирусные частицы и неструктурные белки, которые отвечают за репликацию генома, процессинг полипротеина и модуляцию клеточных функций [175].

Зрелый белок С является растворимым цитоплазматическим белком, который после синтеза отщепляется от мембранного якоря. Белки преМ и Е экспрессируются в просвет эндоплазматического ретикулума и остаются связанными с мембраной с помощью двойных спиральных якорей, что характерно для всех флавивирусов [175]. Отщепление С-концевого якоря от мембраны является последовательным и жестко регулируется. Сначала происходит отщепление от белка С, а уже после отщепляется белок преМ. Нарушение такого порядка расщепления у энцефалитов долины Мюррей, вируса желтой лихорадки и лихорадки Западного Нила приводит к чрезмерному образованию нуклеокапсид дефицитных частиц [60, 128]. Для ВКЭ разобщение данного события влияет только на продукцию частиц в клетках клещей [167].

Первым из неструктурных белков транслируется белок NS1, который локализуется в просвете ЭПР. Этот многофункциональный белок существует в двух формах – димерной и гексамерной. В качестве димера NS1 участвует в репликации, тогда как в качестве гексамера он секретируется совместно с частицами вируса, модулируя систему комплемента клеток млекопитающего, защищая инфицированные клетки от разрушения [295].

Следующим экспрессируется неструктурный белок NS2A, который участвует в репликации и иммуномодуляции. Белок NS2B служит ко-фактором протеазы для NS3 [368]. Комплекс белков NS2B – NS3 обладает как протеазной, так и геликазной активностями и отвечает за опосредованное вирусным ферментом расщепление полипротеина [230]. Хеликазный домен белка NS3 обладает АТФазной активностью, которая регулируется интегральным мембранным белком NS4A [257]. Пептид NS4A, который считается сигнальной последовательностью, отделяется от NS4B, после чего NS4B остается в мембране

ЭПР, где и выполняет множество функций – от образования репликационных комплексов до иммуномодуляции [396].

Репликация генома ВКЭ происходит РНК-зависимой РНК-полимеразой – белком NS5, который также выполняет иммуномодулирующую роль [96]. Репликация протекает в тесном контакте с мембраной ЭПР, которая в значительной степени перестраивается с помощью белков NS1, NS2B, NS4A и NS4B [361, 365]. Такие перестройки в мембране ЭПР наблюдаются в клетках как клещей, так и млекопитающих. Однако скорость репликации в клетках клещей протекает медленней, и, как следствие, в них отмечается меньше вирусных частиц, чем в клетках млекопитающих [205]. Процесс репликации геномов ВКЭ происходит через промежуточную стадию двуцепочечной РНК в инвагинациях ЭПР. В данных углублениях формируются небольшие перешейки, которые соединяются с цитозолем клетки, что делает возможным поступление нуклеотидов, необходимых для синтеза, а также выход новосинтезированных геномов РНК [156, 361, 365].

Синтезированные вирусные геномы покрываются множеством копий белка С, в результате чего образуется нуклеокапсид. Выдвинуто предположение, что нуклеокапсид образуется электростатическими взаимодействиями между С-концевыми α 4-спиралями белка С и вирусной РНК [64, 388]. Это подтверждается экспериментальными работами, которые показывают, что белки С вируса Зика и вируса Денге способны связывать различные типы нуклеиновых кислот независимо от последовательности [64, 202]. Кроме нуклеокапсидов, рекомбинантные димеры белка С вируса Денге связывают двухцепочечную ДНК (дцДНК) различной длины, образуя капсидоподобные частицы [202]. В общем, упаковка геномов всех флавивирусов является надежным процессом, поскольку белки С способны сохранять свои функции, несмотря на крупномасштабные делеции в их структуре [189]. При этом упаковка генома ВКЭ аналогична упаковке геномов других флавивирусов и может осуществляться, несмотря на делеции. Белок С ВКЭ способен связывать нуклеиновые кислоты и формировать капсидоподобные структуры [212]. Поскольку белки С способны

упаковывать РНК независимо от последовательности, следовательно, должно существовать временное и пространственное сцепление процессов репликации, трансляции, сборки и отпочковывания [91].

На сегодняшний день остается неясным, как и каким механизмом регулируется специфическая упаковка вирусных геномов, но существуют косвенные доказательства того, что специфическая упаковка может зависеть от тесной локализации неструктурных белков по отношению к везикулярным структурам и сайтам репликации РНК, которые необходимы в правильной сборке вирусных частиц [56, 310, 372]. Существуют данные, что некоторые белки (хеликаза DDX56) клеток хозяина могут участвовать в процессе продукции частиц вируса Денге и лихорадки Западного Нила [301]. Что касается ВКЭ, то факторы хозяина, которые необходимы для образования вирусных частиц, неизвестны. Напротив, было показано, что один из белков – виперин – предотвращал сборку ВКЭ, формируя неинфекционные частицы, содержащие только белок С и мембрану [380]. После того как нуклеокапсиды собраны, они приобретают свои липидные оболочки за счет почкования в просвете ЭПР. Периодически почкование мембраны может происходить в отсутствие нуклеокапсида, поскольку продукция субвирусных частиц без нуклеокапсида является нормой для флавивирусных инфекций [276]. Компетентные к слиянию субвирусные частицы могут быть получены путем рекомбинантной экспрессии белков ргМ и С в клетках, что подразумевает, что процесс почкования направляется латеральными взаимодействиями этих белков [211].

Образованные почкованием ЭПР незрелые частицы флавивирусов сильно отличаются от зрелых форм. Незрелые частицы ВКЭ немного крупнее зрелых форм, что связано с организацией димеров ргМ–Е белков в тримерные шипы [356]. В незрелых вирусных частицах препептиды от М белка покрывают петли слияния белков Е, тем самым предотвращая преждевременное слияние [328]. Каждый шип стабилизируется взаимодействием препептида и взаимодействием между доменами II и III соседних белков Е. Однако эти связи не очень прочные, что вносит лабильность в незрелые частицы; подобная картина стабилизации

наблюдается и для других флавивирусов [332, 347]. После того, как незрелые частицы формируются путем почкования в ЭПР, они проходят через аппарат Гольджи и сеть транс-Гольджи [175]. В сети транс-Гольджи частицы подвергаются воздействию низкого рН, что приводит к конформационным изменениям тримеров в димеры зрелой частицы. Тем самым шероховатые незрелые частицы переходят в гладкие предварительно зрелые частицы. Единственным отличием от зрелых частиц является только то, что у них все еще сохраняется рг-последовательность от белка М [347]. Как отмечается, конформационная перестройка шипов начинается в одном или нескольких независимых центрах, а не происходит одновременно по всей частице, поскольку это привело бы к стерическим столкновениям [236]. Существует мнение о том, что данная структурная перестройка поверхностных белков является необратимой для ВКЭ и обратимой для вируса Денге [289, 331]. Эти данные могут указывать на различия в созревании вирусных частиц в хозяине и переносчиках между комарами и клещами.

Конформационные изменения вирусной частицы заканчиваются отщеплением рг-пептида от белка М протеазой клетки хозяина – фурином [347]. В незрелой частице, не прошедшей конформационное изменение, опосредованное действием низкого уровня рН, сайт расщепления белка ргМ является недоступным для действия протеазы. После расщепления рг-пептида от белка М пептид остается связанным с гетеротетрамером белков М и Е при кислом рН в системе транспорта Гольджи. Тем самым происходит закрывание петли слияния, предотвращая её преждевременное слияние с мембраной. Только после того, как вирион покидает клетку посредством эндоцитоза и достигается нейтральная внеклеточная среда, происходит диссоциация рг-пептида, делая его инфекционным [68, 331]. Следует отметить, что процесс созревания флавивирусов не всегда завершается полностью, что приводит к образованию незрелых и частично зрелых частиц инфицированными клетками. При этом полностью незрелые частицы не заразны, так как они не способны к слиянию; частично зрелые частицы при этом могут инфицировать новые клетки [178, 289].

Продуцируемые частично зрелые частицы структурно и антигенно гетерогенны. Как считают некоторые исследователи, такая особенность вирусов может быть использована как стратегия иммунного уклонения, а также как способ увеличения диапазона тканевых тропизмов [65]. Все основные экспериментальные данные по созреванию и выходу ВКЭ изучаются на клетках млекопитающих. При этом надо иметь в виду, что существуют различия между системами млекопитающих и клетками клещей. Так, гликозилирование белка Е необходимо для выхода из клеток млекопитающих, но не обязательно для клещей [252, 312]. Интересным является тот факт, что блокирование транспорта из ЭПР в аппарат Гольджи не снижает продукцию вируса [252].

1.1.2 Белок Е вируса клещевого энцефалита

Поверхностный белок Е ВКЭ является единственным гликопротеином (496 аминокислотных остатков), экспонированным на поверхности зрелой вирусной частицы, поэтому именно он является основным антигеном, вызывающим продукцию нейтрализующих иммуноглобулинов, а также главной молекулярной детерминантой нейровирулентности [126, 221]. Поскольку белок Е является главной антигенной детерминантой вируса и основным индуктором иммунных ответов у инфицированного млекопитающего-хозяина, то он и его структурные модификации (гликозилирование) считаются решающими в вирулентности ВКЭ [184]. Уровень гомологии среди различных штаммов одного вида ВКЭ составляет 93–96 % [74, 280]. В дополнение, гликопротеин Е вирионов ВКЭ является достаточно консервативным элементом в течение многих лет. При исследовании вирусной оболочки штаммов вируса, выделенных с разницей в 14 лет из природных очагов Австрии, были выявлены незначительные антигенные изменения [166].

Белок Е вируса клещевого энцефалита имеет один сайт N-гликозилирования в положении Asn154 [312]. Экспериментальными данными показано, что гликозилирование белка Е не влияет на его биологические свойства и на его инфекционность при заражении животных [185]. Также гликозилирование

не влияет на конформацию эпитопов белка Е флавивирусов [381]. Предполагается, что гликозилирование белка необходимо для транспортировки его через мембраны ЭПР и аппарата Гольджи при сборке и созревании вирусных частиц [326].

Наиболее консервативным элементом белка Е, присущим всем флавивирусам, оказались последовательности 12 аминокислотных остатков цистеина, отвечающие за формирование дисульфидных мостиков [256]. Благодаря моноклональным антителам и исследованиям по топологическому картированию эпитопов белка Е выделены три отдельных домена – А, В и С [160, 244]. После появления данных о рентгеноструктурном анализе белка Е соответствующие домены получили численное обозначение – I, II и III, а также была установлена пространственная ориентация доменов [221, 290]. Позднее с помощью криоэлектронной реконструкции показан IV домен (Рисунок 2), погруженный в липидную мембрану вируса [333].

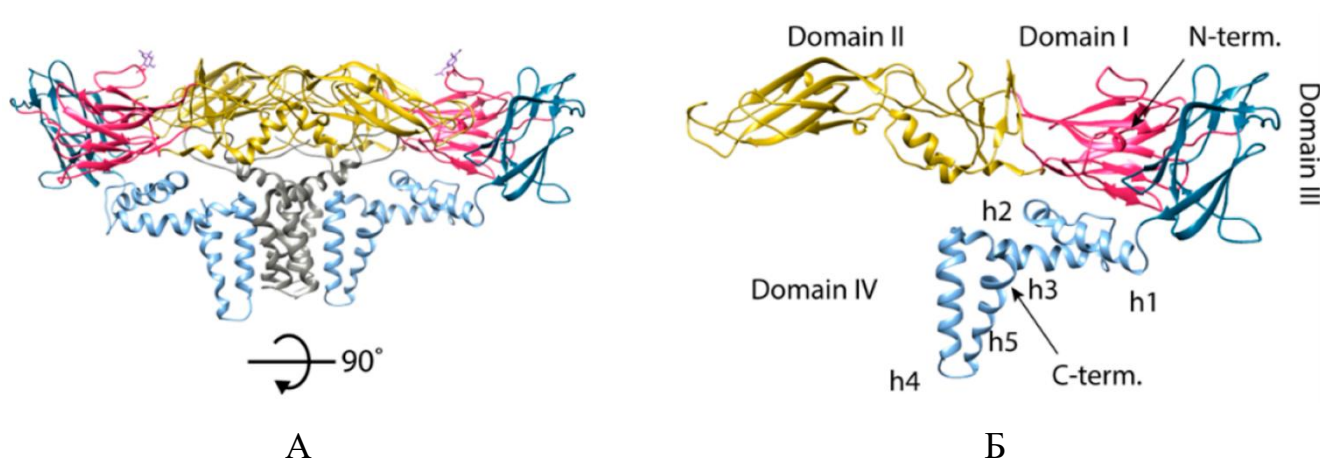


Рисунок 2 – Пространственное представление белков Е и М в вирионе ВКЭ.

А – гетеротетрамер двух белков Е и двух белков М. Белки Е окрашены в соответствии с доменами: красный – I; желтый – II; синий – III; голубой – IV домен. Белок М представлен серым цветом. Б – структура мономера белка Е, окрашенная соответственно доменам [290]

Единичные мутации в белке Е в I домене, который отвечает за связывание со специфическими клеточными рецепторами, приводят к ослаблению

вирулентности. Еще одним важным элементом, который может вносить серьезные изменения в вирулентность (с помощью мутационного анализа), является 3'-некодирующая область вирусной РНК (без изменения инвазивности) [239].

Исследования по анализу функций белка Е рода флавивирусов показали, что данный белок играет главную роль в ослаблении (аттенуировании) вируса при исследовании его нейроинвазивности. Так, исследования установили, что даже единичные одноаминокислотные замены в последовательности белка Е достаточны, чтобы послужить причиной потери нейроинвазивности вируса. При этом значительных изменений его нейровирулентности, или способности вируса к репликации *in vitro*, не происходило. Данная особенность белка Е может объясняться консервативностью доменов, которые отвечают за специфический рецептор-опосредованный эндоцитоз с определенным типом периферических тканей организма носителя [239]. Поверхностные белки оболочек вирусов как класс белков обычно не имеют высококонсервативных активных сайтов, которые могли бы стать рациональной мишенью для небольших ингибирующих молекул. Однако, как показано рядом ученых, можно подобрать молекулы, способные специфически связываться с консервативным регионом поверхностного белка, ингибируя слияния вируса и мембраны клетки-хозяина. В литературе существуют данные о различных молекулах, которые способны специфически связываться с карманом белка Е флавивирусов, ингибируя функции слияния вирусов Денге, Зика, Западного Нила и японского энцефалита [207]. Недавно группой чешских ученых опубликована работа по анализу гликозилирования поверхностного белка Е ВКЭ, в которой показано изменение эффективности заражения вирусом на культуре клеток млекопитающих при отсутствии гликозилирования аминокислоты в 154 положении белка Е. При этом отсутствие гликозилирования не сильно влияло на инфекционные процессы в экспериментах на культурах клеток клещей [125]. Белок М в зрелой вирусной частице состоит из 75 остатков, имеет одну периферическую спираль мембраны, две трансмембранные спирали и N-концевую петлю, которая

взаимодействует с обоими белками Е в гетеротетрамере [207]. Белок М скрыт на границе раздела белков Е и предположительно работает как «цементный» белок, усиливая взаимодействие белков Е [207]. Поверхность зрелого вириона представляет собой гомодимерный комплекс белка Е, состоящий из 180 молекул [330]. Как уже отмечалось, основная часть поверхности вируса – это аминокислоты белка Е, не считая последовательностей аминокислот данного белка, которые формируют так называемый стебельный домен и два трансмембранных домена. Трансмембранные домены выступают в качестве якорей для закрепления белка на мембране вируса. Две функции – по рецептор-опосредованному связыванию вируса и его слиянию с клеткой носителя – осуществляются через белок Е. Поэтому белок Е является главной мишенью для вируснейтрализующих антител, а также потенциальным средством в получении диагностических и лекарственных средств через ингибирование функций данного гликопротеина [145, 278].

1.1.3 Современные средства лечения, профилактики и контроля клещевого энцефалита

Как известно, ранняя диагностика любого инфекционного заболевания является залогом успеха в купировании болезни. Поэтому в настоящее время остается актуальным вопрос как своевременной и качественной диагностики, так и использования надежных и безопасных средств лечения данной инфекции. В этом аспекте КЭ остается одним из опасных и непредсказуемых по последствиям природно-очаговых инфекций. Современное состояние уровня понимания процессов КЭ позволяет проводить качественный мониторинг границ его распространения. Несмотря на это, все еще остается актуальной потребность в наличии более инновационных, надежных, специфических и современных лекарственных средств.

Высокая стоимость процедур диагностики и лечения КЭ напрямую коррелирует с тяжестью и количеством регистрируемых случаев заболевания. Учитывая большую территорию географического охвата, а также неповсеместную

доступность для широкого круга населения средств лечения, становятся очевидными частота и территориальное расположение наиболее тяжелых форм данного заболевания. Следует отметить, что не все граждане, проживающие на территориях с природными очагами инфекции или территориях, близких к природным очагам инфекции, производят рекомендуемую вакцинопрофилактику к ВКЭ.

Вакцинация. Поскольку этиотропное лечение КЭ отсутствует, наиболее безопасным и высокоэффективным средством для борьбы с вирусом в настоящее время считается вакцинация [219]. В настоящее время применяются две вакцины, зарегистрированные в Европе, – это TBEV FSME-IMMUN и Encerpur. Данные вакцины производятся на штаммах ВКЭ Neudorf 1 и K23 соответственно. Производство вакцин проходит по одной схеме приготовления. Так, вирус, выращенный на клетках фибробластов эмбрионов кур, инактивируется формалином, после чего проходит стадию очистки и добавления адьюванта (гидроксида алюминия) для усиления иммунной реакции [334]. Следует отметить, что данные вакцины эффективны в борьбе не только против Европейского, но и против Сибирского с Дальневосточного субтипов. На территории России зарегистрированы ещё две вакцины ТВЕ – Moscow и EnceVir, основанные на Дальневосточном субтипе вируса. Приготовление вакцин происходит по схеме, аналогичной европейским вакцинам [363]. Обычно вакцинацию на территории РФ проводят в осенне-зимний период, чтобы достигнуть защиты от прививки до периода активности клещей. После постановки первой прививки последующие ревакцинации проводят через 3–5 лет в зависимости от возраста и в соответствии с инструкцией прививки. Как и любая другая вакцина, вакцина против ВКЭ ставится здоровым людям, без проявления острых лихорадочных процессов с целью получения более специфической иммунной реакции. Что касается реакций организма от постановки прививки, то их проявления обычно протекают мягко и регистрируются относительно редко. Чаще реакция может наблюдаться при постановке первой дозы препарата, нежели при последующих постановках [363].

Эффективность вакцинации наглядно показана зарубежной практикой применения иммунопрофилактики в Австрии, правительство которой с помощью маркетинговых и социальных мер смогло иммунизировать большую часть населения своей страны. Так, с 6 % привитых против ВКЭ граждан в 1980 г. удалось иммунизировать до 82 % населения к 2013 г., а в зонах с высоким риском КЭ – до 90 %. Благодаря таким действиям удалось снизить число заболевших КЭ с нескольких сотен до 50–100 случаев заболевания в год [225]. При этом надо учитывать, что данные цифры не до конца отображают количество случаев с течением времени, так как вакцинопрофилактика позволяет уменьшить количество заболеваний КЭ не разово, а на несколько лет.

Большинством ученых в настоящее время принимается тот факт, что вакцинопрофилактика является наиболее эффективным средством борьбы с клещевым энцефалитом [228]. Однако в применении вакцинопрофилактики существуют несколько недостатков. Так, при производстве вакцин, а именно при инаktivировании вирусных частиц формалином, поверхностные антигены могут претерпевать нежелательные конформационные изменения. В свою очередь, такие неестественные мишени вируса могут стать причиной формирования не совсем корректного иммунного ответа [228].

В целом по России охват населения вакцинацией существенно различается по регионам. На некоторых территориях, близких к природным очагам, охват населения вакцинацией имеет высокие показатели, в то время как в районах с менее опасным уровнем заболевания цифры значительно ниже. Например, в Свердловской области вакцинированность составляет около 88 %, в Алтайском крае – более 50 %, а в некоторых регионах процент вакцинированных может составлять менее 10 % населения [356]. Поскольку вакцинация в неэндемичных по КЭ регионах не обязательна, трудно оценить точный эффект от вакцинации в районах, далеких от природных очагов. Несмотря на то, что на сегодняшний день на территории России существуют доступные и эффективные вакцины к ВКЭ, процент вакцинированного населения остается недостаточным.

Иммуноглобулины класса G. В тех случаях, когда иммунопрофилактика не была проведена, единственным средством профилактики и лечения остается введение суммарных иммуноглобулинов G, полученных от иммунизированных доноров. Впервые вирус-специфические антитела начали применять в качестве экстренной профилактики КЭ с 1939 г. [20]. Сначала это были препараты, получаемые из крови коз и лошадей, а с 1969 г. их стали получать из венозной крови доноров, жителей эндемичных по КЭ регионов [39]. К концу 1970-х гг. по экспериментальным и эпидемиологическим данным сделан вывод, что в результате серопротекции вероятность заболевания КЭ снижалась в 3–5 раз [51]. Позднее работы по изучению влияния профилактики иммуноглобулинами оптимизировали их применение. Проведение постконтактной профилактики иммуноглобулинами на территории России осуществляется постановкой препаратов по 10 мг иммуноглобулина на каждые 10 кг веса пациента в течение первых 96 часов после укуса зараженного клеща [19, 38, 44]. В случае постановки специфических иммуноглобулинов после 96 часов наблюдается эффективность в предотвращении заболевания в примерно у 60 % пациентов [152].

К тому моменту, когда иммуноглобулины у зараженного человека будут обнаружены в сыворотке крови или цереброспинальной жидкости, существует высокая вероятность неэффективности лечения существующими методами. Поэтому важно не пропустить момент возможного купирования заболевания иммуноглобулинами, после которого все действия, направленные на борьбу с вирусной инфекцией, будут нецелесообразны. Поскольку существует близкородственная связь между антигенными детерминантами ВКЭ и другими флавивирусами, то следует учитывать и возможную перекрестную реакцию иммуноглобулинов, которые могут индуцироваться посредством вакцинации или инфекционных процессов. Так, возможна неправильная постановка диагноза ВКЭ у людей, которые вакцинированы против желтой лихорадки, лихорадки Денге, лихорадки Западного Нила или других флавивирусных инфекций [189]. Поэтому к настоящему времени существует необходимость в высокоспецифичных средствах ранней диагностики, профилактики и лечения ВКЭ.

Ранее на культурах клеток показано антител усиливающее действие вирусной инфекции на примере вируса лихорадки Денге [123]. Усиление инфекции основано на поглощении клетками инфекционных комплексов вирус – антитело после их взаимодействия с рецепторами Fcγ. Существуют подобные работы и в отношении ВКЭ, указывающие на случаи, когда иммуноглобулины способны усиливать репликацию вируса в опытах на клеточной линии мышей [65, 274]. Однако в экспериментах *in vivo* феномен антителозависимого усиления инфекции не зарегистрирован [66, 356]. К настоящему моменту считается, что при правильном и своевременном введении иммуноглобулинов G против ВКЭ частота клинических случаев осложнения заболевания минимальна [107, 267].

Так как данные некоторых отчетов по эффективности иммуноглобулинов для детей показали ненадежность их применения, иммуноглобулины G против ВКЭ в европейских странах к настоящему дню не доступны [107, 269, 363]. Наряду с этим существуют научные данные российских ученых, показывающие эффективность своевременного применения специфических иммуноглобулинов и их протективную роль в 80 % случаев [266].

На сегодняшний день не найдено решения для ранней, эффективной и высокоспецифичной терапии вирусных заболеваний, равно как и не существует эффективных лекарственных средств. В случае заражения вирусом клещевого энцефалита обычно применяют препараты, которые лишь стимулируют иммунную систему или ограничиваются симптоматическим лечением. Так, обычно врачами назначается симптоматическое лечение [219], которое включает прием жаропонижающих, обезболивающих и противовоспалительных препаратов [101]. Применение кортикостероидов при симптоматическом лечении ВКЭ обычно отягощает клиническую картину лечения и, как следствие, увеличивает продолжительность госпитализации больного [355].

Получаемые терапевтические противовирусные иммуноглобулины человека к ВКЭ имеют ряд недостатков, которые обусловлены тем, что их выделяют из крови человека. Соответственно, существует вероятность развития анафилактического шока и риск контаминации препаратов слабо

охарактеризованными инфекциями, выделенными от доноров. При этом применение иммуноглобулинов не предотвращает, а лишь уменьшает тяжесть заболевания. Надо учитывать, что срок годности иммуноглобулинов ограничен двумя годами даже при соблюдении специальных условий хранения, что также негативно отражается на возможности их широкого применения в отдаленных районах.

Дополнительными мерами для уменьшения случаев заболевания КЭ могут быть пастеризация молока, уменьшение числа клещей в популяции (применение акарицидов), а также личные меры предосторожности отдельного человека. Персональные меры защиты подразумевают использование одежды, которая будет затруднять доступ клещам к кожным покровам. Использование светлой одежды может стать дополнительным фактором более легкого обнаружения клещей на одежде. Немаловажным является и избегание мест, которые будут обладать благоприятной средой для обитания клещей. Это может быть подлесок, содержащий слои разлагающейся растительности, с достаточной влажностью для развития и выживания клещей.

1.1.4 Потенциальные молекулы-ингибиторы вируса клещевого энцефалита

Рекомбинантные антитела, включая химерные и гуманизированные антитела, могут стать дополнительным методом для иммунотерапии КЭ в будущем. Работы по их созданию приблизительно начались с работы Р.Т. Jones 1986 г. [302], в которой продемонстрировано, что аффинность гуманизированных антител практически не отличается от аффинности исходных моноклональных антител. Так появились первые гуманизированные антитела против лизоцима и антигена CD52 [379].

Лабораторно сконструированные иммуноглобулины имеют некоторые преимущества перед препаратами, которые получают из крови человека. Поскольку получение рекомбинантных иммуноглобулинов происходит в бескровных биотехнологических условиях, то такие молекулы считаются

достаточно чистыми [66]. Возможность стандартизации таких препаратов является еще одним преимуществом по сравнению с донорскими препаратами. Так, показана эффективность сконструированных химерных антител против ВКЭ в сравнении с коммерческим сывороточным иммуноглобулином G. При этом следует учитывать, что все иммуноглобулины будут обладать ограниченностью применения для терапии КЭ в ЦНС.

Нуклеотидные аналоги. Нуклеотидные аналоги в качестве ингибиторов вирусных полимераз ДНК- или РНК-вирусов зарекомендовали себя как надежные средства в терапии многих серьезных заболеваний [139]. Такие терапевтические нуклеотиды, как правило, способны приводить к преждевременному прекращению синтеза вирусного генома [140] или к усилению мутагенеза вирусного генетического материала, накоплению катастрофических ошибок [132] и иммуномодуляции [344].

На сегодня известны нуклеотидные ингибиторы ВКЭ, которые показали эффективность в экспериментах, однако не все дошли до клинических испытаний [83, 156]. Ряд нуклеотидных аналогов ингибирующие ВКЭ, которые изначально создавались для лечения хронического гепатита С, включают 2'-С-метил-замещенные аналоги [85, 260]. Они показали активность в подавлении репликации ВКЭ (штаммы Нурр и Neudorfl) как в клеточных линиях почек свиньи (PS), так и в клетках нейробластомы человека (UKF-NB4) [156, 334]. Микромольная концентрация активных веществ в экспериментах показала благоприятный профиль цитотоксичности. Так, одна из молекул, 7-деза-2'-С-метиладенозин, значительно улучшала исход заболевания, увеличивая выживаемость, снижая признаки нейроинфекции и вирусные титры в мозге мышей BALB/c, инфицированных летальной дозой ВКЭ Нурр [161]. Обработка *in vitro* тем же препаратом инфицированных клеточной линии почек свиньи приводила к быстрой эволюции устойчивости к 2'-С-метил-замещенным нуклеозидам, связанной с мутацией (S603T) в активном центре вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы. При введении этинильного фрагмента в положение С2' нуклеотида 7-деза-2'-С-этиниоаденозина, первоначально

синтезированного в качестве ингибитора вируса Денге, проявлялась микромолярная активность в отношении ВКЭ [334]. Противовирусная активность двух ингибиторов ВКЭ из другого семейства 4'-азидозамещенных аналогов цитидина наблюдалась не во всех экспериментальных линиях клеток (PS, UKF-NB4). Такие данные могут указывать на разную способность поглощения препаратов клеточными линиями или недостаточность фосфорилирования препаратов киназой в тестируемых клеточных системах [334].

Нуклеотидные ингибиторы, такие как N6-алкил/арил-замещенные нуклеотиды, показали микромолярный уровень ингибирования в опытах *in vitro* с ВКЭ [249]. Несмотря на эффективность в опытах *in vitro*, многие тестируемые нуклеотидные ингибиторы с заменой в рибозе/гетерооснованиях зачастую приводят к полному прекращению противовирусного эффекта [334]. Рибавирин – антивирусный нуклеотидный ингибитор широкого спектра действия, который часто используют в терапии в комбинации с интерфероном [159]. Однако при применении рибавирина у 10 % пролеченных пациентов развиваются тяжелые формы гемолитической анемии [304].

Ряд нуклеотидных аналогов, которые имеют эффект ингибирования ВКЭ, могут часто оказывать в экспериментах цитотоксическое действие на культуру клеток [249]. Молекулы-ингибиторы на основе нуклеозидных аналогов представляют собой многообещающие потенциальные лекарственные средства от ВКЭ. В частности, 7-деаза-2'-С-метиладенозин демонстрирует высокие противовирусные показатели ингибирования в опытах на мышах [259].

На сегодняшний день никакие схемы специфического лечения низкомолекулярными противовирусными препаратами не были признаны или широко внедрены [104]. В исследованиях *in vitro* многообещающим представляется препарат Умифеновир, известный как Арбидол, который разработан в СССР в 1970 г. и позиционируется как противовирусное соединение широкого спектра действия для профилактики и лечения инфекций гриппа А и В человека, а также постгриппозных осложнений [98]. Недавно было показано его противовирусное действие в микромолярных концентрациях против

флавивирусов [92]. Однако эффективность Арбидола для лечения или профилактики ВКЭ у лабораторных животных или человека до сих пор не доказана. Подобная ситуация касается препарата Анаферон, который продается на территории России как препарат для лечения КЭ. В ряде исследований утверждалось, что анаферон – это гомеопатический препарат, действующим компонентом которого заявлены кроличьи антитела к гамма-интерферону (IFN γ) [72, 127, 264, 377]. Однако дизайн этих исследований в целом подвергся серьезной критике в связи с отсутствием научного аргументирования исследования и необоснованностью полученных результатов [151, 268]. Это привело к отзыву опубликованных результатов исследования из журнала The PLoS One [255]. В итоге эффективность Анаферона при лечении и профилактике ВКЭ остается недоказанной.

Несмотря на огромный прогресс и большое количество молекул-ингибиторов ВКЭ *in vitro*, до сих пор в мире нет официально одобренного и зарегистрированного противовирусного препарата против ВКЭ.

1.2 Лекарственные средства на основе растений

Изначально после перехода человечества от кочевой охоты и собирательства к оседлому типу жизнедеятельности первыми под прицел одомашнивания попали растения, которые выполняли питательную функцию для человека (рис, соя, кукуруза, картошка и т. д.). Позднее человечество начало одомашнивание лекарственных растений [86]. Не зря растения считают зелеными химическими фабриками, которые сумели обеспечить ресурсами целые индустрии, такие как пищевая, кормовая, медицинская, индустрия биоматериалов и другие [131]. На сегодняшний день значительная часть людей все еще склонна прибегать к применению средств традиционной медицины [95, 265, 298, 307, 351, 391, 393]. Даже в таких развитых странах, как Великобритания, и в ряде стран Европы обнаруживаются люди, склонные к самостоятельной терапии лекарственными растениями и их различными отварами. Не исключается и применение различных частей лекарственных растений в пищу.

Растения как источник полезных биологически активных молекул привлекали внимание человечества на протяжении всей его истории развития. За последние десятилетия интерес к таким молекулам только возрастал. Так, все больше и больше препаратов, получаемых из растений, проверяются ежегодно на наличие противовирусных, антибактериальных, противораковых, иммуномодулирующих и противовоспалительных свойств [129, 243, 277]. Прогресс в поиске различных биологически активных субстанций в основном связан с появлением новых техник разделения и способов идентификации активных компонентов из растений. Поскольку растения являются одним из многочисленных и разнообразно представленных царств, они способны продуцировать огромное количество компонентов, потенциально обладающих биологической активностью к различным бактериальным и вирусным инфекциям [86, 154, 171]. На сегодняшний день известно много работ, идентифицировавших широкий спектр активных компонентов для разнообразных групп вирусов [283, 386]. Значительный интерес в последнее время подкрепляется растущей озабоченностью в появлении новых штаммов с лекарственной устойчивостью [80]. К настоящему моменту растения уже стали источником для новых потенциальных противовирусных компонентов. Однако огромная часть веществ растительного царства все ещё остается неисследованной. Почти во всех странах лекарственные растения широко использовались на протяжении всей истории для лечения болезней и инфекций в качестве традиционных лечебных средств. Применение растений основывалось на том, что они обладают широким терапевтическим спектром и минимальными побочными эффектами. Следует отметить, что препараты на основе лекарственных растений проявляют меньше побочных эффектов и лекарственных взаимодействий при проверке их биологической активности, чем препараты из химических библиотек [168, 279]. Растения, в отличие от синтетических молекул, в силу своей природы являются более легкими для усвоения живыми системами [350]. Как следствие это делает их более доступными в применении в качестве источников терапевтических молекул. В подкрепление этому в последние годы замечается

широкое применение безопасных органических материалов растительного происхождения в медицинской области [122, 162].

По-видимому, растения являются самой широкой группой, которая может предложить колоссальное количество различных молекул, обладающих биологической активностью [78, 291, 292]. Поэтому растения являются перспективными источниками в получении более мощных, легкоусвояемых, новых препаратов для профилактики и лечения уже известных и вновь появляющихся вирусных инфекций. Кроме того, как известно из мировой практики, при исследовании одних свойств веществ на живых системах можно получить другой, незапланированный, положительный эффект. Подобное случилось с лекарством, которое изначально проверяли для лечения туберкулеза (Ипрониазид). В ходе исследования препарата против туберкулеза обнаружено, что ипрониазид является ингибитором моноаминоксидазы, что давало антидепрессивное действие. В итоге исследование повлекло за собой создание широкого спектра ингибиторов моноаминоксидазы, которые в настоящее время используются в качестве антидепрессантов [75, 306, 318].

1.2.1 Биологические активные вещества, синтезируемые растениями

Продуцируемые растениями молекулы делят на два основных типа – первичные и вторичные метаболиты. Первичные метаболиты – низкомолекулярные соединения, присутствующие во всех клетках организма и необходимые для их жизнедеятельности. К ним относят пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды, сахара, аминокислоты, витамины, органические кислоты. Они являются строительными кирпичиками для более сложных высокомолекулярных соединений. Вторичные метаболиты – соединения, не требующиеся для выживания клеток и не участвующие в первичном метаболизме растений. Как правило, вторичные метаболиты растений обладают большим разнообразием и являются более активными биологическими веществами. Вторичные метаболиты растений являются специализированными молекулами растений, которые отобраны в процессе естественного отбора

и используются растениями для выполнения определенных функции [340]. Считается, что вторичные метаболиты являются ядром в адаптации растений в их борьбе за выживание [117, 387]. Биосинтез вторичных метаболитов начинается с основных путей метаболизма растений, который впоследствии специализируется в зависимости от типа клеток, стадии развития и факторов окружающей среды [366]. Вторичные метаболиты широко распространены в клетках разных растений, тканях и органов.

В настоящее время насчитывают около 100 000 вторичных метаболитов, производимых растениями. В зависимости от пути синтеза у растений есть три основные группы вторичных метаболитов – азотсодержащие соединения (цианогенные гликозиды, алкалоиды и глюкозинолаты), фенольные соединения (флавоноиды и фенилпропаноиды) и терпены (изопреноиды) [181].

Так как факторы развития влияют на инициацию и последующую дифференцировку определенных клеточных структур, участвующих в биосинтезе и хранении активных вторичных метаболитов [201], то и разные клетки, ткани и органы лекарственных растений обладают разными лечебными свойствами на разных стадиях развития [311]. Кроме того, рост и развитие растений обычно активируются или замедляются различными условиями среды. Следовательно, адаптация морфологии, анатомии и физиологических функций растений к биотическим и абиотическим изменениям может влиять на накопление вторичных метаболитов [231]. Производство и регуляция вторичных метаболитов сильно зависит от изменений окружающей среды, поскольку экспрессия генов, участвующих в синтезе вторичных метаболитов, изменяется под действием различных стрессов [241, 315]. Зачастую вторичные метаболиты растений оказывают долгосрочное влияние на рост и выживание растений в стрессовых условиях [211].

Исследования биосинтеза и регуляции вторичных метаболитов в лекарственных растениях путем контроля и оптимизации внешних и внутренних факторов могут быть использованы для разработки биотехнологий производства новых высококачественных лекарств. При отсутствии возможности

их химического синтеза для применения в терапевтических целях возможно создание микробиологических систем, способных синтезировать необходимые вторичные метаболиты, обладающие потенциальной активностью, которые помогут увеличить производство активных молекул и снизить стоимость получения [292]. Получение трансгенно модифицированных растений с помощью традиционного метода трансформации агробактериальными векторами с увеличенным профилем синтеза необходимых вторичных метаболитов дает возможность производства биологически активных молекул [235]. Быстрое развитие методов геномного редактирования с помощью систем CRISPR-Cas9 также делает возможными модификацию медицинских растений или создание растений с увеличенной продукцией необходимых вторичных метаболитов [287]. Такие современные инструменты определенно ускорят в ближайшем будущем идентификацию и получение новых лекарственных молекул.

На сегодняшний день благодаря широкому развитию технологий высокопроизводительного массового параллельного секвенирования ДНК (NGS, next generation sequencing) можно определять потенциальные ферменты, вовлеченные в биосинтетический путь метаболитов определенного растения, после чего проводить анализ и создавать непосредственный транскриптомный профиль экспрессии определенного растения на основе разнообразия и относительной концентрации матричных РНК [250].

1.2.2 Противовирусные биологически активные вещества на основе растительных источников

Как можно видеть из событий последнего десятилетия, эпизодические вспышки вирусных заболеваний по всему миру являются тревожной угрозой для здоровья человечества. Постоянно поступают сообщения о новых вирусных заболеваниях, приводящих к значительным проблемам со здоровьем людей. При этом в отсутствие эффективного противовирусного лечения происходит усугубление масштабов оказываемого влияния вирусов на благополучие всего человечества [220]. В настоящее время разработка противовирусного препарата

осложняется еще и тем, что благодаря внутренней особенности вирусов к изменению своего генома, вирусы способны приобретать устойчивость к существующим противовирусным средствам [84]. Поскольку растения обладают большим количеством разнообразных молекул, они рассматриваются как наиболее потенциальный источник противовирусных препаратов, которые обладают минимальными прямыми или косвенными побочными эффектами на здоровье человека во время терапии [82, 243]. Противовирусное действие препаратов может быть нацелено на разные стадии вируса – от репликации ДНК/РНК вируса до различных посттрансляционных модификаций вирусных белков или вирусного ассамблирования [137]. Так, например, галлат эпигаллокатехина инактивирует хозяйские ферменты, способствующие росту ротавируса, а также вирусные ферменты РНК-полимеразу, протеазу и обратную транскриптазу [240]. Данный флавоноид является компонентом листьев зеленого и белого чая и, в меньших концентрациях, черного чая [97]. Некоторые флавоноиды способны вызывать ингибирование фосфорилирования белков, ограничивая репликацию вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) [352].

По опубликованным данным за 2020 г., не менее 3 % населения Земли инфицировано вирусом гепатита С [11]; при этом надежных вакцин против гепатита С до сих пор не существует [292]. Разработки вакцины к вирусу гепатита С активно ведутся, но в силу того, что оболочечный гликопротеин Е2 вируса сильно отличается от штамма к штамму, возникают определенные трудности в получении надежной вакцины [118]. Из экстракта корней володушки *Vupleurum kaoi* Liu C.Y. Chao & Chuang (1961) выделены вещества – сайкопонины, которые показали ингибирующее действие на вирус гепатита С [314]. Как отмечается, сайкопонин SSb2-алкалоид проявляет наибольшую ингибирующую активность. Ингибирование алкалоидом осуществлялось на стадии вирусного проникновения в клетки. Чуть позднее найден монотерпен – лолиолид из камерный горький *Phyllanthus urinaria* L. (1753), который продемонстрировал ингибирование гепатита С на ранних стадиях проникновения вируса в клетки [70]. Поэтому получение противовирусных препаратов кажется целесообразной задачей в борьбе

с вирусом гепатита С. Терпены, полученные из метанольного экстракта шандры обыкновенной *Marrubium vulgare* L. (1753), показали активность против вируса простого герпеса 1. Терпены способны как нарушать прикрепление вируса к клеточной стенке, так и вмешиваться в репликацию вируса [173]. Лигнан (3-hydroxy caruillignan C) из красного дерева *Swietenia macrophylla* King (1886) проявил эффективность против вируса гепатита С. Ингибирующее действие лигнана отмечалось на фазе как трансляции, так и транскрипции. Другие исследования того же лигнана показали активность против ВИЧ-1, вируса гепатита В и вируса японского энцефалита [76, 77]. Бомбазинол – лигнан, идентифицированный для семейства растений *Bombacaceae* Kunth (1822), – обладает противовирусной активностью против вируса гепатита В [62]. Лигнаны, выделенные из корней змеинового жасмина *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz (1870), обладали противовирусной активностью в отношении штамма гриппа PR8, вируса Коксаки и риновируса человека 1В [63]. Аналогичную ингибирующую активность кумаринов описали для экстракта андрографиса метельчатого *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall. ex Nees (1832) против Денге и вируса Чикунгунья [308]. Следует отметить, что для вируса Чикунгунья нет и специфических лекарственных средств, как нет и вакцины [119]. При этом при инфицировании вирусом Чикунгунья назначается только симптоматическое лечение, а единственным средством против распространения вируса является борьба с двумя видами комаров-переносчиков.

Противовирусные молекулы к вирусу клещевого энцефалита. Существуют работы по поиску противовирусных молекул к ВКЭ из растительных источников. Так, описано ингибирующее действие *S. baicalensis* [210]. Однако авторам не удалось идентифицировать конкретный компонент, ответственный за противовирусное действие.

Показано, что флавоноиды, выделенные из *S. baicalensis*, обладают прямым вирулицидным действием на вирус клещевого энцефалита в экспериментах на культуре клеток СПЭВ [18]. Флавоноиды из растения экстрагировали с помощью DMSO, при этом 90 % от концентрации всех компонентов составил байкалеин.

Одним из главных показателей эффективности любого противовирусного является индекс селективности (SI, selectivity index). Индекс селективности рассчитывается как отношение концентраций 50%-й цитотоксичности препарата (CC50, 50 % cytotoxicity concentration) на клетки к его вирулицидной 50%-й эффективной концентрации (EC50, 50 % effective concentration). Чем выше данный показатель, тем больше вероятность его использования в качестве лекарственного средства.

Установлен ряд компонентов, выделенных из морских трав семейства *Zosteraceae* Dumort (1829), которые способны ингибировать вирус клещевого энцефалита в опытах *in vitro*. Так, розмариновая кислота и лютеолин – компоненты полифенольного комплекса – показали противовирусное действие в отношении высокопатогенного штамма Dal'negorsk (Dal) вируса клещевого энцефалита Дальневосточного субтипа на культуре клеток СПЭВ. Как отмечают авторы, противовирусная активность веществ определяется их высоким антиоксидантным, противовоспалительным и нейропротективным потенциалом [26]. Предполагается, что механизм противовирусного действия компонентов обусловлен прямой инактивацией вируса.

Сравнительное изучение противовирусной активности полисахаридов из бурых водорослей ламинарии японской *Laminaria japonica* A. (1851), ламинарии цикоревидная *Laminaria cichorioides* var. *sachalinensis* M. (1928), *Fucus evanescens* C. Agardh (1820) и костарии ребристой *Costaria costata* (C. Agardh) De A. Saunders (1895) показало, что фукоиданы обладают вирулицидным действием в отношении высокопатогенного штамма вируса клещевого энцефалита. Авторами исследования показано, что выделенные сульфатированные полисахариды (фукоиданы) способны подавлять адсорбцию и репликацию вируса на ранних стадиях развития в опытах на культуре клеток СПЭВ [42].

Противовирусные молекулы к ВКЭ обнаружены и у протеобактерий *Pseudoalteromonas nigrifaciens*. Обнаруженный экзополисахарид, как отмечают исследователи, способен отменить индуцированную вирусом супрессию клеток врожденного иммунитета человека [45, 48].

Поиск природных препаратов с антиоксидантными свойствами, которые еще и обладают противовирусной активностью, является потенциально полезной стратегией при любой вирусной инфекции, поскольку считается, что антиоксиданты снимают разрушительное действие активных форм кислорода, в том числе и свободных радикалов. В свою очередь данное свойство облегчает негативный эффект, связанный с окислительным стрессом [81].

Антиоксидант эхинохром А – хиноидный пигмент морских ежей – показал активность в отношении вируса клещевого энцефалита. В экспериментах использовали композицию антиоксидантов: эхинохрома А, аскорбиновой кислоты и α -токоферола, – которая позволила увеличить эффективность ингибирования вируса в сравнении с применением одного эхинохрома [36, 43].

Отдельно можно выделить два компонента – эпросартан и рибавирин, – способные к ингибированию вируса клещевого энцефалита в опытах как *in vitro*, так и *in vivo* [28]. В экспериментах продемонстрировано, что рибавирин оказался в 8 раз токсичнее эпросартана, при этом индекс селективности рибавирина был в 10 раз выше, что компенсируется его большей активностью в низких концентрациях, в сравнении с эпросартаном.

Найдены несколько нуклеозидных аналогов (5-(perylene-3-yl)ethynyl-arabino-uridine, 5-(perylene-3-yl)ethynyl-2'-deoxy-uridine), которые ингибировали вирус клещевого энцефалита, в опытах на клеточной линии СПЭВ. Как предполагают авторы, высокую активность нуклеозидам 5-арилэтинилурацила придает жесткий линкер с остатком перилена [305].

Сравнительно недавно предложены синтетические производные 5-аминоизоксазола, содержащие в своем составе адамантильную группу, которые проявили сильную противовирусную активность и высокий индекс ингибирования в отношении вируса клещевого энцефалита, омской геморрагической лихорадки и вируса энцефалита Повассан [364]. Большинство протестированных изоксазолов проявили противовирусную активность в низком микромолярном диапазоне, при этом заметной цитотоксичности от препаратов не наблюдалось. Как полагают авторы исследования, представленные

гетероциклы могут стать перспективной основой для терапевтических молекул против ВКЭ при дальнейшей оптимизации химической структуры активных молекул.

В 2020 г. учеными из Москвы показана активность 4-аминопиримидин-N-оксида широкого спектра широкого противовирусного действия против трех субтипов вируса клещевого энцефалита. Авторы предполагают, что действие препарата нацелено на консервативный карман белка E-n-октил-b-D-гликозида (b-OG) [325]. При этом отмечены вариации в EC50 активности препарата против разных штаммов вируса. Данную особенность авторы работы объясняют присутствием белка E в разном количестве в виде инфекционных, неинфекционных и незрелых вирусных частиц.

1.2.3 Опасения, связанные с применением растительных источников

Несмотря на то, что некоторые лекарственные растения показали свою применимость в лечении, следует принимать во внимание, что самовольное применение экстрактов растений в лечебных целях может также оказывать и токсическое действие на организм. В последнее время растет число работ, посвященных детальному исследованию токсических эффектов на организм человека от лекарственных растений. Так, в частности, кирказон ломоносовидный *Aristolochia clematitis* L. (1753) люди применяли в качестве лекарственного растения в Европе. В наши дни показано, что семейство Кирказоновых может содержать аристолохиевые кислоты, которые в свою очередь обладают канцерогенным, мутагенным и нефротоксическим эффектом при применении частей растения или отваров этого семейства в пищу [294]. Существуют данные о том, что аналогичные мутагены способны присутствовать в ДНК почек в течение нескольких лет [376]. В исследованиях необходимо учитывать, что каждый человек является индивидуальной системой с характерными специфическими аллергическими реакциями на разные инородные компоненты. Поэтому при исследовании лекарственных растений важна качественная очистка от всех возможных компонентов, которые могут давать побочные нежелательные

эффекты. Недавно в Австралии зафиксирован смертельный случай. Мужчина 75 лет скончался от почечной недостаточности при употреблении токсичного препарата из корней кирказона *Aristolochia fangchi* Y.C.Wu ex L.D. Chow & S.M. Hwang (1989). Препарат мужчина приобрел для лечения своего псориаза [247]. Подобные случаи лекарственного применения растений описаны для Тайваня и Японии [93, 172]. Хвойник китайский *Ephedra sinica* Stapf (1927) – еще одно растение, которое использовали в лечении простуды и респираторных заболеваний в традиционной китайской медицине. Неодревесневшие побеги данного кустарника содержат алкалоиды эфедрина и псевдоэфедрина, которые, по-видимому, обладают терапевтическими свойствами. Существуют отчеты о применении *E. sinica* и её диетических добавок, после которых отмечены гепатотоксические [194, 324], нейротоксические эффекты [248], а также временная слепота [367].

Такое известное растение, как мать-и-мачеха *Tussilago farfara* L. (1753) с очень древних времен используется для лечения острого и хронического кашля, и долгое время растение считалось в основном нетоксическим [120]. Однако суммарные алкалоиды и серкинкин, изолированные из растения, продемонстрировали гепатотоксический эффект [192]. Также существуют сведения, указывающие на то, что пирролизидиновый алкалоид из мать-и-мачехи потенциально способен приводить к веноокклюзионной болезни печени и циррозу [95].

Известны случаи, когда растения используются в качестве лекарственного средства в традиционной медицине, однако со временем появляются данные о различных цитотоксических эффектах или индуцировании рака печени. Подобное продемонстрировано в случае с гинкго *Ginkgo* L. (1771); данное растение использовали в пищу в китайской народной медицине [153, 245]. Также встречаются данные об опухолях щитовидной железы, индуцированных при употреблении *Ginkgo* [153, 245]. Существуют сведения о наличии токсичных метаболитов у *Ginkgo*, которые приводят к онкогенезу назальной полости [299, 303]. Следует отметить, что не всегда отмечаемые эффекты от применяемых

растений однозначны, и часто со временем появляются достаточно противоречивые сведения о побочных эффектах.

Подобную информацию можно встретить о растении *KAVA Piper methysticum* L.f. (1782) или перец опьяняющий, который в течение пары тысяч лет использовали в Полинезии как антидепрессант или анксиолитик, препарат, который устраняет у людей чувство беспокойства, тревоги и страха. Однако в последнее время обнаружены данные, показывающие негативное влияние экстракта *KAVA* на работу печени [103]. Так, установлено, что экстракт может вызывать циррозы, повреждения печени, подобно действию гепатитов; при этом некоторые пациенты после употребления растения нуждались в трансплантации печени [374].

Нет сомнений, что большое количество случаев отравления по всему миру от применения растений и их растительных экстрактов являются актуальными и на сегодняшний день, что требует тщательной проверки на токсичность службами фармаконадзора. Только проведение качественных исследований существующих лекарственных растений поможет получить новые безопасные фармакологические препараты и для улучшения здоровья населения [285].

Получение лекарственного препарата, который можно выпустить для широкого применения, требует тщательной оценки возможных побочных действий как в краткосрочной, так и в долгосрочной перспективе. Принимая во внимание вышесказанное, чтобы выпустить надежный противовирусный препарат, необходимы тщательные разносторонние исследования реакций организма на действие препарата, а также достаточное финансирование и время на его производство.

Клинические испытания потенциальных препаратов должны планироваться с тщательным расчетом на безопасность участников испытаний, а также с достоверной оценкой потенциальных побочных эффектов и реакций испытуемого организма на применение активного препарата. К сожалению, клинические испытания не всегда могут полностью охватить возможные тесты по исследованию побочных эффектов от применения препарата, даже на лабораторных животных. Так, в отечественном препарате (Кагоцел) одним

из используемых активных веществ является сополимер госсипола, который способен угнетать сперматогенез у мужчин и может использоваться в качестве мужского контрацептива [130, 383, 394]. При этом у 20 % пациентов в исследовании отмечался необратимый характер эффекта от госсипола. ВОЗ не включает препарат в список лекарственных препаратов, а также он не применяется в США и Западной Европе.

Вышеприведенные данные указывают на высокую экономическую, научную и практическую перспективность развития исследований новых активных молекул из растительных источников, но с учетом принятия всевозможных средств и мер по оценке безопасности получаемых биологически активных компонентов.

1.2.4 Получение лекарственных средств из растений

Экстракция активных растительных компонентов. Как известно, растения – одно из преобладающих царств живого на нашей планете. Наиболее распространенными представителями растительного царства являются деревья, кустарники и травы. Количество вариаций химических компонентов, производимых данной группой, колоссально (буквально неограниченное количество) [78]. В течение всей истории человечества люди отмечали полезные эффекты растений на их здоровье при лечении различных заболеваний. Среди всех лекарственных растений большее внимание привлекают те, которые применяются человеком в пищу. Эти данные могут объяснять, почему, по примерным подсчетам ВОЗ, около 80 % населения мира полагаются в своих потребностях на средства традиционной медицины. Как показывают исследования, растения являются хорошим источником широкого спектра веществ в лечении и профилактике как хронических, так и инфекционных заболеваний [154]. Еще более актуальным является поиск новых биологически активных молекул в связи с постоянно растущим количеством работ, посвященных исследованиям, указывающим на возрастающее число штаммов микроорганизмов, резистентных к антибиотикам [196].

Начальные этапы по выделению биоактивных компонентов из исходного материала являются наиболее критичными для получения образца, подходящего для его анализа. Так, выбор растворителя для восстановления образца может иметь ключевое влияние на общий успех выделения из природного материала. Немаловажным для эффективного выделения целевого компонента являются время обработки растворителями, давление и количество материала, используемого в работе. Исходный продукт, например, порошкообразное растение, сначала необходимо подготовить таким образом, чтобы обеспечить эффективное высвобождение интересующего соединения в жидкую фазу. В случае высушенного растительного материала в качестве исходного экстрагента можно использовать различные растворители (метанол, хлороформ, этанол, ацетон, ацетонитрил и др.). После стадии мацерации твердый материал удаляется путем декантации экстракта фильтрованием, после чего фильтрат концентрируют и вводят в систему высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) для разделения. Поскольку некоторые натуральные продукты могут содержать значительный уровень сильно связывающих компонентов, таких как хлорофилл и другие эндогенные материалы, которые могут в долгосрочной перспективе поставить под угрозу производительность используемых аналитических колонок [373], поэтому часто используют дополнительные стадии очистки или специальные колонки.

Недавний скачок развития методов очистки и аналитического определения химических компонентов привел к росту работ по идентификации активных веществ в растениях. К сожалению, большинство уже идентифицированных растительных компонентов до сих пор остаются не проверенными на биологическую активность в отношении даже наиболее значимых инфекционных агентов. При этом база данных новых биологических компонентов пополняется каждый год. Быстрое определение данных относительно биологической активности тех или иных компонентов из растений все еще замедляется трудоемкостью, комплексностью, времязатратностью и отсутствием универсальных методов проверок для каждого определенного объекта [168].

Все потенциальные препараты необходимо проверять на биодоступность, эффективность действия, а также подвергать всесторонней проверке на безопасность применения компонента в живых системах с возможными побочными реакциями на использование препарата.

Очистка активного целевого компонента. Растения считаются живыми химическими фабриками по биосинтезу огромного количества вторичных метаболитов, и фактически именно эти метаболиты составляют основу многих коммерческих фармацевтических препаратов, полученных из лечебных и лекарственных растений. Вторичными метаболитами считаются органические вещества, синтезируемые растениями, но не участвующие в процессах роста, развития или репродукции организма. При этом вторичные метаболиты могут присутствовать не во всех организмах. Как правило, они синтезируются из первичных метаболитов и являются биологически активными веществами. Вторичным метаболитам присуща небольшая молекулярная масса – не больше 2–3 кДа (за исключением каучука, гуттаперча, чикла). Различные химические компоненты лекарственных растений, обладающие биологической активностью, используются человеком в фармацевтической, пищевой, парфюмерной, агрохимической и косметической промышленности [187]. Так, многие вторичные метаболиты, такие как алкалоиды, терпеноиды и фенилпропаноиды, рассматриваются для разработки лекарств [315].

Для того чтобы выяснить и идентифицировать структурные и функциональные свойства целевого вещества, необходимо очистить его от остальных компонентов, которые совыделяются из растения при экстракции. Следует учитывать, что некоторые растения или их растительные экстракты могут обладать цитотоксичностью (содержать в своем составе яды, токсины) и при этом содержать биологически важные (полезные для человека) активные молекулы. В этом случае помогает очистка всех компонентов на моносоставляющие. Накопленные данные о различных лекарственных растениях за историю развития человечества могут помочь в поиске и идентификации новых активных веществ. Однако существуют работы,

показывающие наличие цитотоксических эффектов растений, которые долгое время применялись в качестве традиционных лекарственных средств (данные представлены ниже). Не следует исключать из анализа растительные экстракты известных ядовитых растений, поскольку потенциально при очистке от цитотоксических компонентов из ядовитого растения можно обнаружить вещества с желаемой биологической активностью. Считается, что если растение выбрано на основании его традиционного использования, то пробоподготовка экстракта должна максимально повторять технологию выделения [171]. Выбор системы растворителей во многом зависит от природы и свойств целевого компонента и подбирается индивидуально. В литературе встречаются данные по некоторым классам веществ, для которых уже известны их оптимальные условия выделения и описаны основные физико-химические свойства. Немаловажной является и оценка стабильности вещества при различных условиях хранения, нагревания или кипячения. Так, биологические компоненты могут терять биологическую активность в процессе нагревания, заморозки, высушивания или других физико-химических манипуляций. Все эти факторы должны быть учтены, чтобы минимизировать изменения активности искомого компонента.

ВЭЖХ – это метод колоночной хроматографии, в котором подвижной фазой служит жидкость, движущаяся через хроматографическую колонку, заполненную неподвижной фазой. Процесс очистки с помощью ВЭЖХ – это выделение и одновременное отделение целевого соединения от других потенциально структурно похожих соединений или загрязняющих веществ. Как правило, отдельное соединение должно иметь характерный пик детекции на хроматограмме при определенных условиях стационарной и мобильной фазы. В зависимости от того, что необходимо разделить и насколько тесно связаны образцы в смеси, выбираются условия разделения, такие как подходящая подвижная фаза, скорость потока, подходящие детекторы и колонки, чтобы получить оптимальную картину разделения веществ. Идентификация соединений, разделяемых на колонке с помощью ВЭЖХ, является важной частью анализа

любого активного компонента. Параметры разделения должны быть такими, чтобы на хроматографе наблюдался чистый пик известного образца. Идентификационный пик должен иметь разумное время удержания и должен быть хорошо отделен от посторонних пиков на уровнях обнаружения, на которых будет проводиться анализ. При этом в процессе хроматографии могут быть использованы два основных детектора: УФ с длиной волны 190–910 нм и детектор с диодной матрицей (DAD, diode array detector) [112, 231]. Как правило, ВЭЖХ-хроматографы снабжаются масс-спектрометрическим анализатором (MS, mass spectrometry) [369]. Наиболее распространенным способом масс-спектрометрии при ВЖЭХ разделении является электроспрей-ионизация (ЭСИ). Электроспрей-ионизацию отличают более мягкие условия ионизации молекул среди других методов ионизаций, именно поэтому ей отдается предпочтение при анализе термолабильных молекул и макромолекул, которые часто склонны к фрагментации при анализе [157].

Идентификация биологически активных компонентов. Жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрией (LC-MS, liquid chromatography – mass spectrometry) является мощным методом анализа сложных растительных экстрактов по настоящее время [57]. Это позволяет не только разделять смесь компонентов на отдельные вещества с разной скоростью миграции по колонке, но и анализировать молекулярные массы компонентов, составляющие отдельный пик на хроматограмме. Однако наибольшую информативность для выяснения структуры соединений можно получить при применении тандемной масс-спектрометрии (MS/MS, mass spectrometry/mass spectrometry), что способствует быстрой и точной идентификации химических соединений в искомых растительных экстрактах. Особенно этот метод продуктивен, когда чистый аналитический стандарт недоступен для экспериментатора [73]. Использование тандемной масс-спектрометрии, в отличие от обычной масс-спектрометрии, позволяет идентифицировать компоненты и массы, из которых состоит выбранная отдельная «родительская» молекула с определенным значением заряда к массе. Поэтому в настоящее время

очистка и идентификация фитокомпонетов с помощью ВЭЖХ-танDEMной масс-спектрометрии (HPLC-MS/MS, high performance liquid chromatography – mass spectrometry/mass spectrometry) занимает превалирующее место в анализе структуры целевых компонентов. При анализе полученных масс от фрагментации анализируемого вещества они сравниваются с известными данными в базе данных веществ и их фрагментации; на основании сравнения можно получить структурную картину целого компонента. Для того чтобы подтвердить выявленную структуру, обычно приобретается химически чистое вещество, осуществляется проверка его хромато-масс-спектрометрических показателей и сравнение с экспериментальными данными. На основании сравнения результатов производится заключение об идентичности сравниваемых аналитов. Вместе с этим проверяется биологическая активность синтетического агента.

Поскольку у каждого метода разделения – идентификации есть свои ограничения, то в этих случаях ученым приходится комбинировать различные методы. Так, ЭСИ обладает невысокими рамками идентификации макромолекул – в среднем меньше 2000 дальтон. В этом случае дополнительно используются приборы с большим диапазоном детекции масс. Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (MALDI, matrix-assisted laser desorption/ionization) – метод мягкой ионизации компонентов, который осуществляется под воздействием лазерного излучения на матрице с анализируемым веществом [232]. Данный метод позволяет определять первичную последовательность белков, а также детально анализировать посттрансляционные модификации белков. Кроме этого, он позволяет изучать взаимодействия белок-белковых и белок-нуклеиновых кислот. Особенно широкое применение масс-спектрометрия получила в последнее время, став главным инструментом в идентификации вторичных метаболитов. В дополнение к качественному определению масс-спектрометрия дает возможность и количественной оценки анализируемых веществ [254].

1.3 Аптамеры

1.3.1 Современное состояние изучения аптамеров

Аптамеры – короткие фрагменты ДНК или РНК, способные специфично связываться с молекулой-мишенью. С момента открытия метода получения аптамеров в 1990 г. и к настоящему времени опубликовано более 14000 статей [371]. Примеры аптамеров найдены в живых системах: так, существуют 5'-НТО элементы РНК, способные специфически связываться с молекулами-мишенями. Результатом такого взаимодействия может служить изменение конформации нижележащей экспрессионной платформы РНК. В свою очередь изменение конформации приводит либо к активации (доступности различных белковых факторов, участвующих в транскрипции и трансляции молекулы РНК), либо к инаktivации функциональных свойств РНК (переключение). При этом отмечается, что экспрессионная платформа может находиться в двух взаимоисключающих состояниях. Вследствие этого данные элементы и получили название рибопереключателй или рибосвитчи [180].

Наиболее широко данные элементы представлены в бактериальном мире РНК. Поскольку молекулы РНК или ДНК редко находятся в линейном (развернутом или свободном) состоянии, а наоборот, обычно упакованы в специальные структуры. Структурно рибосвитчи состоят из двух доменов. Первый – это участок связывания с молекулой-мишенью, который укладывается определенным образом, формируя специальный карман для связывания с целевой молекулой. Как и в случае иммуноглобулинов с их молекулами-мишенями, аптамерные регионы молекулы РНК умеют отличать целевую молекулу от химически родственных метаболитов, вызывая соответствующий регуляторный ответ на сигнал [266].

Второй домен 5'-НТО – это экспрессионная платформа, которая содержит структурный переключатель. Она свою очередь осуществляет взаимодействие с транскрипционным или трансляционным аппаратом. Регуляция данным элементом достигается за счет влияния конформации (вторичной структуры

спаривания нуклеотидов) аптамерной части на вторичную структуру экспрессионной части рибосвитча. Переключение происходит на два взаимоисключающих структурных состояния – включения и выключения экспрессионных функций РНК. Регуляция переключения достигается за счет области перекрытия между двумя основными доменами рибопереклювателя. Спаривание последовательности переключения направляет сворачивание РНК в одну из двух взаимоисключающих структур в платформе экспрессии, что и представляет включенное или выключенное состояние мРНК. Структурный анализ и анализ последовательностей комплекса аптамерной и экспрессионной платформы известных рибопереклювателей показал схожие принципы организации архитектурного построения молекулы [190, 345].

При этом нужно учитывать, что формирование третичной структуры аптамерного региона рибопереклювателя должно формировать свою рабочую архитектуру в короткий промежуток времени, избегая слишком долгого или неправильного конформационного состояния, поскольку такое промедление или ошибка может ослабить реализацию надлежащей регулировки реакции (ответа). Это обычно бывает ключевым моментом в регуляции любого сигнального процесса. Так, SAM-I рибопереклюватель регулирует жизненно важный биосинтез метионина или цистеина грамположительных бактерий [71, 193, 238]. Лизиновый рибопереклюватель регулирует экспрессию собственного гена при связывании лизина посредством механизма негативной регуляции транскрипции у *Thermotoga maritima* и *Bacillus subtilis* lysC [100, 321]. Поскольку рибопереклюватели описаны для трех доменов жизни, это может указывать на их древнее происхождение.

Аптамеры с аффинными свойствами к молекулам-мишеням могут стать достойной заменой при решении как диагностических, так и научных задач [108, 262]. Существуют примеры, показывающие возможность замены иммуноглобулинов на аптамеры в методе ELISA (ИФА, иммуноферментный анализ), вестерн-блоттинге, флуоресцентной гибридизации *in situ* [60, 87, 385]. Создание чипов для диагностики с одновременной детекцией целевых белков из

смеси кажется вполне перспективной и реализуемой стратегией по замене иммуноглобулинов. К этому можно добавить и возможность аффинной очистки молекул-мишеней, а также специфического ингибирования белков-мишеней [270]. Аптамеры могут быть широко использованы как в методах детекции различных метаболитов, токсинов, белковых факторов, так и в выявлении специфических типов клеток или целых болезнетворных микроорганизмов [203, 215]. К сожалению, на сегодняшний день пока только два аптамера получили разрешение от сообщества FDA на применение в качестве терапевтического средства. Это аптамеры для лечения дегенерации желтого пятна и пегаптаниб (блокирующий фактор роста эндотелия сосудов, Macugen); другие аптамеры находятся на стадии клинических испытаний [89, 90].

Наиболее перспективным кажется создание микрочипов, которые будут содержать в своем составе большое количество аптамеров для большого количества молекул-мишеней с целью получения наиболее полной картины состояния человека [121, 237]. Так, описан микрочип, позволяющий провести анализ некоторых факторов роста в крови человека [275].

Создание микрочипов к как можно большему количеству различных мишеней, несомненно, окажет огромное влияние как на развитие методов диагностики различных заболеваний, так и на фундаментальные исследования. Скорейшее получение информации о процессах, происходящих во время патологических реакций организма, позволит получить более правильную и детальную картину происходящих процессов, понимание которых приведет к скорейшей постановке диагноза и назначению наиболее адекватного метода лечения, что может спасти жизни пациентам, так как фактор времени зачастую является решающим. Расширение инструментов анализа процессов, происходящих при различных заболеваниях, позволит улучшить систему мониторинга и контроля за состоянием пациентов.

Показано, что на основе аптамеров могут быть получены высокоэффективные и очень специфичные ингибиторы белков-мишеней [99, 148, 317, 370]. Также, кроме непосредственного применения аптамеров в качестве

специфических ингибиторов, возможно и их применение для поиска новых ингибиторов различных белков. Для этого проводится направленный поиск молекул, конкурирующих с аптамером-ингибитором за связывание с белком-мишенью, которые взаимодействуют с тем же самым участком белка, что и аптамер [109]. В качестве таких мишеней могут выступать различные факторы роста, гормоны [106, 271, 288], ферменты [116], рецепторы на клеточной поверхности [90, 258], токсины [258], белки вирусов и патогенных микроорганизмов [59, 90, 395].

Поскольку аптамеры обладают высоким сродством и специфичностью к определенной молекуле-мишени, то аптамеры могут стать эффективными ингибиторами для данных мишеней. Так, на данный момент несколько препаратов на основе аптамеров проходят клинические испытания в кардиоваскулярной терапии [349].

В качестве *in vivo* терапии аптамеры являются многообещающими аффинными агентами, сопоставимыми по специфичности с антителами [258]. Однако, как и любое терапевтическое средство, аптамеры имеют свои ограничения. **Во-первых**, доставка аптамера во внутриклеточное пространство является трудноразрешимой задачей [216]. По этой причине мишенями большинства из найденных аптамеров являются внеклеточные молекулы, такие как мембранные белки рецепторов, гормоны, нейропептиды, факторы свертывания крови [271]. **Во-вторых**, это нестабильность аптамеров в организме, вызванная их расщеплением нуклеазами, которые находятся в сыворотке крови. Чтобы сделать аптамеры более устойчивыми к действию нуклеаз *in vivo*, они могут быть различным образом модифицированы такими модификациями, как 2'-аминопиримидины [142], 2'-фтор-27-пиримидины [142] и 2'-О-метилрибозы пуринов и пиримидинов [54, 146]. Описан случай, когда модифицированный 2'-оксиметильной группой аптамер был стабилен в плазме крови человека до 15–24 часов [112]. Данные модификации позволяют увеличить время циркуляции аптамера в системе кровообращения [106]. В других экспериментах показано, что блокирование 3'-конца олигонуклеотида имело большее значение,

чем блокирование 5'-конца; это говорит о том, что 3'-эксонуклеазная активность в сыворотке крови значительно выше, чем 5'-эксонуклеазная. Клиническими испытаниями показано, что аптамеры – это молекулы с низкими или отсутствующими иммуногенными свойствами, при этом они обладают низкой токсичностью [169, 170]. **В-третьих**, из-за низкой молекулярной массы и размеров аптамеры достаточно быстро выводятся почками из организма. Чтобы минимизировать этот недостаток, существуют модификации по добавлению PEG-молекул к аптамеру [144, 390].

Благодаря свойственной гибкости аптамеров, а также различным вариантам их отбора, существует возможность получения аптамеров практически к любой молекуле-мишени. Как ранее показано, можно провести отбор аптамеров между двумя белками, которые отличаются по нескольким аминокислотам. Еще одной положительной чертой аптамеров является возможность подбора антитота к определенному аптамеру благодаря Уотсон-Криковскому взаимодействию, что позволяет модулировать работу аптамера. Антитоты на основе олигонуклеотидов способны распознавать и связываться с первичной последовательностью аптамера, приводя к нарушению структуры аптамера [251].

Модифицированные аптамеры можно получить двумя альтернативными подходами. Первый заключается в использовании заранее модифицированных аптамеров при непосредственном отборе с молекулой-мишенью. Главное ограничение этого метода заключается в том, что модификация не должна значительным образом влиять на способность нуклеотида служить субстратом для РНК- или ДНК-полимераз, посредством которых происходит амплификация обогащенного пула выродженных олигонуклеотидов. Второй подход – это внесение химических модификаций в уже полученные аптамеры к молекуле-мишени. В данном случае значительно увеличивается разнообразие доступных модификаций. Однако введение таких изменений должно происходить осознанно, с подтверждением структурных изменений аптамера, поскольку некоторые изменения структуры аптамера могут приводить к уменьшению сродства аптамеров к их мишеням.

Модификации аптамеров могут преследовать две основных цели. Первая – это увеличение потенциального разнообразия нуклеотидов, модификации которых могут обеспечить большее количество контактов между аптамерами и их мишенями, что, вероятно, позволит получить аптамеры с большей аффинностью или специфичностью [375, 389]. Вторая цель заключается в повышении устойчивости аптамеров к воздействию нуклеаз. Особенно эффективными являются модификации в 2'-положении рибозы при введении F- или NH₂-группы. Данные модификации позволяют добиться стабильности аптамеров в отношении нуклеаз и вследствие этого расширить их применение в диагностических и терапевтических целях [218, 284, 349].

Еще одним способом повышения стабильности аптамера является использование шпигельмеров (spiegelmers) [182]. Шпигельмеры – это аптамеры, в которых природные остатки сахара заменены на зеркальные аналоги. Шпигельмеры очень устойчивы к действию нуклеаз, однако сложность их получения очень высока, и использование такого подхода, по-видимому, не совсем оправдано.

В дополнение к нуклеазной деградации аптамеры подвержены почечной элиминации. Типичное время полураспада аптамера при внутривенном введении половины образца составляет менее 10 минут, поэтому время циркуляции аптамера может быть повышено путем увеличения молекулярного веса олигонуклеотидов выше эффективного размера отсечки, характерного для почечных клубочков [273]. Конъюгирование аптамера с 20–40 кДа полиэтиленгликолем (PEG, процедура пегилирования) может значительно увеличить время пребывания аптамеров в крови, в то время как данная модификация незначительно влияет на способность связываться с белками-мишенями [79, 273]. Добавление PEG к 2'-фторпиримидиновым аналогам ДНК-аптамеров к сосудистому фактору роста эндотелия приводит к увеличению срока жизни аптамера более чем до 9 часов в плазме после внутривенных инъекций [143]. Аптамеры, которые несут на 5'-конце полиэтиленгликоль размером 40 кДа, имеют период полураспада порядка одного дня при исследовании на крысах [145]

и до 10 дней в организме человека для pegaptanib (macugen; Pfizer/Eyetech). Таким образом, увеличение молекулярного веса аптамера посредством образования ковалентной связи с полимером может сделать аптамеры пригодными для терапии, при этом необходимо тщательно контролировать фармакокинетику для оценки скорости выведения и возможного накопления аптамеров в различных органах в каждом конкретном случае.

Поскольку аптамеры обладают очень широким потенциалом использования, к настоящему времени они нашли очень широкое применение в различных областях. Аптамеры используют для измерения концентрации различных метаболитов и белковых факторов [116], обнаружения токсинов, выявления специфических типов клеток и тканей [174], клеток болезнетворных микроорганизмов [203], а также при использовании для аффинной очистки и идентификации различных белков-мишеней [269].

В сравнении с антителами аптамеры имеют ряд преимуществ, которые позволят им стать достойной заменой некоторых антител. Производство и отбор аптамеров происходит *in vitro*, без использования культуры клеток и животных. При этом условиями синтеза и отбора аптамеров можно манипулировать так, чтобы получать аптамеры с наиболее удобными свойствами. Синтез аптамеров является отработанным и надежным методом, который позволяет получать молекулы с необходимой чистотой. При этом по качеству готовые аптамеры от партии к партии не будут сильно отличаться. Немаловажным является то, что аптамеры могут быть модифицированы различными сигнальными молекулами. Например, модификация аптамеров флуоресцентными метками или биотином может не повлиять на изменение аффинности молекул [284]. В отличие от иммуноглобулинов, аптамеры не обладают необратимой денатурацией. Восстановление аптамеров возможно в течение нескольких минут, с помощью стандартного лабораторного оборудования. Аптамеры неприхотливы к условиям хранения и при соблюдении стерильности могут транспортироваться при комнатной температуре, не требуя охлаждения. Время и стоимость производства аптамеров значительно меньше по сравнению с антителами,

а процедура отбора аптамера к молекуле-мишени занимает меньше времени, чем для антител [209].

Как показывают некоторые исследовательские работы, применение аптамеров в терапевтических целях кажется вполне возможным. Так, РНК-аптамеры и их модифицированные производные блокируют связывание фактора роста фибробластов (bFGF, basic fibroblast growth factor) с мембранными рецепторами при крайне низкой концентрации (1 нМ) [209]. РНК-аптамеры к везикулярному фактору роста эндотелия подавляют его связывание с рецептором при концентрации в 20–40 нМ [198]. Аптамеры тромбина способны подавлять коагуляцию крови [343]. Аптамеры к иммуноглобулину E блокируют опосредованную секрецию серотонина в культуре клеток [195]. Аптамеры к человеческой нейтрофильной эластазе ингибируют интерлейкин-1-индуцированную, нейтрофил-опосредованную деградацию легочной ткани у крыс [204]. В исследованиях A. Muharemagic et al. (2014) показана возможность маскирования с помощью аптамеров поверхности вируса везикулярного стоматита [88]. Аптамеры к поверхности белков вируса саркомы Рауса способны подавлять вирусную инфекцию [214]. Аптамеры к изоферментам протеинкиназы C, имеющие 96 % гомологии друг к другу, способны дифференциально связываться с ними [215]. Эти и многие другие работы наглядно демонстрируют возможности терапевтического применения аптамеров.

1.3.2 Отбор аптамеров (SELEX)

Метод отбора аптамеров к молекуле-мишени разработан двумя независимыми группами в 1990 году, который получил название SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, или систематическая эволюция лигандов при экспоненциальном обогащении), а нуклеиновые кислоты, которые селективно связывались с мишенью, стали называть аптамерами [158, 371]. Аптамеры могут быть созданы на основе РНК или ДНК. При этом получение РНК-аптамеров происходит немного сложнее, чем ДНК [136, 158]. Отбор аптамеров не имеет строгих рамок, а сам отбор может быть адаптирован

под каждую конкретную молекулу-мишень (Рисунок 3). Стадии отбора аптамеров могут быть модифицированы в зависимости от целей и возможностей конкретного ученого. Также не существует ограничений к целевым молекулам. Это могут быть молекулы различного размера, начиная от небольших белков, вирусов, клеток или даже целых тканей [224, 342].

Первым этапом в отборе аптамеров происходит синтез библиотеки случайных (вырожденных) олигонуклеотидных последовательностей, длиной 80–100 пар оснований, которые в свою очередь фланкированы константными регионами (праймеры). Праймерные последовательности необходимы при проведении реакции амплификации при отборе аптамеров. Синтезированную вырожденную библиотеку одноцепочечных ДНК (оцДНК) инкубируют с молекулами-мишенями. Как правило, для связывания с мишенью используют библиотеку в концентрации от 1×10^{13} до 1×10^{15} молекул [222]. В большинстве случаев целевые молекулы иммобилизованы на носителе, чтобы обеспечить дальнейшее отделение олигонуклеотидов, которые образуют комплексы с мишенью, в отличие от несвязавшихся олигонуклеотидов. Немаловажным моментом при отборе аптамеров является включение специальных стадий контрселекций, которые повышают специфичность связывания аптамера. Также с помощью контрселекции можно исключить аптамеры, которые не должны проявлять аффинность к аналогам или изомерам молекул-мишеней [297]. При помощи тонкой настройки отбора аптамеров возможно разделение строго специфичных последовательностей аптамеров со специфичностью белков, находящихся в одном классе, но отличающихся рядом аминокислот. Это позволит избежать ложноположительных сигналов диагностики близкородственных белков. Существуют работы, описывающие отбор аптамеров, с разделением на группы, которые способны к аффинному связыванию различных эпитопов одного белка [316]. Такие исследования могут стать полезным инструментом в оказании влияния на молекулу-мишень в определенном участке, избегая лишней кросс-реактивности по нежелательным локусам молекулы-мишени.

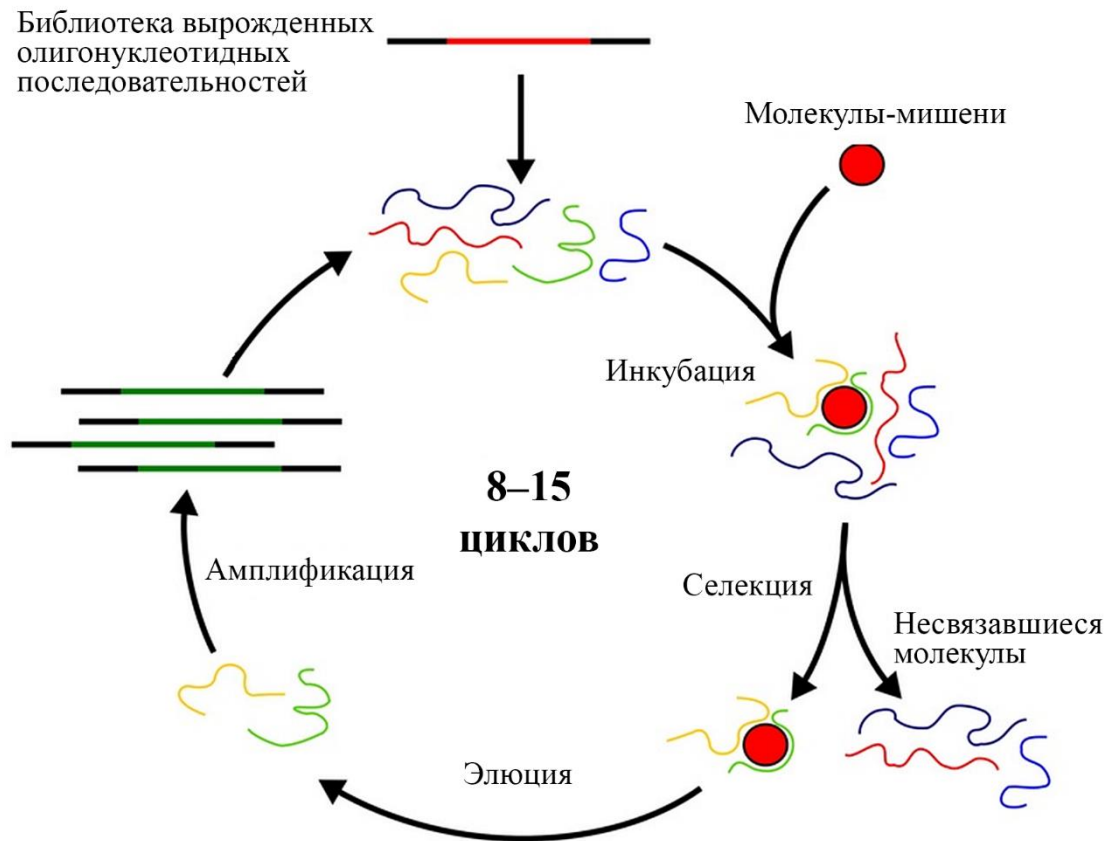


Рисунок 3 – Упрощенная схема отбора аптамеров

Несвязавшиеся последовательности удаляют от иммобилизованной мишени промывкой буферным раствором. Пул аптамеров, сформировавших комплекс с целевыми молекулами, амплифицируют с помощью ПЦР. Отобранный пул аптамеров после очередного раунда отбора очищают в агарозном или в полиакриламидном геле, а очищенный ПЦР продукт служит матрицей в следующем раунде отбора. Итерации связывания, разделения, амплификации и регенерации пула повторяются до тех пор, пока полученный пул нуклеиновых кислот не будет достаточно обогащен последовательностями, способными связывать мишень. Обычно, чтобы получить достаточно обогащенный пул аптамеров, требуется от 5 до 15 раундов отбора. Двухцепочечные молекулы аптамеров, полученные после завершения последнего раунда, секвенируют и подвергают биоинформационному анализу. Исходя из первичных нуклеотидных последовательностей, моделируют вторичные структуры полученных аптамеров. Далее на основе наиболее перспективных последовательностей синтезируют

искусственные олигонуклеотиды, для которых оценивают константы диссоциации, отражающие силу аффинного связывания с молекулами мишенями.

Поскольку строгого протокола отбора аптамеров не существует, каждый ученый адаптирует его под свои цели и задачи. Поэтому существует огромное множество вариаций данного метода как по способу контрселекции, так и по способу отделения связавшихся аптамеров от несвязавшихся. Например, существует метод одностадийного отбора с использованием поливиниловых мембран и фермента дезоксирибонуклеазы (DNase I) [149]. Такая стратегия дает скорейшее получение специфичного аптамера к молекуле-мишени, так как молекулы ДНК, неплотно прилегающие к мишени, подвергаются эндонуклеазной рестрикции. Известны различные методы с применением в отборе специальных модифицированных олигонуклеотидов. Такие олигонуклеотиды могут содержать различные функциональные группы, способные активироваться при освещении. Введение 5-йод-, 5-бром- и 4-тио-уридина может приводить к формированию ковалентных сшивок с белком-мишенью (фотоаптамеры); такой способ отбора иногда называют «ковалентный» SELEX [275]. Кроме того, аффинный аптамер, полученный в процессе отбора, может быть различными методами модифицирован в целях увеличения свойств аффинности или ингибирования функций мишени.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

Для определения прямого вирулицидного действия образцов использовали изолят ВКЭ сибирского субтипа 92М [8]. При наработке вирусной суспензии использовали культуру клеток СПЭВ. Концентрация инфекционного вируса в стоковой суспензии определяли титрованием бляшкообразующих единиц (БОЕ) в культуре клеток СПЭВ [183], которую выражали в виде десятичного логарифма БОЕ на миллилитр суспензии (lg БОЕ/мл).

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

В работе использованы материалы шести лекарственных растений, которые используются в традиционной тибетской медицине – гипекоум прямой *Hypocois erectum* L. (1753), змеевик большой *Polygonum bistorta* L. (1753), харитаки *Terminalia chebula* Retz. (1788), горечавка лежачая *Gentiana decumbens* L.f. (1782), шлемник байкальский *Scutellaria baicalensis* Georgi (1775), момордика кохинхинская *Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng. (1826). Препараты семян и частей растений любезно предоставлены N. Oyuntsetseg (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 N. Oyuntsetseg et al. [165]. Для приготовления отвара брали 30 г каждого препарата растительного происхождения, который помещали в 200 мл дистиллированной воды, и приготавливали отвар путем кипячения на слабом огне до тех пор, пока общий объем жидкости был равен 100 мл. Отвар процеживали через марлю, затем

центрифугировали при 2700 об./мин в течение 5 минут, после чего проводили фильтрование через ряд грубых фильтров. Те препараты растений, которые при 30%-м растворе получились слишком густыми (*G. decumbens*), использовали 10%-й отвар. Полученные отвары стерилизовали фильтрацией через шприцевой фильтр 0,22 мкм. Финальные растворы отваров хранили при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до использования.

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-олигонуклеотидов получен путем прямого синтеза (ЗАО Евроген, Москва). Концентрация исходной одноцепочечной библиотеки, взятая в первый раунд отбора, составила 1200 рМ. Центральный рандомизированный фрагмент длиной 40 н. о. фланкирован адаптерами последовательностями в 20 н. о. под праймеры (5'-СТССТС ТГАСТГТААССАСГ-3' и 5'-GGСТТСТGG СТАССТАТГС-3'). В качестве мишени для позитивной селекции использовали изолят ВКЭ сибирского субтипа 92М [8]. Перед первым раундом отбора библиотеку одноцепочечных ДНК термически денатурировали в течение 5 минут при $96\text{ }^{\circ}\text{C}$ в буфере, после чего ренатурировали в ледяной бане в течение 5 минут. Перед непосредственной инкубацией с мишенью денатурированную библиотеку ДНК инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут.

2.2 Методы

2.2.1 Проведение жидкостной хроматографии

В работе использовано нормально-фазовое хроматографическое разделение многокомпонентных смесей на силикагеле. В качестве подвижной фазы использовали разные по силе элюции растворители. Так, нами проверены следующие подвижные фазы: вода, 60%-й ацетонитрил, 85%-й ацетон. В качестве стационарной фазы использовали 50 г силикагеля диаметром 0,060–0,2 мм (70–

230 mesh, Alfa Aesar, США). Силикагель выравнивали элюентом, после чего происходило нанесение 30 мкл 30%-го раствора растительного экстракта в подвижной фазе. Сбор фракций происходил в отдельные пробирки объемом 0,6 мл. Удаление подвижной фазы производили путем инкубации пробирок при 70 °С в течение 30–45 минут. Затем в каждую пробирку вносили по 300 мкл $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$, после чего подготовленные препараты фракций проверяли на вирулицидное действие к ВКЭ.

2.2.2 Проведение высокоэффективной жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии

Высокоэффективную жидкостную хроматографию выполняли с использованием обращенно-фазовой колонки Zorbax 300 SB-C18 (Agilent, США) с размерами 21×150 мм и размером частиц 5 мкм и системой Shimadzu LC30 Nexera X2 (Shimadzu, Япония), которая снабжена диодно-матричным детектором Shimadzu SPD-M20A и tandemным трехквadrupольным масс-селективным детектором 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 скоростью потока 0,5 мл/мин. Объем 30%-го экстракта препаративного вкола образца был 50 мкл. Программа градиентного подъема элюента представлена на рисунке 4. Сбор фракций проводили в течение 30 секунд, по 250 мкл, 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 $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$. Всего получено 125 фракций. Полученные препараты от фракций анализировали на вирулицидное действие.

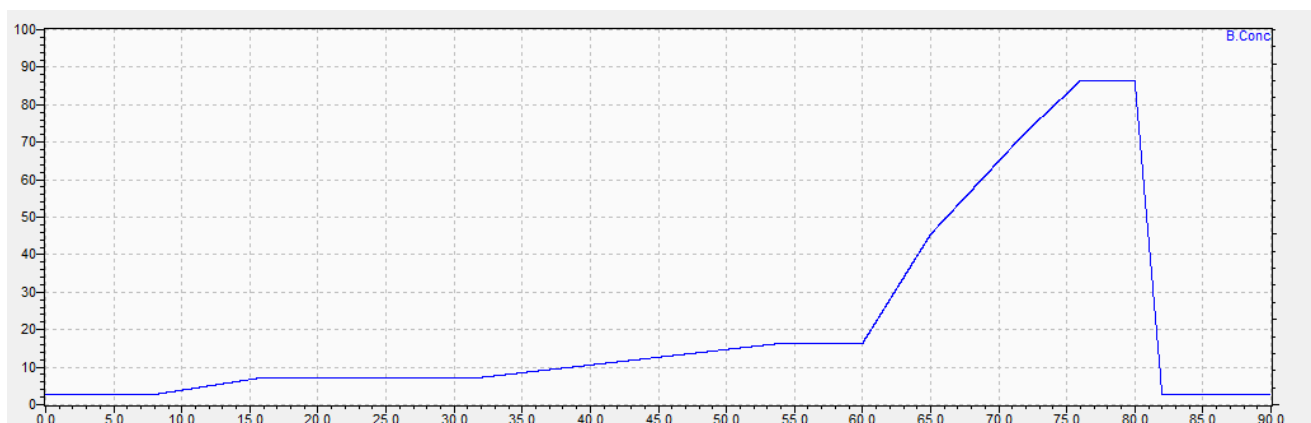


Рисунок 4 – Программа градиента подвижной фазы для препаративного разделения на ВЭЖХ. Система хроматографического разделения Shimadzu LC30 Nexera X2 (Shimadzu, Япония), колонка Zorbax 300 SB-C18. Подвижная фаза вода/ацетонитрил с 0,1 % муравьиной кислоты. По горизонтальной оси – длительность разделения в минутах; по вертикальной оси – соотношение ацетонитрила к воде в процентах; синяя линия – процентное соотношение концентрации ацетонитрила в подвижной фазе с течением времени

2.2.3 Определение инфекционной активности вируса по бляшкообразующим единицам

В нашей работе мы использовали изолят 92М ВКЭ сибирского подтипа [8]. 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» (ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия). Культуру клеток поддерживали на среде RPMI 1640 с добавлением антибиотиков и 5 % фетальной телячьей сыворотки (Thermo Fisher Scientific, США). Серийные десятикратные разведения суспензии ВКЭ в RPMI наносили на монослой клеток СПЭВ в соответствующие лунки 24-луночной планшеты. Объем инокулята составлял 250 мкл. После 30 мин адсорбции при 37 °С инокуляты удаляли, а монослой клеток заливали средой поддержки (RPMI 1640 с 2 % фетальной телячьей сыворотки и 1 % агарозы (SeaPlaque, Cambrex, США)). Затем планшеты инкубировали в течение 5 дней при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. По завершении инкубации клетки

фиксируют в 10%-м формалине в течение 2 часов, промывают водой и окрашивают 0,05%-м раствором кристаллического фиолетового в дистиллированной воде. Концентрацию инфекционного вируса в исходной суспензии определяют путем титрования БОЕ в культуре клеток и выражают 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.

2.2.4 Оценка индекса вирулицидности

Прямое вирулицидное действие – это действие препарата непосредственно на вирусные частицы, которое приводит к инаktivации инфекционности вируса. Оценку прямого вирулицидного действия проводили по методике реакции нейтрализации по Э. Гоулду [183] с модификациями. В частности, 100 мкл суспензии вируса, содержащей 5×10^4 БОЕ TBEV, 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. Стерильная бидистиллированная вода использовалась в качестве референс-образца. Смесь ВКЭ и образец инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. Культуру клеток выдерживали 3 суток в CO₂-инкубаторе при 37 °С, после чего клетки фиксируют 10%-м формалином. Окрашивание монослоя клеток проводили 0,05%-м раствором кристаллического фиолетового. Определение концентрации инфекционного вируса проводили подсчетом БОЕ в каждом эксперименте. Индекс ингибирования определяли как разницу титров (в логарифмическом выражении) исследуемого и контрольного образцов. Каждый эксперимент проводился в трех независимых повторах.

2.2.5 Определение цитотоксического действия проб на культуру клеток

Монослой культуры клеток СПЭВ в 24-луночных планшетах, выращенных в питательной среде RPMI 1640, с добавлением 5 % фетальной бычьей сыворотки

и добавлением антибиотиков (пенициллин G 500 ЕД/мл, стрептомицин 100 мкг/мл) инкубировали со 100 мкр тестируемых образцов в серии двукратных разведений в течение 3 суток в CO₂-инкубаторе при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. Концентрация фетальной бычьей сыворотки в поддерживающей среде была снижена до 2 %. Количество клеток, используемых в экспериментах, составило 10⁴ кл/мл. Параллельно инкубировали контрольные образцы клеток, в которых вместо тестируемых компонентов использовали стерильный фосфатно-солевой буфер в соответствующих разведениях. Эксперимент воспроизводили в 3 независимых повторах. Через 3 дня среду поддержки убирали, монослой клеток промывали стерильным фосфатно-солевым буфером и фиксировали 10%-м формалином в течение 12 часов. Фиксированный монослой клеток окрашивали в течение 30 минут кристаллическим фиолетовым (0,05%-й водный раствор). 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).

Предельной допустимой концентрацией препарата, считали ту, при которой сохранялись единичные выжившие клетки. Исследование проводили с помощью прямой световой микроскопии фиксированных и окрашенных монослоев. 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.

2.2.6 Сравнение ингибирования веществ при ко-инкубации с зараженной культурой клеток

Монослой культуры клеток СПЭВ заражали 5×10^4 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 образцов аналогично этапам проверки цитотоксического действия препаратов. Клетки инкубировали в течение 3 суток в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С. Далее культуральную среду собирали и определяли количество инфекционного вируса титрованием БОЕ. Индекс ингибирования рассчитывали как разницу титров ВКЭ (в логарифмическом выражении) в исследуемом и контрольном образце.

2.2.7 Проведение отбора ДНК-аптамеров (SELEX)

Синтезированную библиотеку вырожденных олигонуклеотидов объемом 24 мкр и концентрацией 50 рМ/мкр, растворяли в 150 мкр 1х фосфатно-солевого буфера (ФСБ) (рН 7,4) с 20 мМ HEPES, 3 мМ MgCl₂. Далее библиотеку в буфере для инкубации нагревали до 96 °С в течение 3 минут, затем раствор переносили в ледяную баню на 5 минут. После чего следовала инкубация при комнатной температуре в течение 15 минут.

Подготовленный раствор пула аптамеров переносили в 1 мл культуральной жидкости RPMI с изолятом ВКЭ 92М (5×10^4 БОЕ). Инкубация проводилась в течение 30 минут при 37 °С, после чего получившийся объем переносили в центрифужные концентраторы Vivaspin 6 (Sartorius, Германия) с отсекающей массой в 100 кДа. Объем смеси доводили до 6 мл 1х раствором ФСБ (рН 7,4), проводили пипетирование, после чего проводили центрифугирование при 2700 об./мин на настольной центрифуге Элекон ЦЛМН-Р10-01 в течение 15 минут. Объем верхней камеры доводили до 6 мл 1х раствором ФСБ (рН 7,4), пипетировали и проводили центрифугирование. Повторяли раунды отмывки/центрифугирования шесть раз. Сконцентрированный объем из верхней камеры (~150 мкр) служил матрицей для наработки двухцепочечного ДНК-аптамера. В реакционную смесь брали 5 мкр в реал-тайм ПЦР с раститровками (Forward Aptamer Primer – 5'-СТССТСТГACTGTAACCACG-3', Reverse Aptamer Primer – 5'-GGСТТСТGGACTACСТАТGC-3'). ПЦР проводили на реал-тайм амплификаторе

Realtime CFX (Bio-Rad, США) с детекцией увеличения сигнала интеркалирующего красителя SYBR Green. Реакцию амплификации проводили до насыщения второй раститровки. Условия амплификации включали предварительный прогрев смеси при 96 °С в течение 3 мин с последующими 25 циклами ПЦР: 96 °С в течение 10 с; 60 °С в течение 20 с; 72 °С в течение 40 с. Реакционная смесь составлена на основе набора «Encyclo PCR» (ЗАО Евроген, Москва) в объеме 25 мкл. По завершении реакции амплификации проводили электрофорез в 2%-м агарозном или в 12%-м полиакриламидном геле с использованием маркера молекулярного веса (100 bp DNA Ladder, Invitrogen), в 1х трисборатном буфере при напряжении 50 В/см. Полосу с предполагаемой массой вырезали и использовали в качестве матрицы для наработки одноцепочечного ДНК-аптамера. Нарботка оцДНК проводилась методом неравновесного ПЦР с 50х преобладанием одного из праймеров. Фрагмент оцДНК очищали от реакционной смеси с помощью электрофореза в 2%-м агарозном геле (Рисунок 5); вырезанный фрагмент оцДНК очищали с помощью набора для очистки ДНК QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Германия).

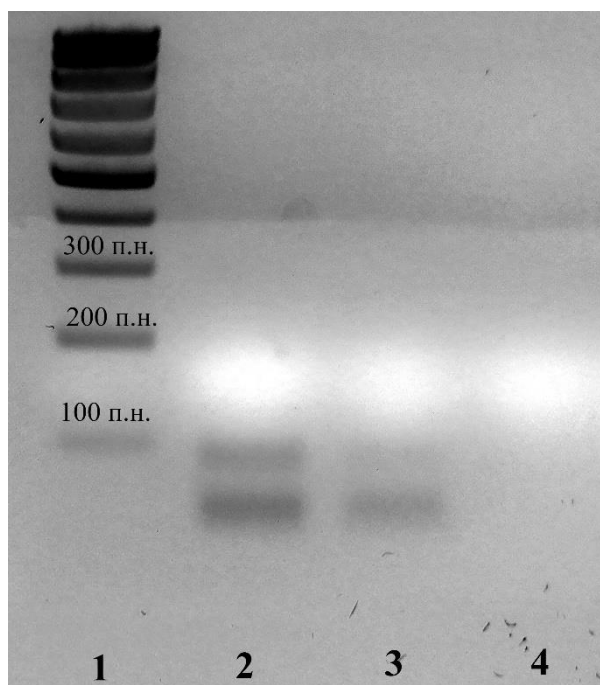


Рисунок 5 – Электрофорез ДНК-аптамеров в 2%-м агарозном геле:
1 – маркер молекулярного веса; 2, 3 – ПЦР-продукт наработки оцДНК
(нижняя полоса); 4 – отрицательный контроль ПЦР

Подготовку и раунды отбора аффинного оцДНК проводили по вышеописанной процедуре. Процедуру отбора суммарно проводили семь раз. Восьмой раунд отбора проведен к вирусу в колодцах планшета через иммобилизованные моноклональные антитела к ВКЭ (тест-система «ВектоВКЭ-антиген», Вектор Бест, Новосибирск). Для этого 100 мкл суспензии вируса (5×10^4 БОЕ) вносили в лунку и инкубировали 1 час на термошейкере на 400 об./мин при температуре 26 °С. После этого лунки промывали 5 раз 400 мкл буфера для промывок. Затем добавляли 100 мкл оцДНК-аптамера, проводили инкубацию 30 минут при 37 °С, после чего несвязавшиеся последовательности отмывали буфером для промывок. Связавшиеся последовательности аптамера выделяли с планшета с помощью комплекта для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва). Осадок после выделения нуклеиновых кислот растворяли в 100 мкл diH_2O . 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 в вектор (Рисунок 6).

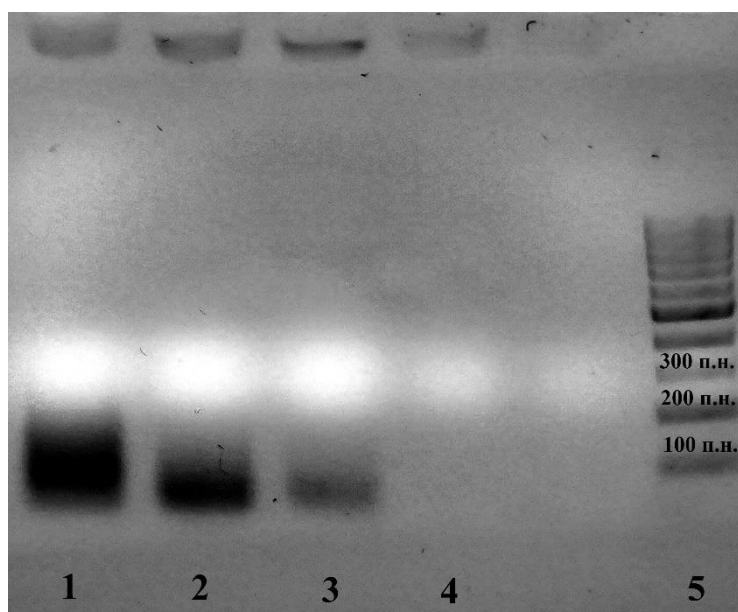


Рисунок 6 – Электрофорез ДНК-аптамеров в 2%-м агарозном геле:

1–3 – дцДНК-аптамера с 20-кратным титрованием матрицы; 4 – отрицательный контроль ПЦР; 5 – маркер молекулярного веса

2.2.8 Клонирование и секвенирование библиотеки аптамеров

Клонирование проводили в химически компетентные клетки *E. coli*, 10 мкл лигазной смеси набором CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Для этого к 6,5 мкл фрагменту ПЦР добавляли 2 мкл 5-кратного буфера для лигирования, далее вносили 1 мкл плазмиды pJET1.2/blunt и 0,5 мкл фермента лигазы. Реакционную смесь оставляли на 1 час при комнатной температуре, после чего проводили трансформацию клеток. Трансформацию осуществляли следующим образом. Подращенную ночную культуру *E. coli* XL1 Blue, 100 мкл пересеивали в 10 мл среды LB (на 1 л среды LB: 10 г Васто триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 10 г NaCl) и инкубировали 2 часа на 250 об./мин при температуре 37 °С. После этого 1,5 мл клеток переносили в пробирки для центрифугирования, в которых проводили центрифугирование в течение 5 минут со скоростью 5000 об./мин. Далее супернатант удаляли, а клетки промывали 800 мкл раствора 0,1 М CaCl₂; клетки выдерживали 30 минут при температуре 2,5 °С. Затем клетки осаждали в течение 5 минут со скоростью 5000 об./мин. Супернатант удаляли, а клетки суспендировали в 100 мкл раствора 0,1 М CaCl₂; клетки оставляли на 30 минут при температуре 2,5 °С. По истечении времени в клетки добавляли 10 мкл лигазной смеси, инкубировали в течение 15 минут при 2,5 °С. После этого клетки подвергали тепловому шоку, инкубацию проводили 90 секунд при 42 °С. К клеткам добавляли 1 мл среды LB с 10%-м раствором глюкозы; подращивали клетки 1 час при 37 °С в шейкер-инкубаторе ES-20 (Biosan, Латвия) на скорости 250 об./мин. Клетки высевали на чашки с антибиотиком, которые оставляли в термостате при 37 °С. Отдельные клоны бактериальных колоний с чашек переносили в 50 мкл 1x TE буфер. 1 мкр суспензии клонов использовали на 25 мкл ПЦР-смеси. Реакцию амплификации проводили с плазмидных праймеров к pJET1.2/blunt (Forward Sequencing Primer – 5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3', Reverse Sequencing Primer – 5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'). Условия амплификации включали предварительный прогрев смеси при 95 °С в течение 3 мин с последующими 35 циклами ПЦР: 95 °С в течение 10 с; 57 °С в течение 20 с; 72 °С в течение 50 с.

Полученные от амплификации ПЦР-продукты разделяли в 2%-м агарозном геле, ДНК-фрагменты нужной длины вырезали и использовали в качестве матрицы для секвенирования. Для определения нуклеотидной последовательности аптамеров использовали плазмидные праймеры (pJET1.2/blunt), а также набор соответствующих реагентов для секвенирования по методу Сенгера с помощью капиллярного секвенатора Нанофор 05 (НЦ ПЗСРЧ, Иркутск) и набора красителей BigDye (Thermo Fisher Scientific, США). Амплификация включала предварительный прогрев смеси при 95 °С в течение 3 мин с последующими 33 циклами ПЦР: 95 °С в течение 20 с; 60 °С в течение 1 мин. Ампликоны осаждали этанолом в присутствии солей ацетата натрия. Пробы растворяли в 10 мкл SLS буфера.

2.2.9 Оценка вирулицидной активности последовательностей аптамеров к вирусу клещевого энцефалита

Проверка прямого ингибирования вируса клещевого энцефалита проводилась в соответствии с Э. Гоулдом [184]. Одноцепочечные последовательности выбранных последовательностей тестируемых аптамеров получены с помощью химического синтеза. Концентрация аптамеров в 100 мкл составляла 100 пикомоль. Перед непосредственной инкубацией аптамера с вирусом аптамер подвергался термической денатурации в течение 3 минут при 96 °С. По завершении инкубации пробирку с пулом аптамера сразу переносили на лед на 5 минут, после чего аптамер выдерживали 15 минут при комнатной температуре, далее 100 мкл суспензии вируса (5×10^4 БОЕ) смешивали со 100 мкл аптамера. В качестве контроля нейтрализации использовали донорский иммуноглобулин G человека против ВКЭ (ФГУС «НИЦ Микроген», Томск) в концентрации 1 мг/мл. Стерильная бидистиллированная вода использована в качестве контрольного образца. Смесь вируса и образец инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. Культуру клеток выдерживали 3–5 суток, в CO₂-инкубаторе при 37 °С, после чего клетки фиксировали 10%-м формалином. Окрашивание монослоя клеток проводили 0,05%-м раствором

кристаллического фиолетового. Определение концентрации инфекционного вируса проводили подсчетом БОЕ в каждом эксперименте. Индекс ингибирования определяли как разницу титров (в логарифмическом выражении) исследуемого и контрольного образцов. Каждый эксперимент проводили в трех независимых повторах.

2.2.10 Статистическая обработка данных

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 Office Excel (Microsoft Corp., 2007), а также программы MaxStat Lite (MaxStat Software, Германия).

ГЛАВА 3 ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА ЭКСТРАКТОВ

3.1 Прямое вирулицидное действие растительных экстрактов

Из шести исследованных водных растительных экстрактов три обладали статистически значимой прямой вирулицидной активностью в отношении вируса клещевого энцефалита. Это водные экстракты *H. erectum*, *P. bistorta*, *T. chebula*. На рисунке 7 представлена остаточная инфекционность после инкубирования вирусных частиц с соответствующими экстрактами. В качестве референс-образца использовали бидистиллированную воду (К–), в качестве положительного контрольного образца – иммуноглобулин G (К+).

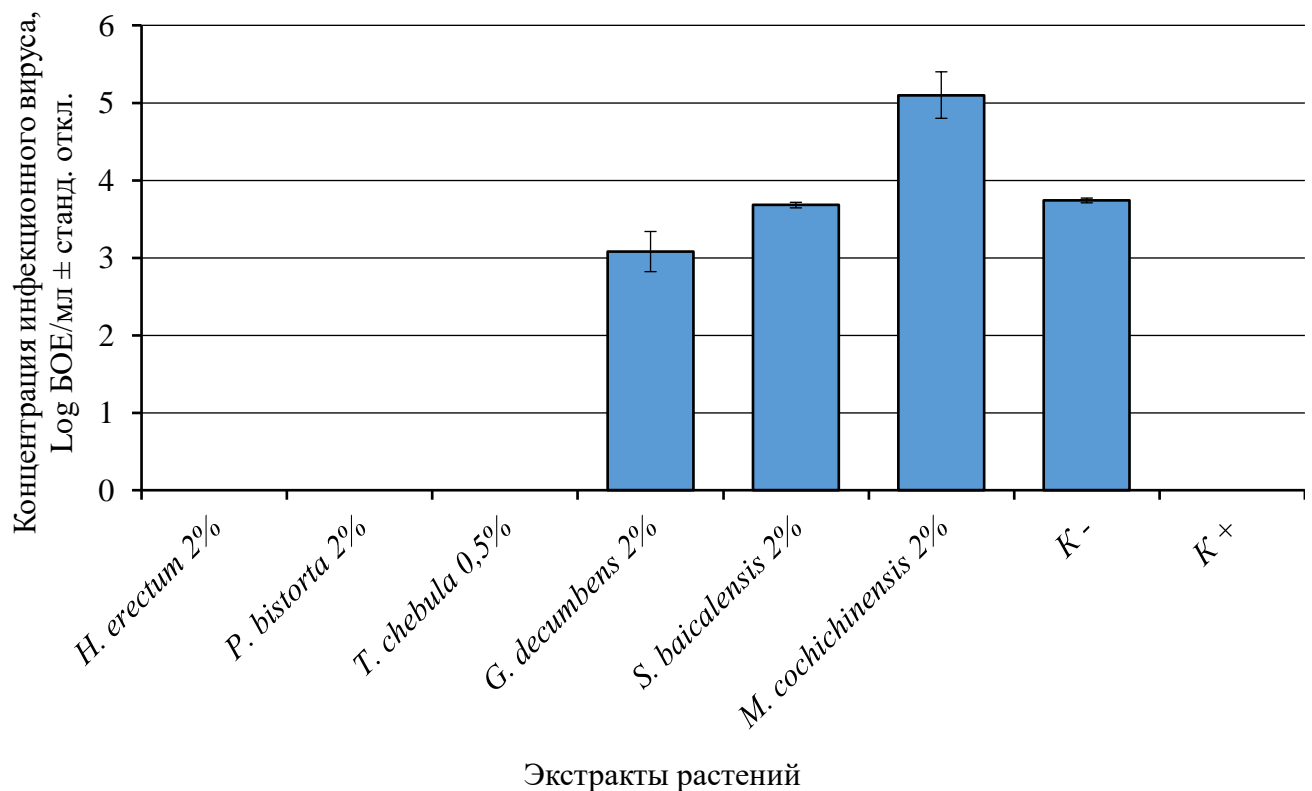


Рисунок 7 – Инфекционность вируса клещевого энцефалита после инкубации с водными экстрактами растений *H. erectum*, *P. bistorta*, *T. chebula*, *G. decumbens*, *S. baicalensis*, *M. cochichinensis*; diH_2O (К–), референс-образец (К–), положительный контрольный образец (К+). Планки погрешностей отражают стандартное отклонение по результатам трех независимых воспроизведений

Для того чтобы оценить наиболее активный растительный экстракт из трех активных, нами приготовлены их водные растворы с концентрацией растворенного вещества в 1 мг/мл (Рисунок 8). В результате оценки бляшкообразующих единиц наибольшую активность показал водный экстракт *T. chebula*. Дальнейшие работы по выделению и идентификации проводили на водном экстракте *T. chebula*.

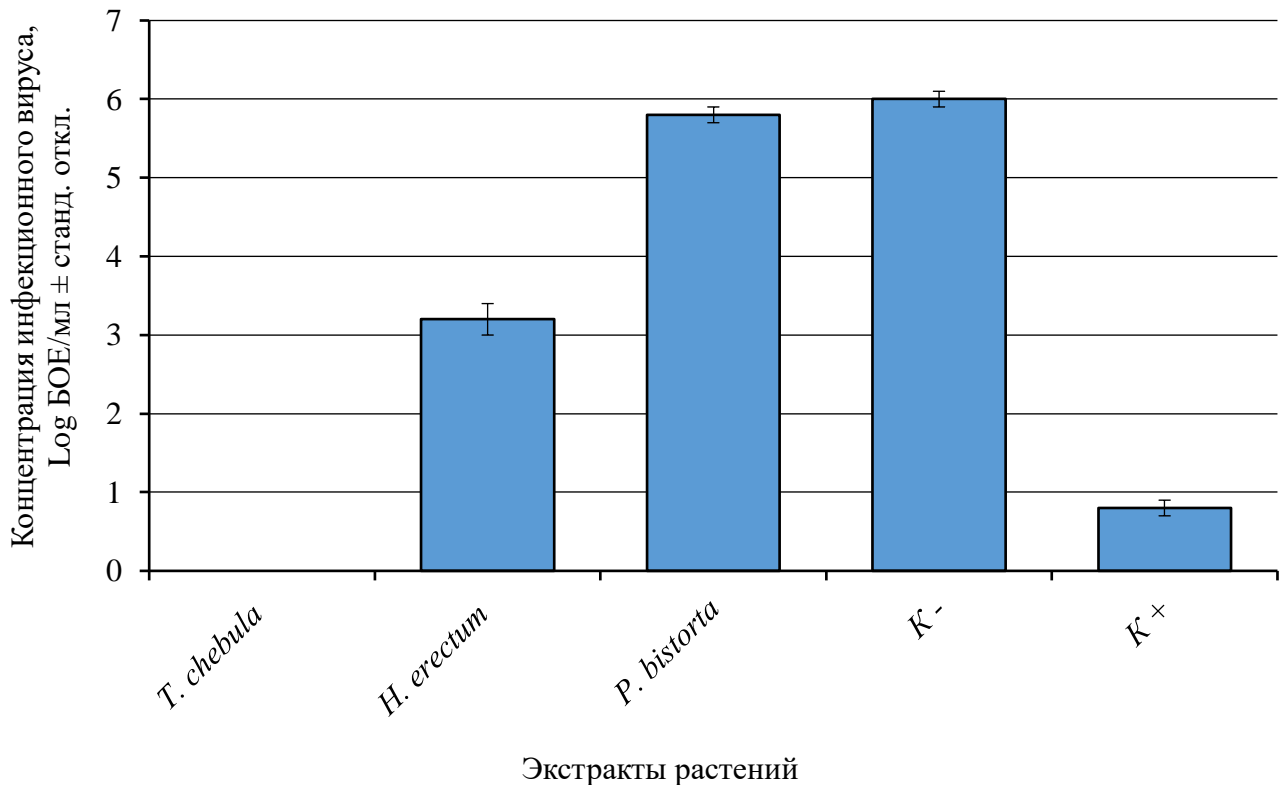


Рисунок 8 – Инфекционность вируса клещевого энцефалита после инкубации с водными экстрактами растений *T. chebula*, *H. erectum*, *P. bistorta*; diH₂O (K⁻), иммуноглобулин G (K⁺). Планки погрешностей отражают стандартное отклонение по результатам трех независимых воспроизведений

3.2 Панель вирулицидного действия фракций после хроматографического разделения

Наиболее активный водный экстракт *T. chebula* подвергли жидкостной хроматографии на силикагеле с использованием различных мобильных фаз (diH₂O, 60%-й ацетонитрил, 85%-й ацетон).

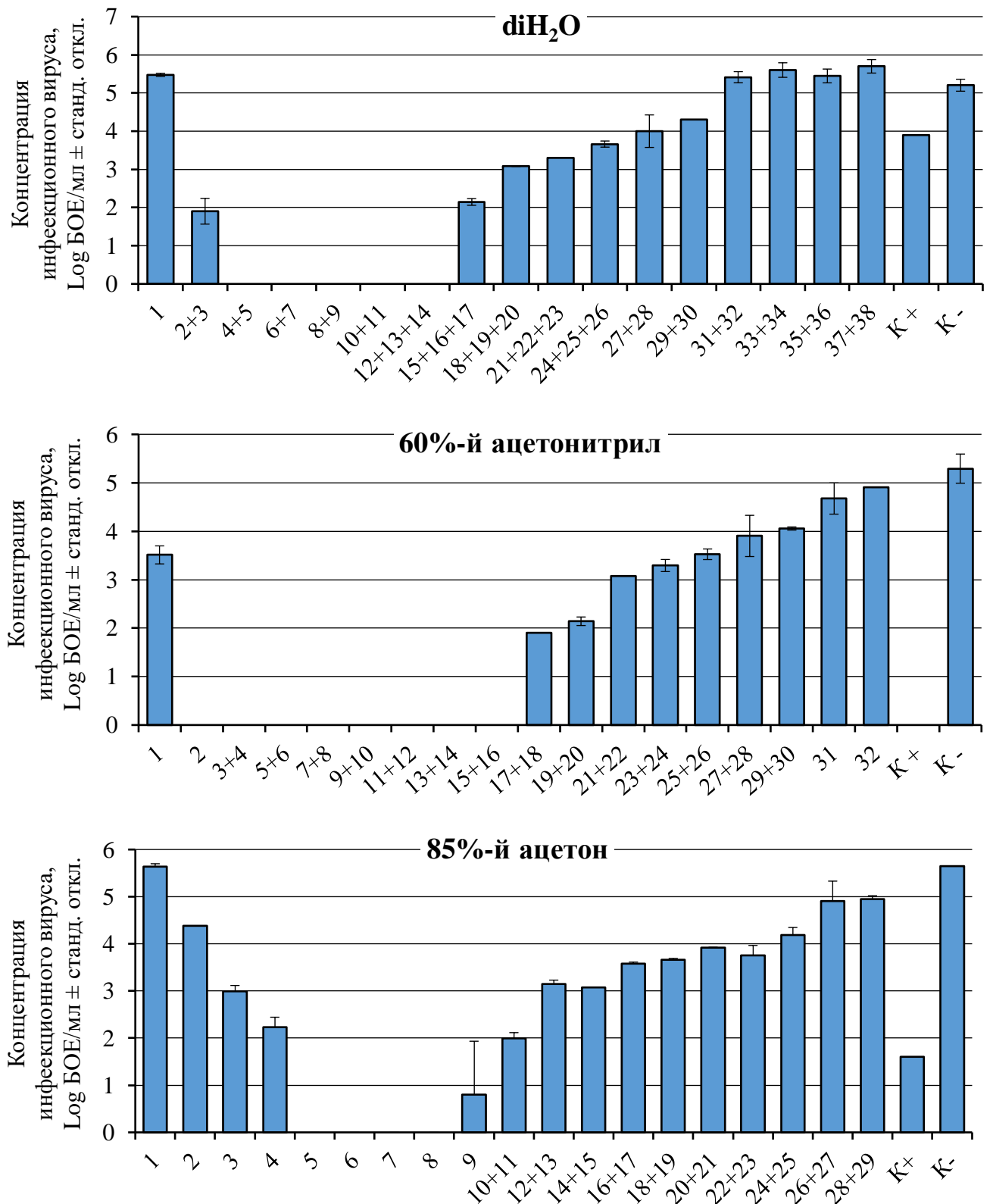


Рисунок 9 – Вирулицидная активность фракций *T. chebula* после разделения на силикагеле, подвижная фаза – diH₂O, 60%-й ацетонитрил, 85%-й ацетон (сверху вниз). Цифрами по горизонтальной оси отмечены номера полученных фракций; diH₂O (K⁻), иммуноглобулин G (K⁺). Планки погрешностей отражают стандартное отклонение по результатам трех независимых воспроизведений

По результатам анализа вирулицидного действия наиболее приемлемой картиной для разделения *T. chebula* оказался 85%-й ацетон. Как видно из диаграммы, фракции с 5 по 8 способны к полному подавлению ВКЭ *in vitro*. По результатам хроматографического разделения фракции от разделения на 85%-м ацетоне выбраны для хромато-масс-спектрометрического анализа, для того чтобы определить концентрацию компонентов, входящих в состав данных фракций. Нами выбраны фракции 3, 5, 6, 8, 12 (Рисунок 9). Так, предполагалось, что пик активности ингибирования ВКЭ находился в фракциях 5 и 6.

3.3 Анализ спектра масс вирулицидных фракций после жидкостной хроматографии

По результатам анализа компонентов, входящих в состав ингибирующих фракций (3, 5, 6, 8, 12), нами найдена корреляция между индексом ингибирования и концентрацией (интенсивностью) пика иона 635 (Рисунок 10). Коэффициент корреляции Пирсона составил $r = 0,92$, что может указывать то, что компонент с продуктом иона 635 может быть кандидатным ингибирующим агентом.

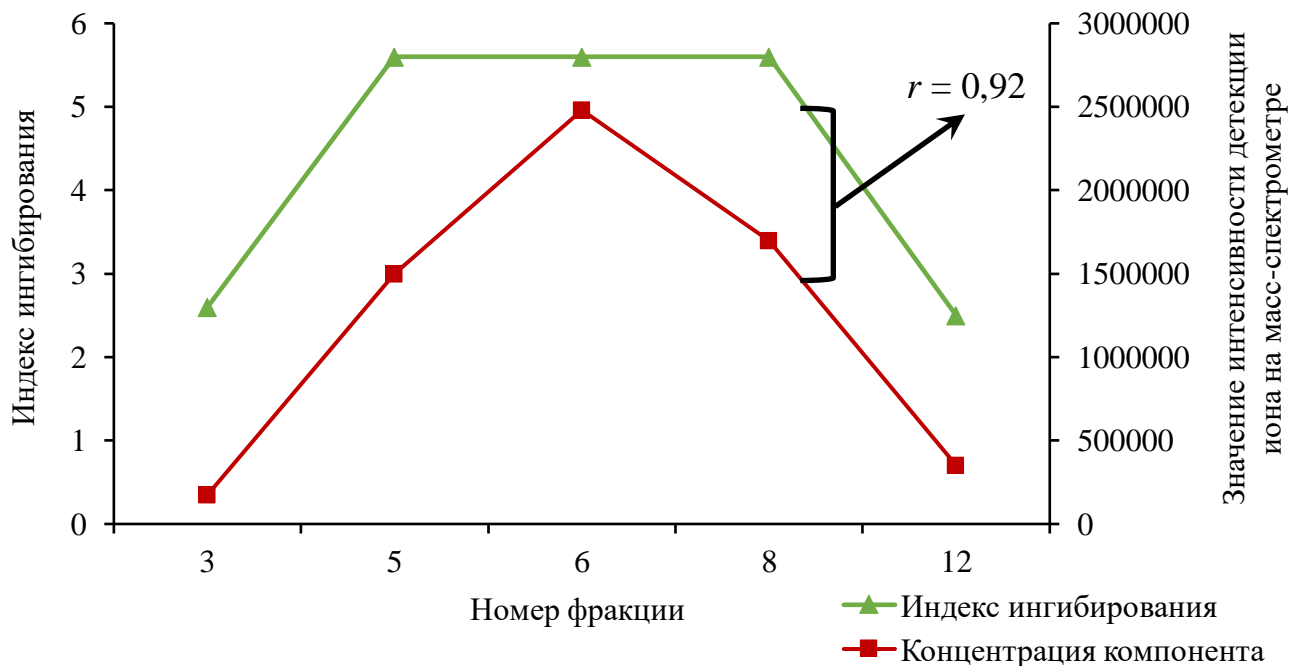


Рисунок 10 – Корреляция между индексом ингибирования и концентрацией иона 635 а. е. м. в вирулицидных фракциях от разделения 85%-м ацетоном

Чтобы идентифицировать компонент, ион компонента с массой 635 был подвергнут фрагментированию. При фрагментации данного иона зарегистрированы спектры масс, которые позволили предположить, что потенциальным ингибирующим агентом могут являться два вещества – **корилагин** и **тригаллоил глюкоза** (Рисунок 11), поскольку обладают молекулярной массой, очень близкой к расчетной массе. Отличие тригаллоил глюкозы от корилагина состоит в наличии одной ковалентной связи между двумя остатками галловой кислоты (Рисунок 12). Данные по вирулицидной активности компонентов представлены ниже.

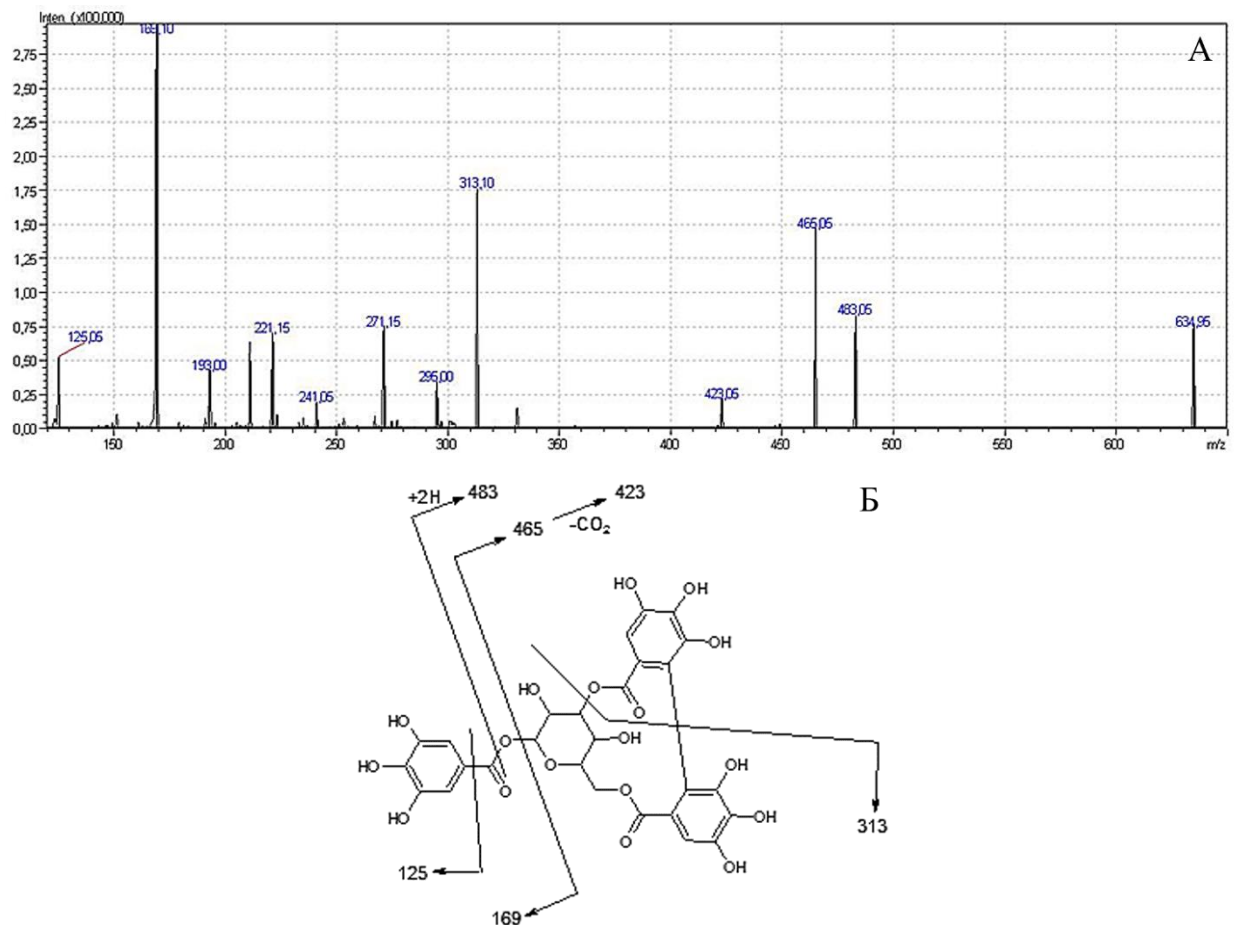


Рисунок 11 – Спектр масс продуктов, полученных при фрагментации иона 635 в вирулицидных фракциях от разделения 85%-м ацетоном (А): по вертикали – значения интенсивности масс-спектрометрического сигнала; по горизонтали – значения молекулярной массы ионов (отношение массы к заряду вещества). Схема наиболее вероятной химической формулы вещества, соответствующего наблюдаемому спектру масс (Б): цифрами указаны показатели расчетных масс продуктов, получаемые при фрагментации, стрелками – возможные места дефрагментации

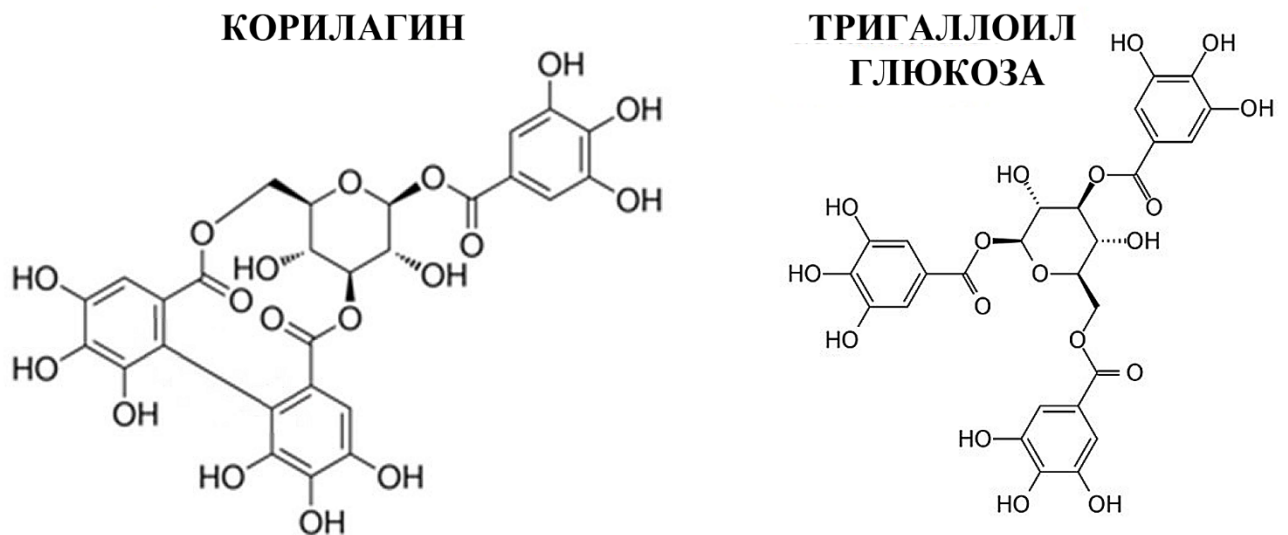


Рисунок 12 – Схемы химических структур корилагина и тригаллоил глюкозы

3.4 Анализ спектра масс вирулицидных фракций после высокоэффективной жидкостной хроматографии

Исследование активности фракции после ВЭЖХ водного экстракта *T. chebula* продемонстрировало следующую картину распределения вирулицидного действия на ВКЭ (Рисунок 13). По результатам анализа, из 125 проверенных нами 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 нами выбраны 29 фракций. Это фракции с наиболее высоким значением ингибирования вируса, с фланкирующими их фракциями. В результате нами сконструирована панель значений вирулицидного действия фракций, с которыми происходило сравнение концентраций компонентов, присутствующих во фракции (Рисунок 14).

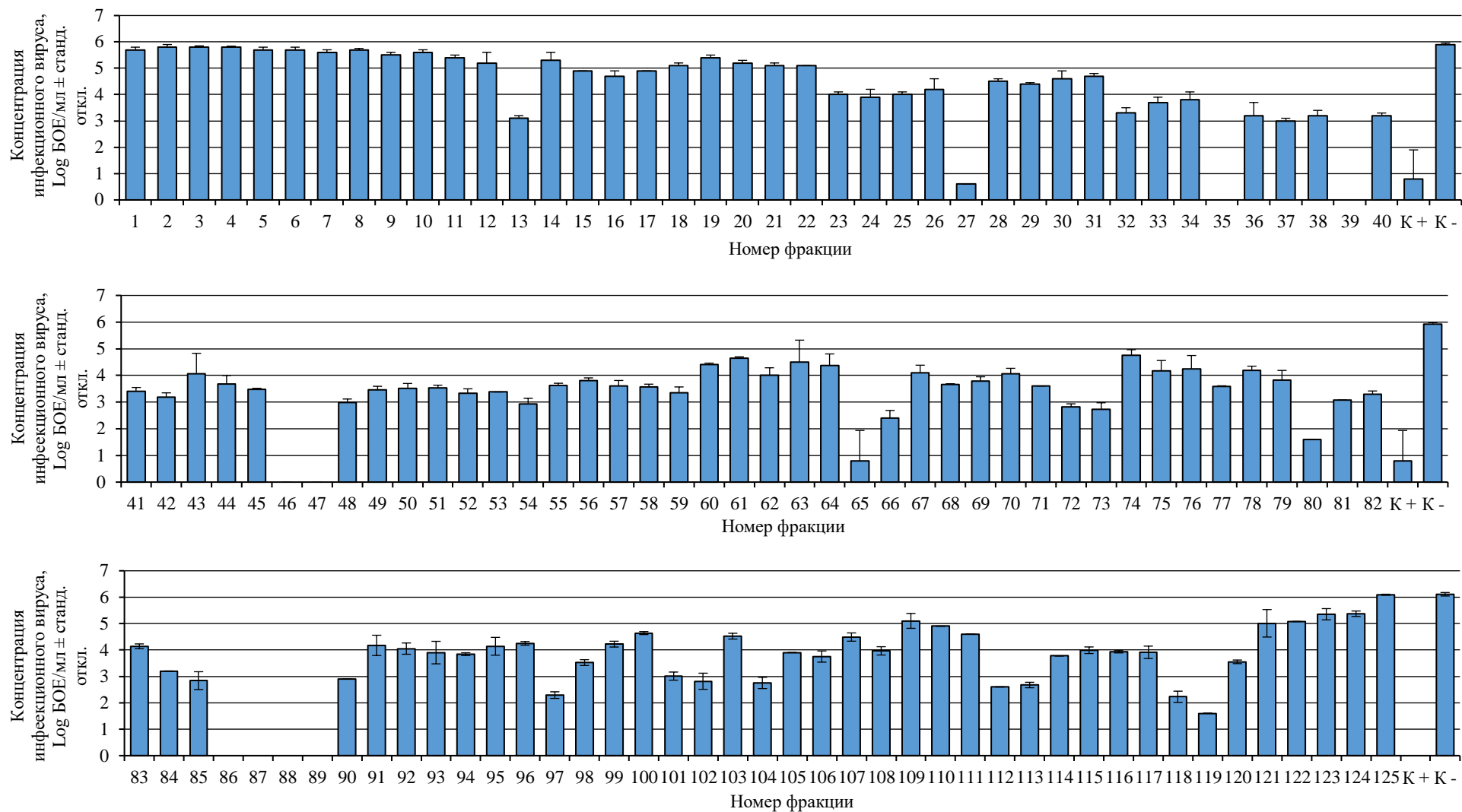


Рисунок 13 – Панель вирулицидного действия фракций экстракта *T. chebula* после разделения с помощью ВЭЖХ; dH_2O (K-), иммуноглобулин G (K+). Планки погрешностей отражают стандартное отклонение по результатам трех независимых воспроизведений

В среднем в вирулицидных фракциях обнаружены массы более 50 различных компонентов. Графики количественного распределения компонентов составлены для каждой фракции. В качестве приоритетного режима для построения закономерности масс-спектрометрического распределения выбран негативный режим ионизации веществ, поскольку преобладающее количество литературных данных по фрагментации представлено для негативного режима сканирования. Также проведен анализ распределения масс в положительном режиме сканирования, однако его информативность и степень корреляции с вирулицидным действием фракций были ниже. 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.

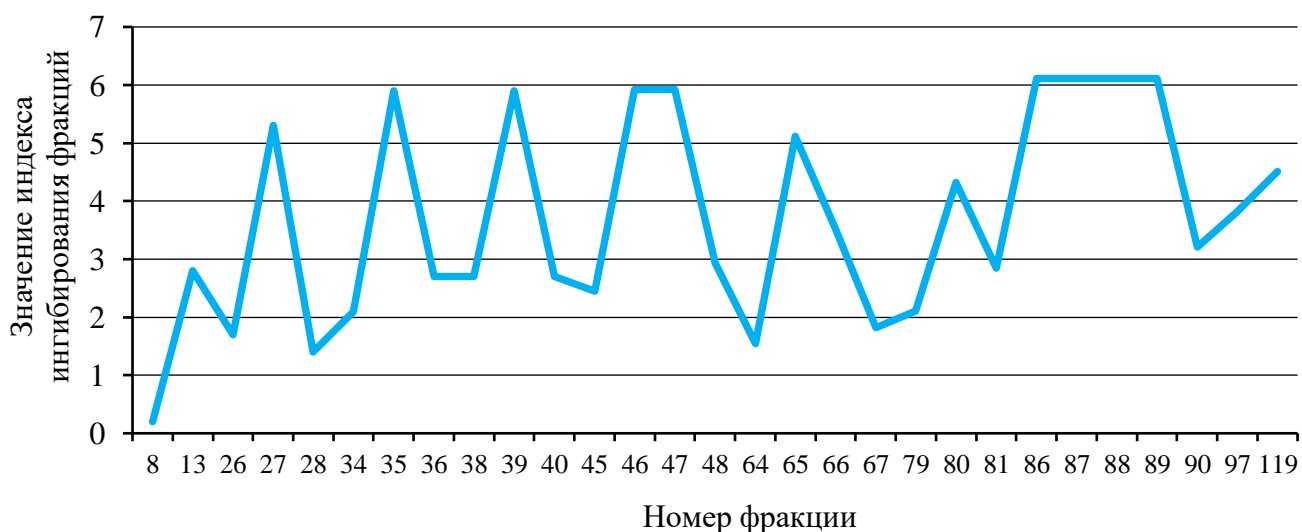


Рисунок 14 – Значения индексов вирулицидности фракций от ВЭЖХ-разделения водного экстракта *T. chebula*, выбранных для масс-спектрометрического анализа

Фракции 35, 39, 46, 47, 86–89 полностью ингибировали вирус, следовательно, имели одинаковый индекс вирулицидности; поэтому нельзя было сравнить их активности между собой. Для сравнения наиболее активных

вирулицидных фракций для каждой фракции определены значения полумаксимальной эффективной концентрации (EC50). Поскольку точное количество сухих веществ в каждой фракции установить не представлялось возможным, в сравнении использовали серийные двукратные разведения фракций в стерильном фосфатно-солевом буфере в диапазоне от 1:8 до 1:1024. Далее рассчитывали EC50 по методу Рида и Менча [300] и выражали в виде обратного титра, при котором ингибируется 50 % инфекционного вируса. Оказалось, что наибольшей вирулицидной активностью обладает фракция 46, которая вдвое снижает инфекционность ВКЭ при разбавлении ее в 293 раза, тогда как для остальных фракций EC50 варьировала в диапазоне от 1:22 до 1:80 (Рисунок 15).

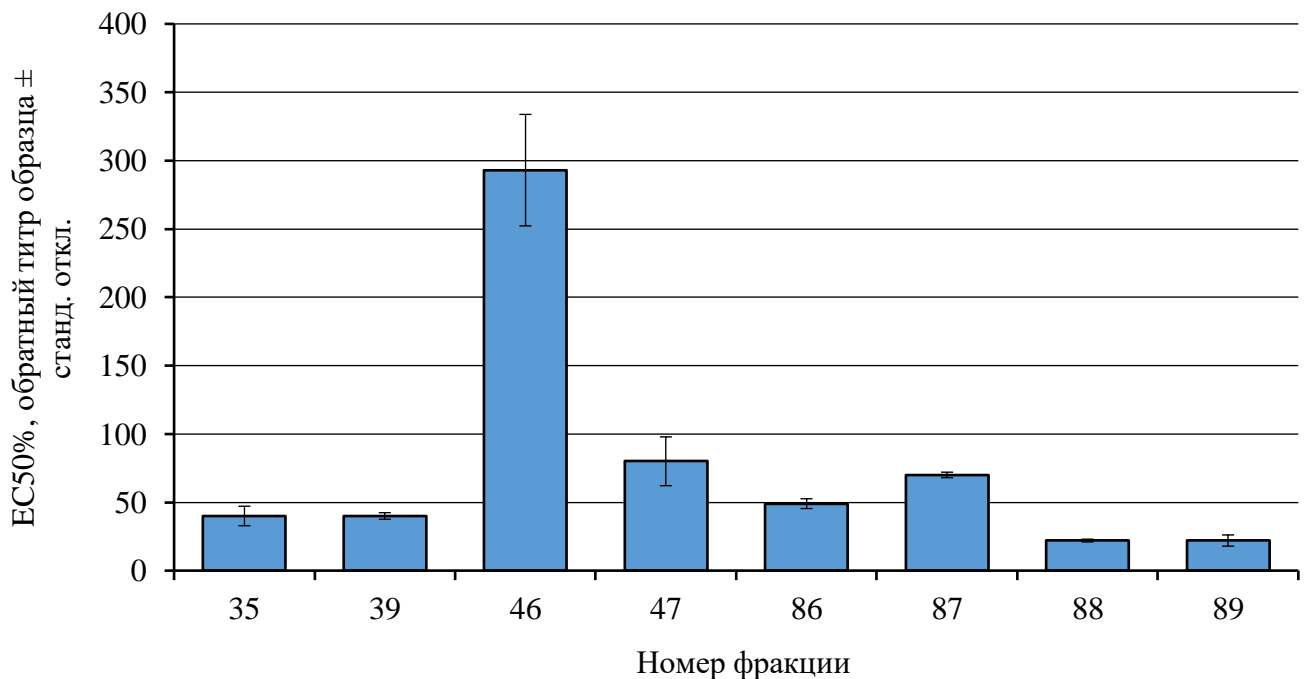


Рисунок 15 – Сравнение EC50 наиболее активных фракций *T. chebula* в отношении вируса клещевого энцефалита. Вирулицидную активность определяли для идентичных серийных двукратных разведений каждой фракции в диапазоне от 1:8 до 1:1024. Полумаксимальную эффективную концентрацию (EC50) фракции рассчитывали по методу Рида – Менча [300] и выражали в виде обратного титра, при котором концентрация инфекционного вируса снижается на 50 %. Планки погрешностей отражают стандартное отклонение по результатам трех независимых воспроизведений

Найденный нами компонент в 635 а. е. м. из жидкостной хроматографии 85%-го ацетона также присутствовал во фракциях ВЭЖХ-разделения 86–89 с наибольшей концентрацией в фракции 87 (Рисунок 16). Однако значение его корреляции не совсем отображало вирулицидную активность фракций. Коэффициент корреляции Пирсона $r = 0,456$. Однако в тех же фракциях был обнаружен компонент с массой в 636 а. е. м., коэффициент корреляции для которого составил $r = 0,96$ (Рисунок 17). Максимальная концентрация иона 636 а. е. м. наблюдалась в фракции 87. Такое же количественное распределение наблюдалось для масс 837 и 838 по фракциям с 86 по 89. При дополнительном фрагментационном анализе масс 635, 636, 637 и 638 показано, что все эти ионы являются изотопами одного и того же компонента, так как давали идентичные картины фрагментации.

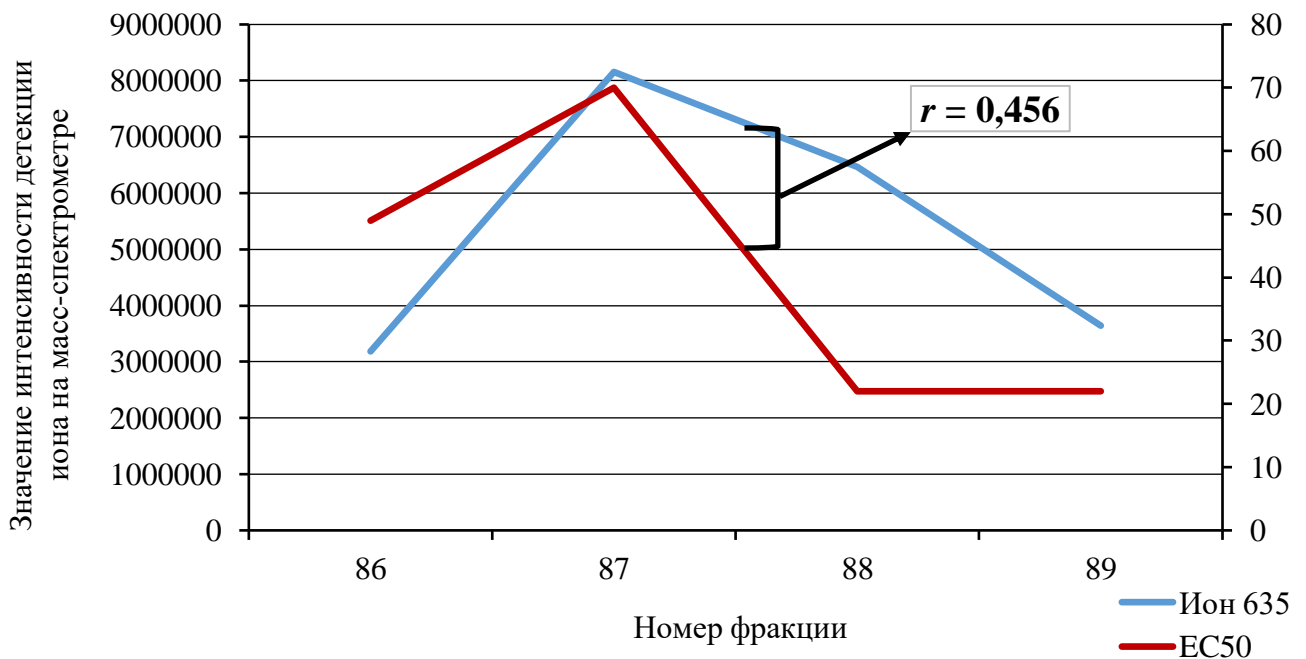


Рисунок 16 – Корреляции значений EC50 фракций 86–89 и интенсивности детекции иона 635 а. е. м.: по вспомогательной оси – показатели EC50 выбранных фракций

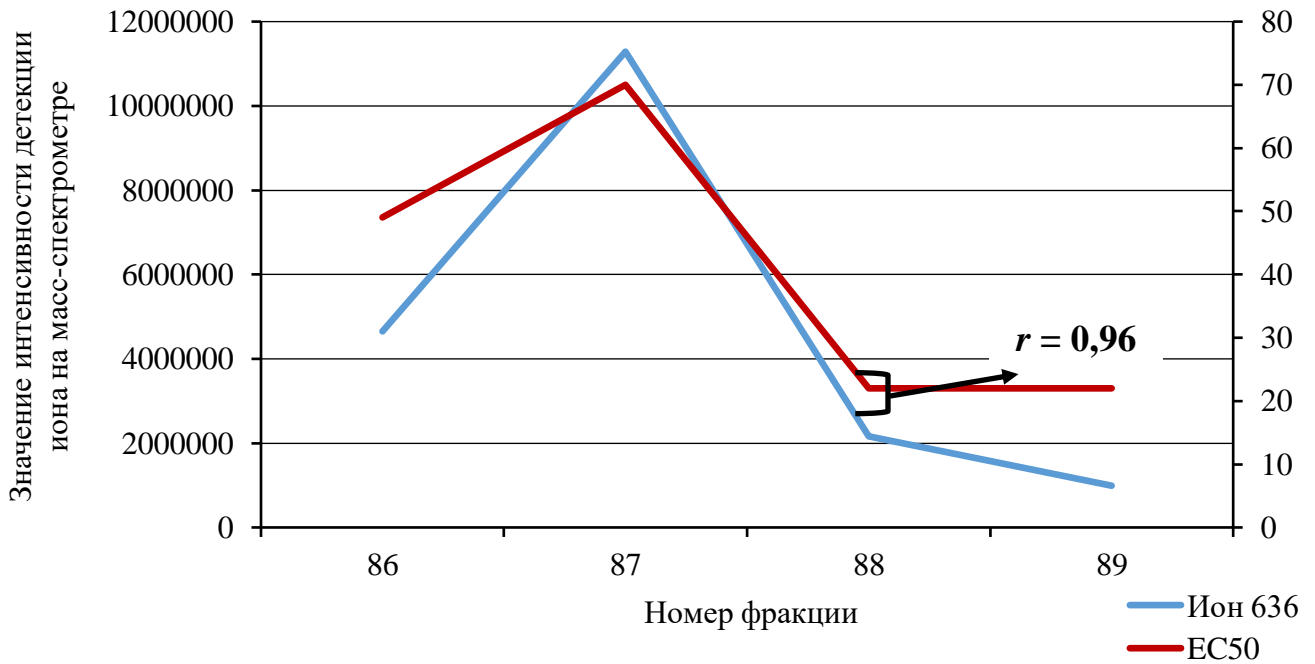


Рисунок 17 – Корреляции значений EC50 фракций 86–89 и интенсивности детекции иона 636 а. е. м.: по вспомогательной оси – показатели EC50 выбранных фракций

При анализе масс спектров найдены корреляции между позитивным (+) и негативным (–) режимом сканирования, которые показали сильную связь в распределении концентраций ионов 355,05 и 357 (Рисунок 18). Это может указывать на то, что данные массы могут принадлежать одному и тому же компоненту. Однако с общей картиной вирулицидного действия фракций полного совпадения данных прослеживалось не во всех фракциях. Поэтому данные массы в дальнейшем анализе не учитывались.

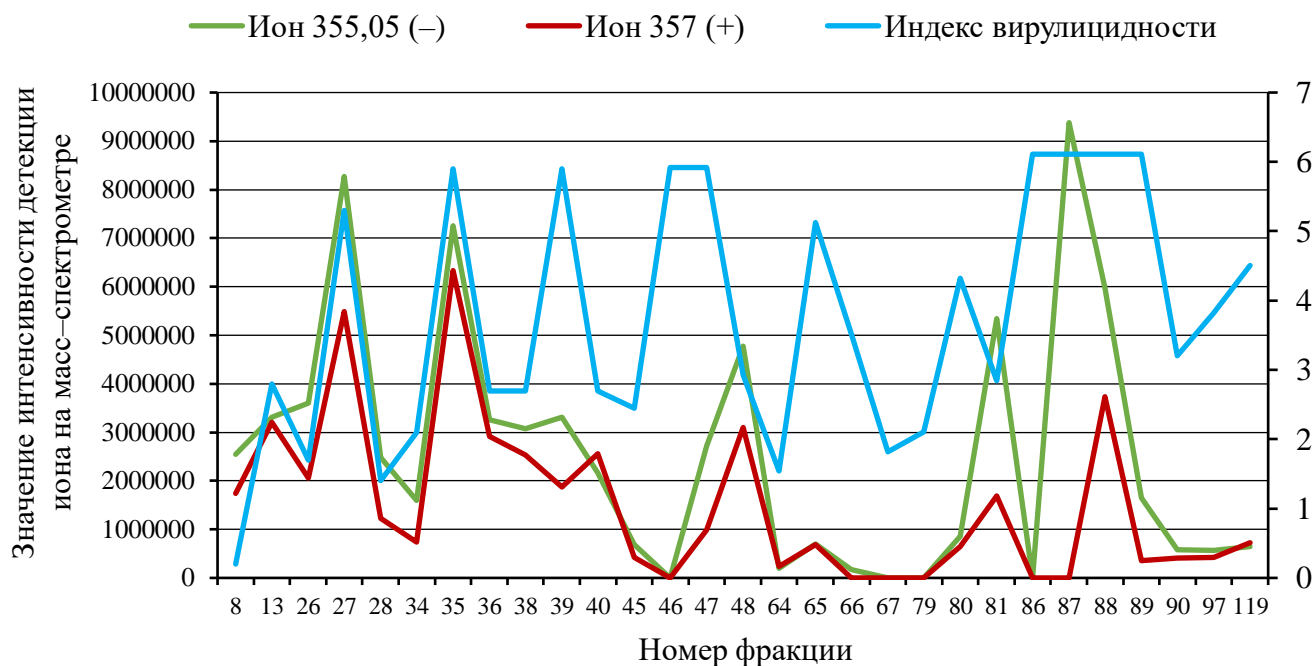


Рисунок 18 – Распределение концентраций ионов 355 (–) и 357 (+) по фракциям, с вирулицидной активностью фракций: по вспомогательной оси – индексы вирулицидности фракций от ВЭЖХ-разделения водного экстракта *T. chebula*, выбранных для масс-спектрометрического анализа

Подобные взаимосвязи найдены и при анализе позитивного режима сканирования. Так, ионы с атомными массами 1102,1, 1107,1 и 682,75 показали повторяющуюся картину распределения между собой (Рисунок 19). Концентрации масс во фракциях сопоставимы с картиной ингибирования; данные противоречащие общему распределению, не обнаружены. Однако в связи с недостаточными сведениями по фрагментации в позитивном режиме ионизации в литературных источниках идентификация исходного компонента не представляется возможной.

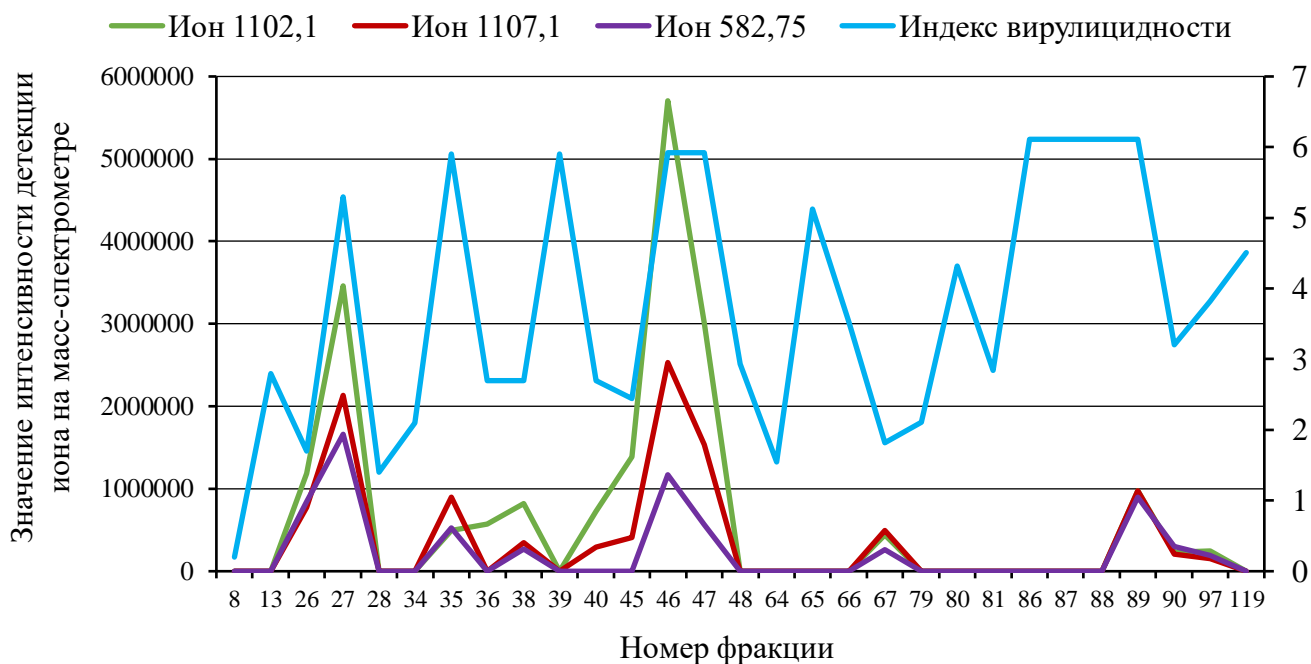


Рисунок 19 – Распределение ионов 1102,1, 1107,1 и 582,75 по фракциям, с вирулицидным действием, позитивный режим сканирования: по вспомогательной оси – индексы вирулицидности фракций от ВЭЖХ-разделения водного экстракта *T. chebula*, выбранных для масс-спектрометрического анализа

Также при анализе негативного режима обнаружена взаимосвязь между некоторыми массами анионов. Так, ионы с массой 1083,1 и 541,05 имели похожую картину распределения между собой в анализируемых фракциях (Рисунок 20). Позднее определено, что ион 541 – это продукт иона 1083, который несет двойной заряд.

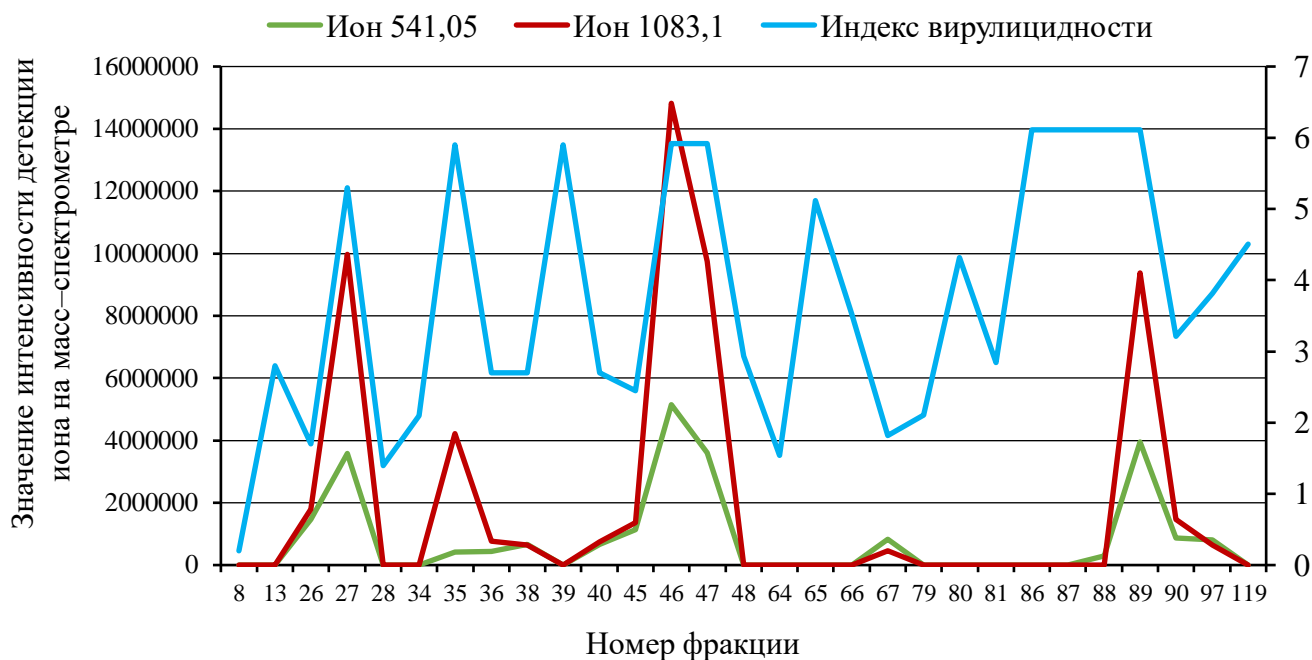


Рисунок 20 – Распределение ионов 541 и 1083 по фракциям, с вирулицидным действием: по вспомогательной оси – индексы вирулицидности фракций от ВЭЖХ-разделения водного экстракта *T. chebula*, выбранных для масс-спектрометрического анализа

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 показал сильной корреляции со значениями вирулицидности. Кандидатный ион с массой 1083,1 присутствовал в максимальных значениях в двух фракциях – 27 и 46 (см. Рисунок 19). Значений распределения иона с массой 1083,1, противоречащих общей картине вирулицидного действия, не обнаружено. Целевой ион 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 21.

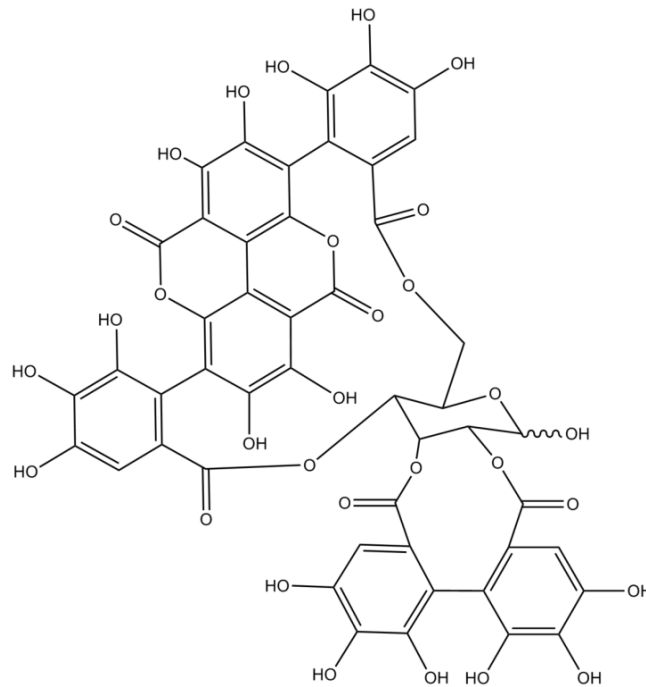


Рисунок 21 – Схема химической структуры пуникалагина

Несмотря на то, что концентрация иона с одной массой находится в двух фракциях (27, 46), их вирулицидная активность была различной. Так, фракция 46 обладала в разы большей вирулицидной активностью, чем фракция 27. Чтобы найти объяснение данному наблюдению, ионы из двух фракций также подвергли фрагментации. Сравнение между собой картин фрагментаций иона 1083,1 из фракций 27 и 46 показало небольшие отличия в наборе полученных фрагментов масс (Рисунок 22). Так, общими оказались фрагменты массы 575 и 600,95. Отличительным фрагментом стал ион 721,05 из фракции 27, вместо которого в фракции 46 был ион 781.

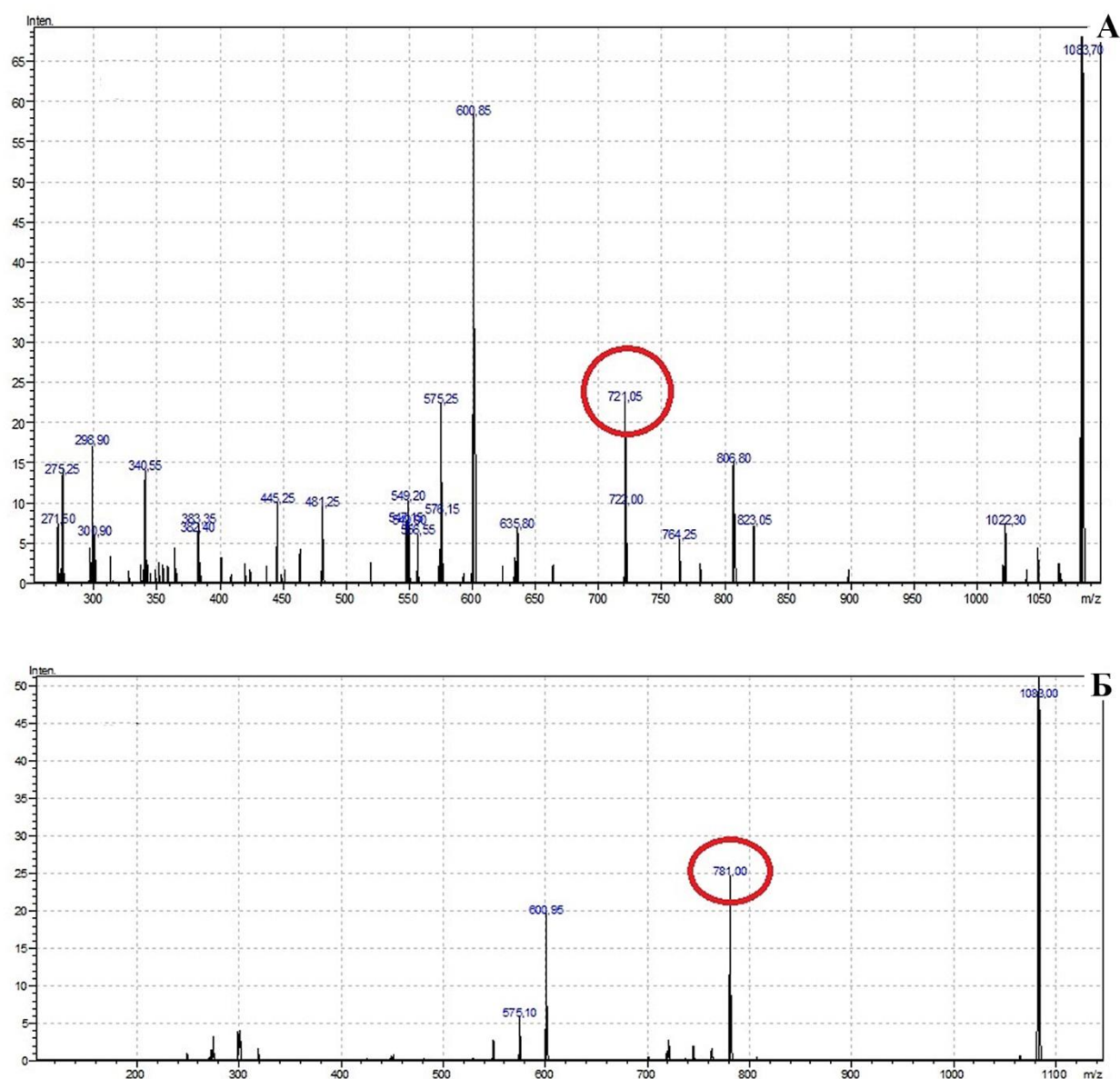


Рисунок 22 – Спектр масс иона 1083,01 из фракций 27 (А) и 46 (Б): по вертикали – значения интенсивности масс-спектрометрического сигнала; по горизонтали – значения молекулярной массы ионов; красным кружком отмечена масса, получаемая от фрагментаций ионов 1083,01 из фракций 27 и 46

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 [229]. В статье представлены данные о времени удержания α - и β -изомеров пуникалагина (Рисунок 23). Мы предположили, что в нашем случае в фракции 27

может находиться изомер α , а в фракции 46 – изомер β . Позднее это было подтверждено. Данные проверки вирулицидной активности химически чистого пуникалагина представлены ниже (см. Главу 4).

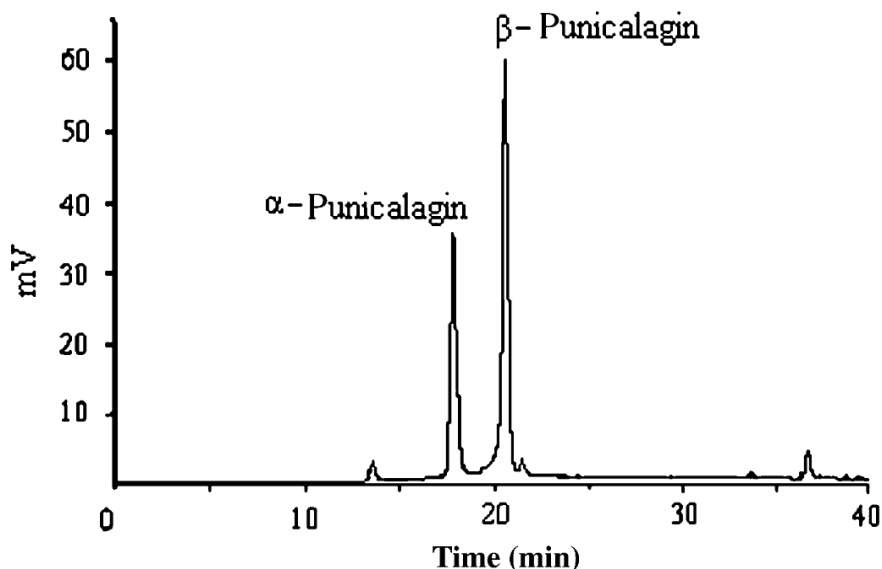


Рисунок 23 – Хроматограмма изомеров α и β пуникалагина из кожуры граната, по данным J. Lu et al. [229]

Как можно заметить из спектрограммы фрагментации иона 1083 из фракции 27, в наборе масс обнаружена масса 635 а. е. м. в минорной части. Нами 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 иона 1083,1) и фрагменты от иона 636 показали, что данные ионы дают разные наборы масс (Рисунок 24), что может говорить о независимом происхождении компонента 636 от предшественника пуникалагина иона 1083,1.

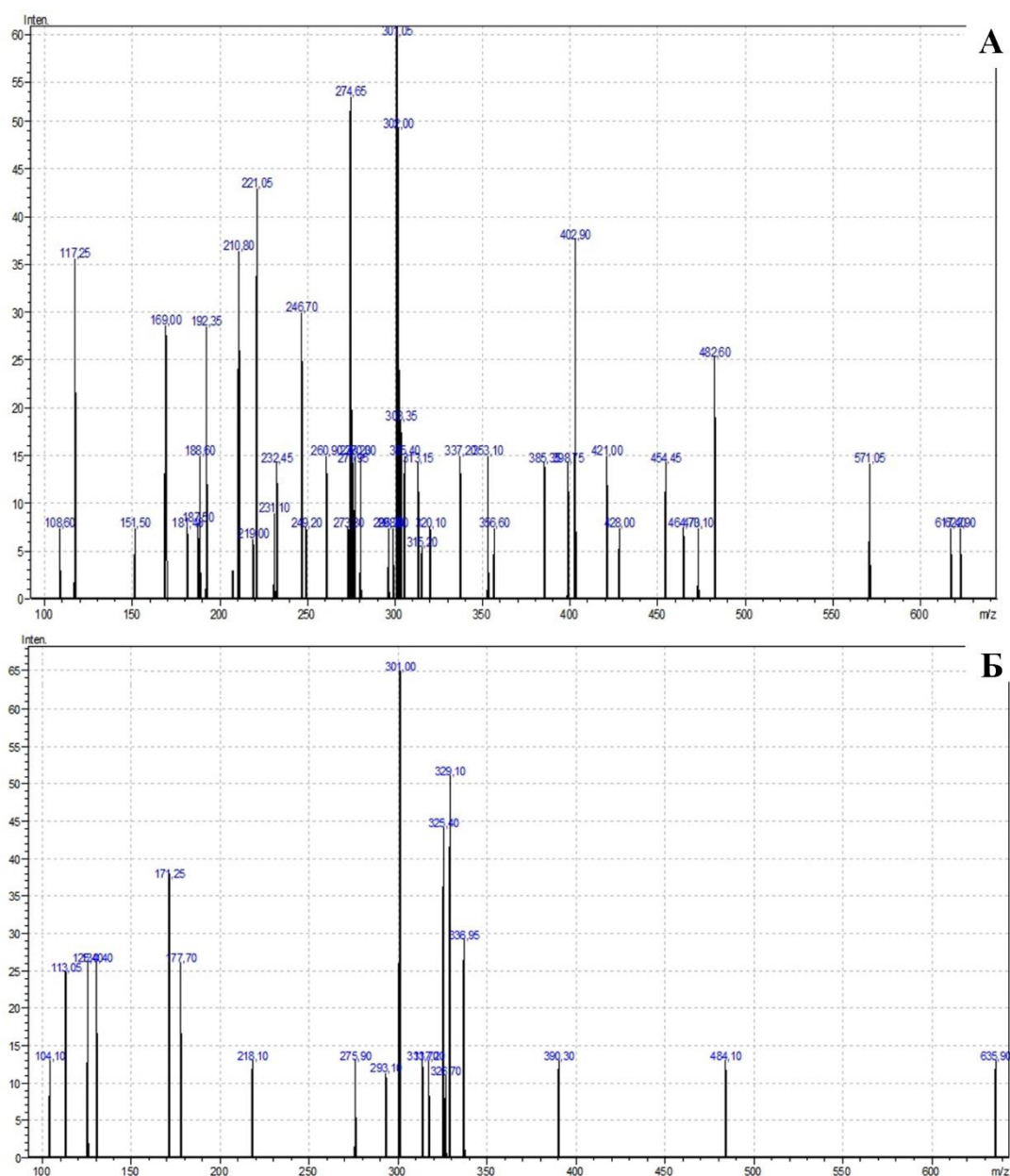


Рисунок 24 – Спектр масс ионов, полученных от фрагментации иона 635 (продукт иона 1083,1 из фракции 27): А – фрагментация иона 636; Б – фракция 87; по вертикали – значения интенсивности масс-спектрометрического сигнала; по горизонтали – значения молекулярной массы ионов

Как и ожидалось, приобретенный химический компонент пуникалагин показал наличие двух пиков на хроматограмме, аналогичных двум ожидаемым α - и β -формам пуникалагина (Рисунок 25). При проверке масс спектров, обнаружено, что химически чистый пуникалагин дает спектр масс, аналогичный обнаруженному в β -изоформе пуникалагина из фракции 46 (Рисунок 26).

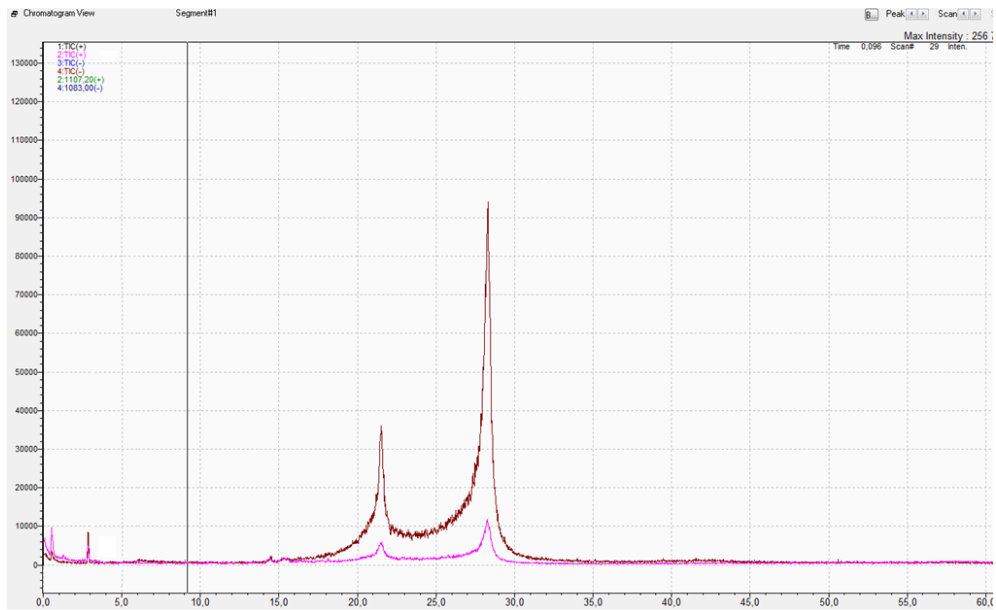


Рисунок 25 – ВЭЖ-хроматограмма химически чистого пуникалагина

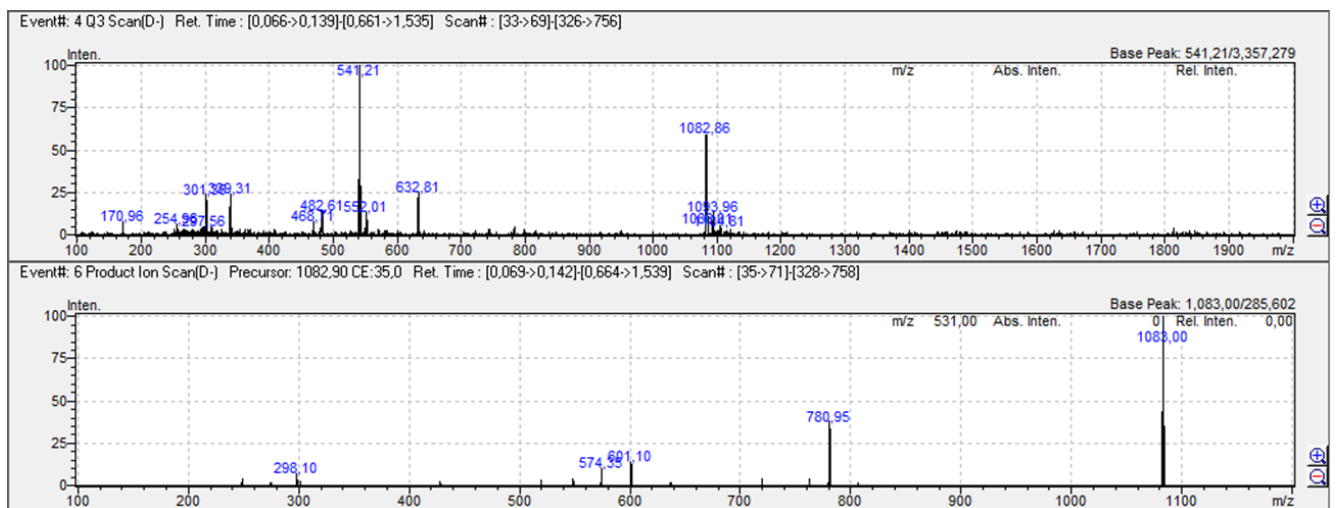


Рисунок 26 – Масс-спектр химически чистого пуникалагина (коммерческий):
сверху – суммарный спектр масс ионов, снизу – продукты ионов от массы 1083,1
коммерческого пуникалагина; по вертикали – значения интенсивности
масс-спектрометрического сигнала; по горизонтали – значения
молекулярной массы ионов

В ходе анализа спектр масс активных фракций обнаружены ионы корилагина (633,1), которые присутствовали в фракциях 13 и 80 (Рисунок 27).

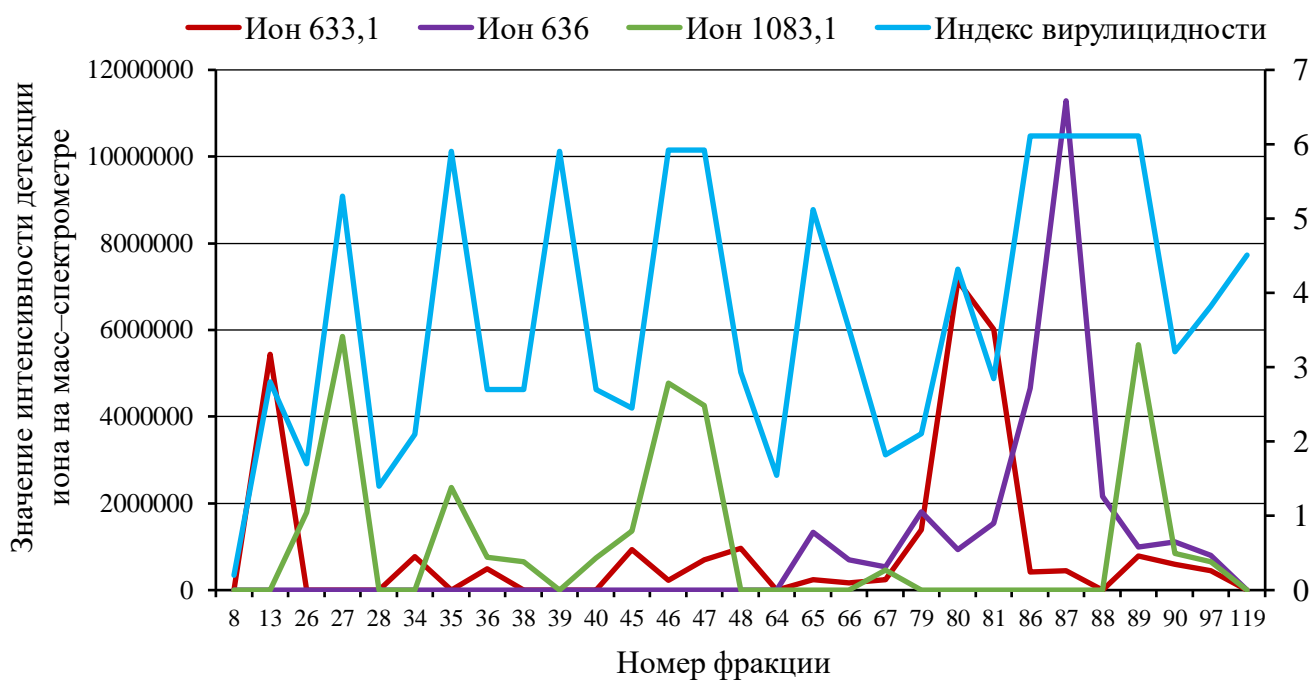


Рисунок 27 – Распределение вирулицидного действия фракций и ионов 633,1 (корилагин), 636 (тригаллоил глюкоза) и 1083,1 (пуникалагин): по вспомогательной оси – индексы вирулицидности фракций

В результате масс-спектрометрического анализа получена картина распределения идентифицированных веществ в активных фракциях, представленная на рисунке 27. Выбранная панель вирулицидных фракций с восемью значимыми пиками вирулицидности вируса позволила объяснить активность для шести из них.

ГЛАВА 4 ПРОВЕРКА ВИРУЛИЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ АПТАМЕРОВ И СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ *T. CHEBULA*

Идентифицированные компоненты. Проведены 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 28). 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 наименее выраженную вирулицидную активность проявляет тригаллоил глюкоза.

В результате определения концентрации ЕС50, химически чистых компонентов, идентифицированных из водного экстракта *T. chebula*, получены следующие значения. Так наибольшее вирулицидное действие продемонстрировал пуникалагин (ЕС50) – в 0,0007 мг/мл. Следующим по эффективности оказался корилагин – 0,002 мг/мл. Наименьшим вирулицидным значением обладала тригаллоил глюкоза (ЕС50) – 0,009 мг/мл (Рисунок 29).

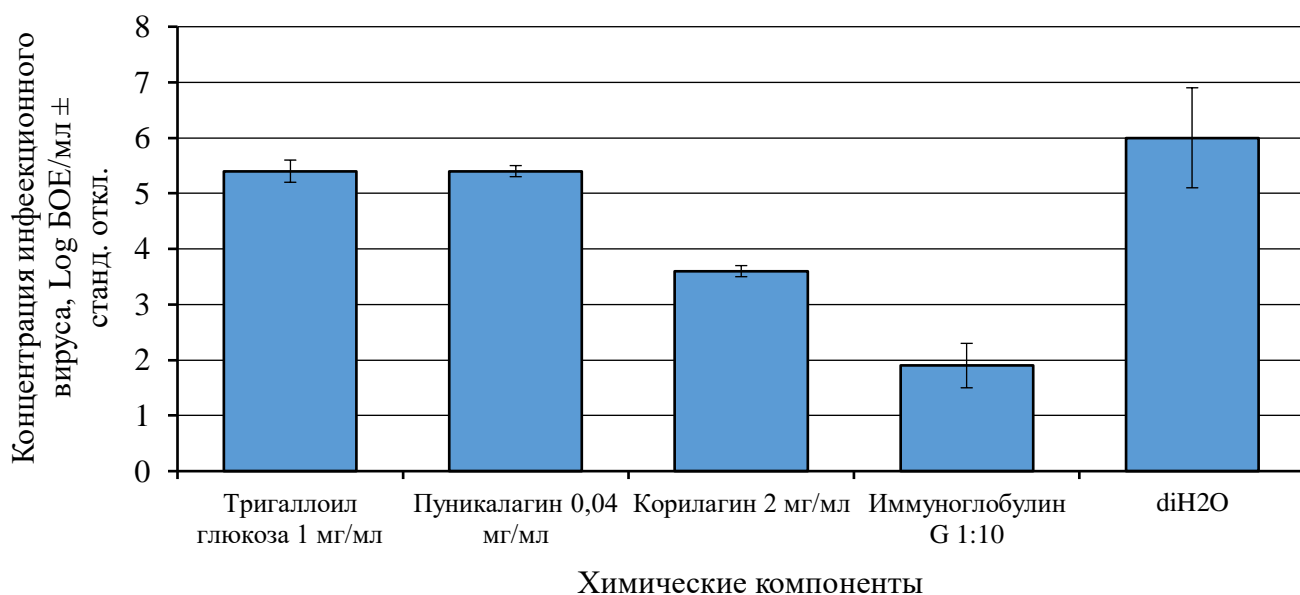


Рисунок 28 – Прямая вирулицидная активность химически чистых компонентов, идентифицированных веществ: пуникалагин, корилагин и тригаллоил глюкоза.

Планки погрешностей отражают стандартное отклонение по результатам трех независимых воспроизведений

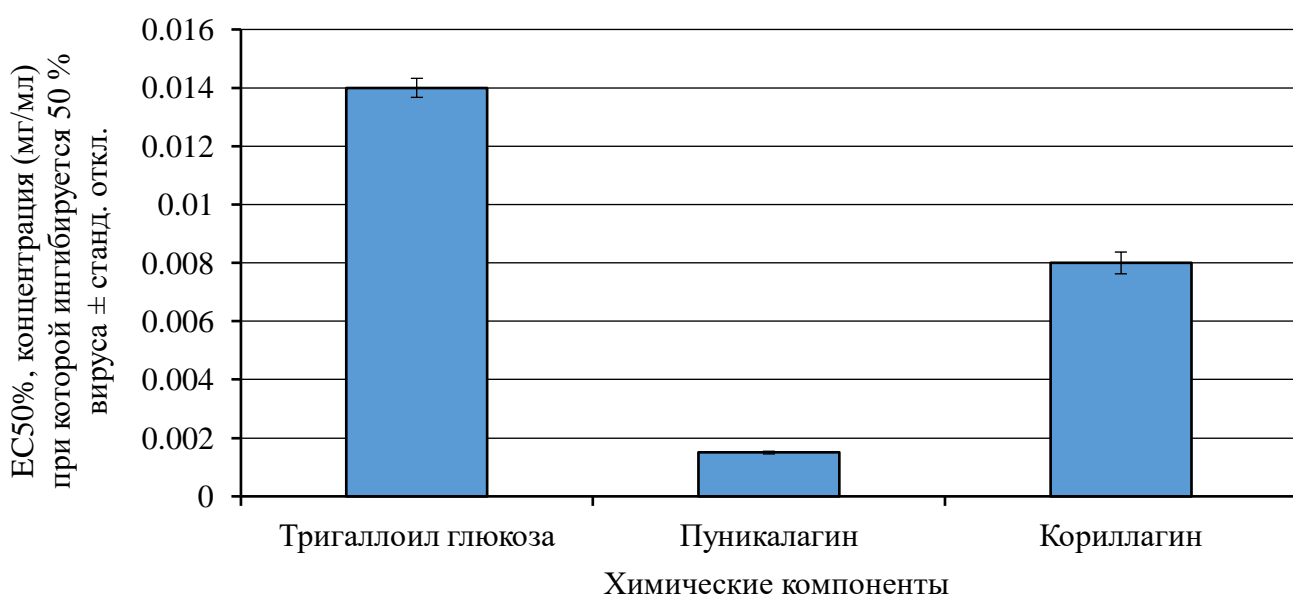


Рисунок 29 – Сравнение концентраций EC50 идентифицированных компонентов.

Прямую вирулицидную активность определяли для серийных двукратных разведений; полумаксимальную эффективную концентрацию (EC50) компонентов, при которой концентрация инфекционного вируса снижается на 50 %, рассчитывали по методу Рида – Менча (мг/мл). 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 фосфатно-солевого буфера. Распределение остаточной инфекционности вируса клещевого энцефалита представлено на Рисунке 30. Как видно из графиков, наиболее выраженным ингибирующим действием, как и при прямом вирулицидном действии компонентов, обладали пуникалагин и корилагин. Тригаллоил глюкоза в данном эксперименте показала линейную, но слабо выраженную функцию зависимости инфекционности от концентрации компонента. Коэффициент достоверности 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 не обнаружено.

При проверке 50%-го цитотоксического действия, концентраций CC_{50} химически чистых компонентов, идентифицированных из экстракта *T. chebula*, получены следующие результаты (Рисунок 31). Концентрация CC_{50} отражает количество чистого компонента, которая способна приводить к гибели 50 % культуры клеток СПЭВ в тестируемой лунке. Чем выше концентрация вещества, при которой оно ингибирует культуру клеток, тем меньше будет его цитотоксическое действие. Как видно из результатов проверки, наибольшим цитотоксическим значением обладал пуникалагин в концентрации 0,02 мг/мл. Следующим по возрастанию цитотоксической концентрации на клетки идет корилагин (0,05 мг/мл), и наименее цитотоксическим компонентом для клеток оказался компонент тригаллоил глюкоза (0,5 мг/мл).

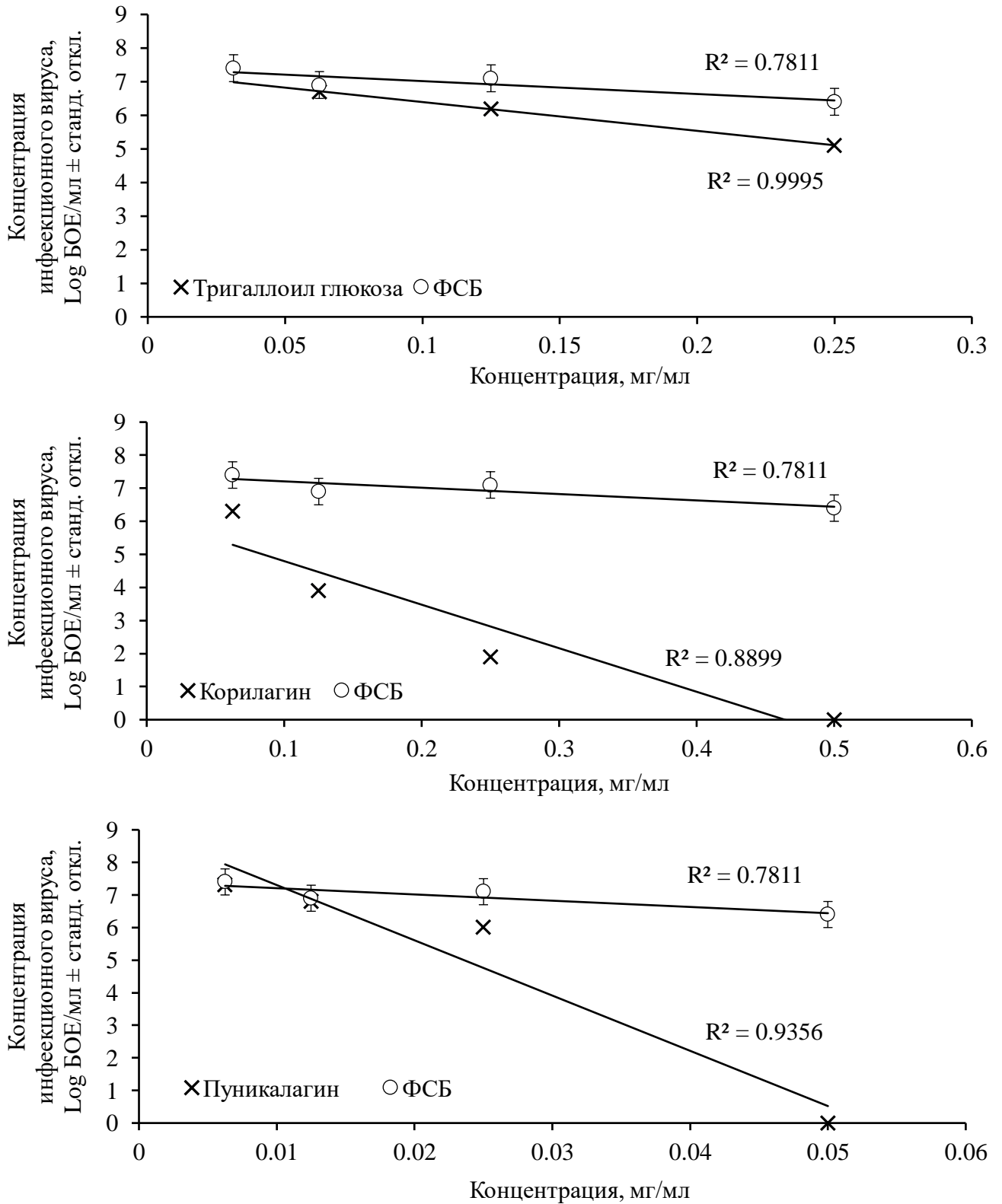


Рисунок 30 – Значения инфекционности вируса клещевого энцефалита при совместной ко-инкубации зараженной культуры клеток с тригаллоил глюкозой, корилагином и пуникалагином. В качестве референса использован раствор ФСБ. Планки погрешностей отражают стандартное отклонение по результатам трех независимых воспроизведений

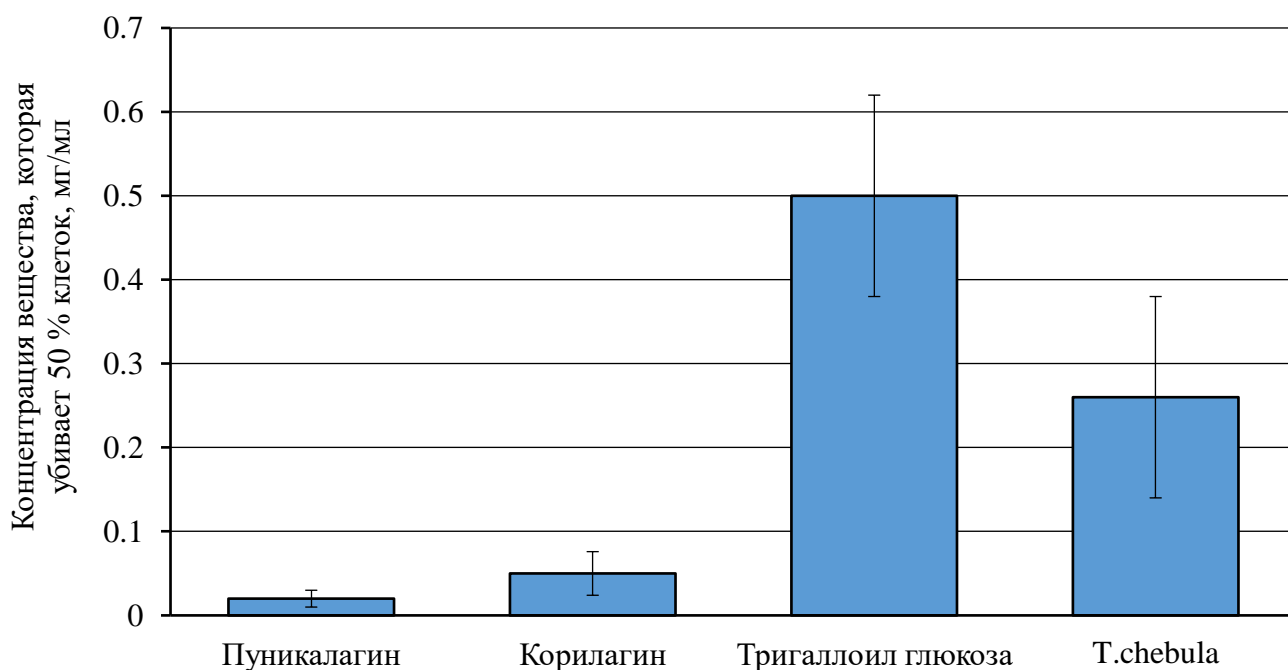


Рисунок 31 – Значения CC50 (цитотоксического действия) химически чистых компонентов: пуникалагина, корилагина и тригаллоил глюкозы.

Планки погрешностей отражают стандартное отклонение по результатам трех независимых воспроизведений

Для каждого химического компонента определен индекс селективности. Индекс селективности рассчитывается отношением концентрации цитотоксического действия компонента на клетки (CC50) к его концентрации 50%-го эффективного действия на вирус (EC50). Расчеты показали, что наибольшим индексом селективности обладает тригаллоил глюкоза – 55,5; меньшее значение имеют пуникалагин – 29 и корилагин – 25.

Изучение аффинности аптамеров. Нарботанная оцДНК-аптамера после 8-го раунда проверена 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. Растировка ВКЭ прикреплялась к планшету (тест-система «АГКЭ», Вектор-Бест, Новосибирск) через иммобилизованные иммуноглобулины G. Растировка 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 «АГ_{КЭ}» (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. Конъюгат содержал моноклональные антитела к ВКЭ, конъюгированные с пероксидазой хрена. 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 (C_q). В результате проверки получен следующий набор данных, который представлен виде диаграммы (Рисунок 32).

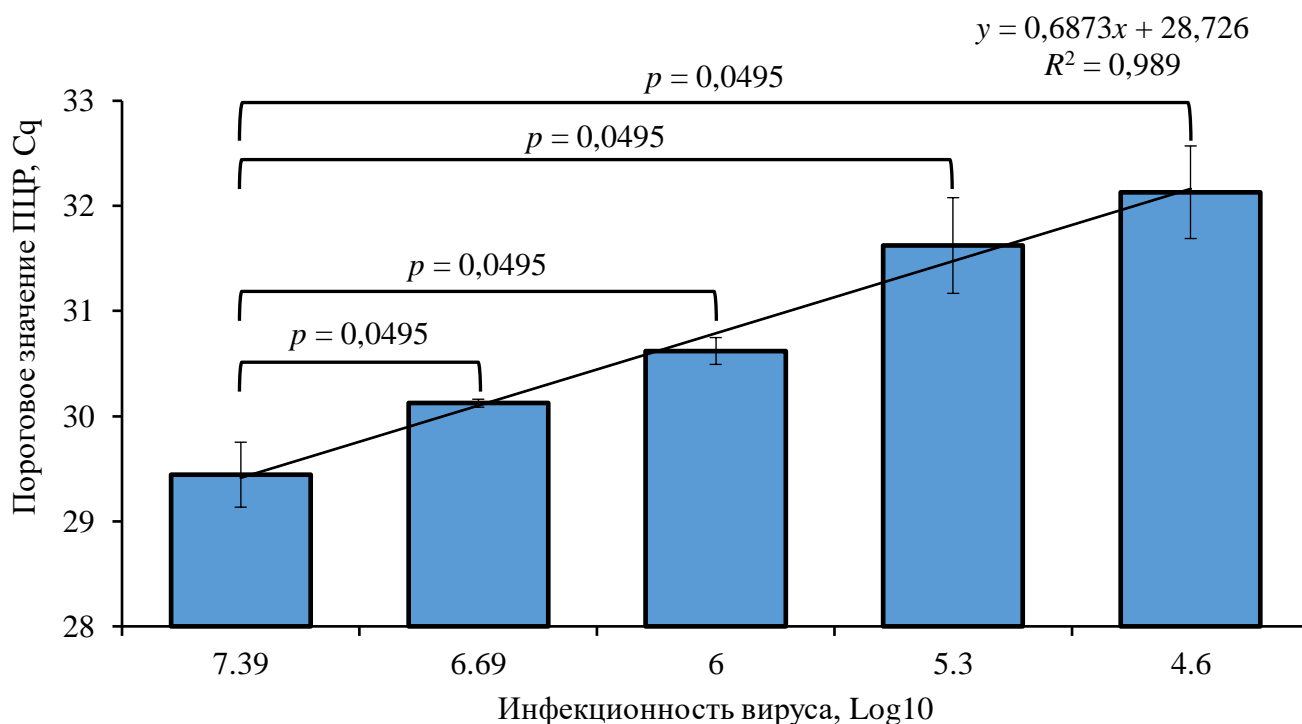


Рисунок 32 – Диаграмма зависимости концентрации аптамеров (Cq) от концентрации иммобилизованного вируса клещевого энцефалита на полистероловый планшет

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 33).

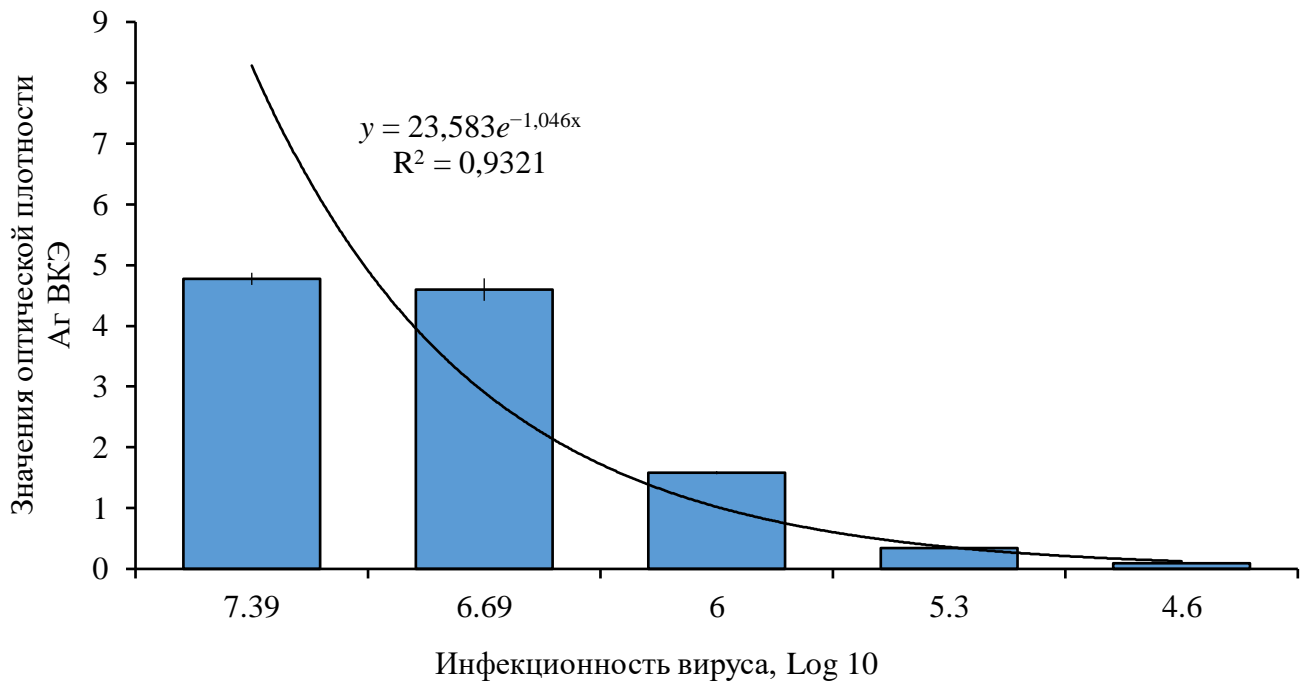


Рисунок 33 – Диаграмма зависимости контроля антигенных детерминант ВКЭ от концентрации иммобилизованного вируса клещевого энцефалита на полистероловый планшет

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 п. н.). При этом у двух клонов (№ 3 и № 6) центральный регион составил 39 пар нуклеотидов. Еще у одного клона (№ 12) центральный регион составил 37 пар нуклеотидов. 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	CGTGGTTACAGTCAGAGGAGCCATCCAAGTGTGATTCAAATTTAA TGTTACCCATAAGTTGCATAGGTAGTCCAGAAGCC
2	GGCTTCTGGACTACCTATGCGCTTATGTAAAATATCCCTTGAGAG TAAATGGTTATTATCGTGGTTACAGTCAGAGGAG
3	GGCTTCTGGACTACCTATGCGTTCAACTTTTGCAGCAACAAAATA CATA CGGCATACTACCGTGGTTACAGTCAGAGGAG
4	CGTGGTTACAGTCAGAGGAGTGTGTTTCATTTCTTAGAGAGCTGT TACCACAATAGTCAGCATAGGTAGTCCAGAAGCC
5	CTCCTCTGACTGTAACCACGGGCTAAAATCATAAGCTCCGTGCAG GCACTTAAGGAAGGTGCATAGGTAGTCCAGAAGCC
6	GGCTTCTGGACTACCTATGCTAATGTACGAACAAAACTTAATAG AACTGCCATCTCATA CGTGGTTACAGTCAGAGGAG
7	CTCCTCTGACTGTAACCACGAAATACTGCTGATCGGTGGTGGGGG GGTGTGGTGAGATAAGCATAGGTAGTCCAGAAGCC
8	CTCCTCTGACTGTAACCACGATATATTGTAATGTTGGCAAGTGTTT TATTTTTTTGTACGCATAGGTAGTCCAGAAGCC
9	CTCCTCTGACTGTAACCACGCATAGGTAGTCCAGAAGCCACCTCC TCTGACTGTGGCCACGCATAGGTAGTCCAGAAGCC
10	CTCCTCTGACTGTAACCACGGATGGTGTGACATTTTGCCGAGTTA GCTTCTATAATTGCAGCATAGGTAGTCCAGAAGCC
11	CTCCTCTGACTGTAACCACGTAGGTCCGGGGGGGGTGGGTGTGGA GGACAGTGAGTTACTGCATAGGTAGTCCAGAAGCC
12	CTCCTCTGACTGTAACCACGCATAGGTAGTCCAGAAACCATCTCC TCTGACTGTA ACTACGCATAGGTAGTCCAGAAGCC
13	CTCCTCTGACTGTAACCACGAGTTGATGGACCATATATAAATATT CTCGATCTTATAAGAGCATAGGTAGTCCAGAAGCC
14	CTCCTCTGACTGTAACCACGGGATTTTGTATTTGTGGGATTTTATT GGGGGATCGTAGCATAGGTAGTCCAGAAGCC
15	CTCCTCTGACTGTAACCACGGCACAATATAACTAAACATAATTTCG AACCCCTGACTGTAAGCATAGGTAGTCCAGAAGCC
16	CTCCTCTGACTGTAACCACGCATAGGTAGTCCAGAAGCCATCTCC TCTGACTGTAACCACGCATAGGTAGTCCAGAAGCC

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 34).

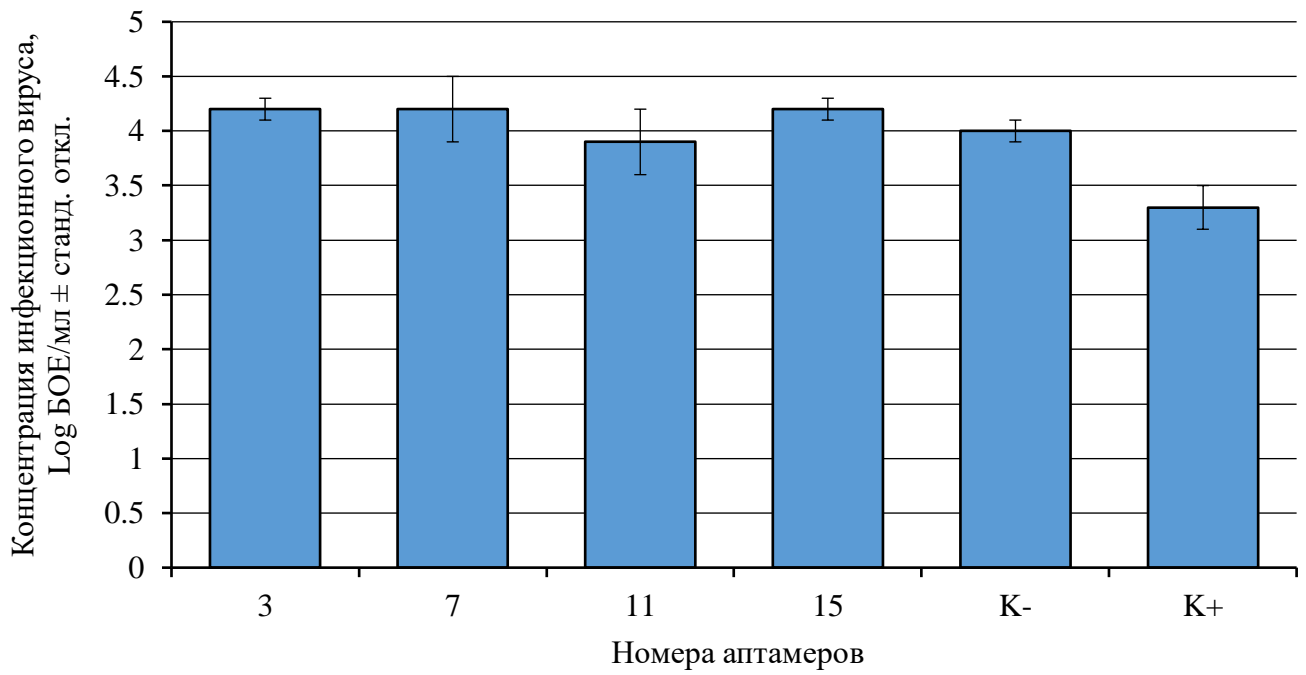


Рисунок 34 – Значения прямого вирулицидного действия на ВКЭ аптамерами 3, 7, 11, 15; diH_2O (K-), иммуноглобулин G (K+).

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.

Осуществлен подбор наиболее оптимального метода очистки химических компонентов водного экстракта *T. chebula* с помощью метода жидкостной хроматографии. При использовании проверенных подвижных фаз (diH₂O, 60%-й ацетонитрил, 85%-й ацетон) установлено, что применение 85%-го ацетона наиболее приемлемо для препаративной хроматографической очистки. Масс-спектрометрический анализ активных фракций от жидкостной хроматографии позволил выявить корреляцию между вирулицидным индексом и концентрацией иона 635. Фрагментация кандидатного вирулицидного компонента позволила предположить, что активным компонентом могут быть корилагин и тригаллоил глюкоза.

Для получения более качественной картины разделения растительных компонентов проведена ВЭЖХ. Результаты проверки прямого вирулицидного действия фракций позволили выделить наиболее активные фракции для масс-спектрометрического анализа. 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 вируса клещевого энцефалита 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 [105]. Показано, что эти два 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.

В результате проверки из трех идентифицированных нами компонентов пуникалагин определен как самый активный вирулицидный агент. Данные экспериментов согласуются с данными по вирулицидной активности пуникалагина из фракций, полученных при очистке с помощью ВЭЖХ.

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 вирус клещевого энцефалита 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 успешно клонирован в вектор pJET1.2/blunt. 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

bFGF	– фактор роста фибробластов (basic fibroblast growth factor)
CC50	– 50%-я цитотоксичность препарата (50 % cytotoxicity concentration)
DAD	– детектор с диодной матрицей (diode array detector)
DC-SIGN	– Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
diH ₂ O	– деионизованная вода
E	– оболочечный белок ВКЭ
EC50	– 50%-я эффективная концентрация (50 % effective concentration)
ELISA	– enzyme-linked immunosorbent assay (иммуноферментный анализ)
HPLC-MS/MS	– высокоэффективная жидкостная хроматография – тандемная масс-спектрометрия (high performance liquid chromatography – mass spectrometry/mass spectrometry)
IFN γ	– гамма-интерферон
ICTV	– Международный комитет по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses)
LC-MS	– жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрией (liquid chromatography – mass spectrometry)
MALDI	– Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (matrix-assisted laser desorption/ionization)
mM	– миллимоль
MS	– масс-спектрометрия (mass spectrometry)
MS/MS	– тандемная масс-спектрометрия (mass spectrometry/mass spectrometry)
pM	– пикомоль

NGS	– высокопроизводительное секвенирование (англ. next generation sequencing)
NS1	– неструктурный белок ВКЭ NS1
NS2A	– неструктурный белок ВКЭ NS2A
NS2B	– неструктурный белок ВКЭ NS2B
NS3	– неструктурный белок ВКЭ NS3
NS4A	– неструктурный белок ВКЭ NS4A
NS4B	– неструктурный белок ВКЭ NS4B
NS5	– неструктурный белок ВКЭ NS5
PEG	– пегилирование
prM	– мембранный белок ВКЭ
SELEX	– систематическая эволюция лигандов при экспоненциальном обогащении (systematic evolution of ligands by exponential enrichment)
SI	– индекс селективности (selectivity index)
U	– единица активности фермента
БОЕ	– бляшкообразующая единица
ВИЧ	– вирус иммунодефицита человека
ВКЭ	– вирус клещевого энцефалита
ВОЗ	– Всемирная организация здравоохранения
ВЭЖХ	– высокоэффективная жидкостная хроматография
ДВ-ВКЭ	– Дальневосточный субтип вируса клещевого энцефалита
дцДНК	– двуцепочечная дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
Е-ВКЭ	– Европейский субтип вируса клещевого энцефалита
ИФА	– иммуноферментный анализ
КЭ	– клещевой энцефалит

н. о.	– нуклеотидные основания
НТО	– нетранслируемая область генома
ОП	– оптическая плотность
оцДНК	– одноцепочечная дезоксирибонуклеиновая кислота
п. н.	– пары нуклеотидов
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РНК	– рибонуклеиновая кислота
СИБ-ВКЭ	– Сибирский субтип вируса клещевого энцефалита
ТИБ-ВКЭ	– Тибетский субтип вируса клещевого энцефалита
ФСБ	– фосфатно-солевой буфер
ЦНС	– центральная нервная система
ЭПР	– эндоплазматический ретикулум
ЭСИ	– электроспрей-ионизация

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев, А. Н. Обмен вирусом между питающимися клещами при отсутствии вирусемии у позвоночного хозяина (дистантная передача) / А. Н. Алексеев, С. П. Чунихин // Медицинская паразитология. – 1991. – № 2. – С. 50–54.
2. Анализ геномов штаммов вируса клещевого энцефалита, обладающих различной вирулентностью для человека / С. И. Беликов, Г. Н. Леонова, И. Г. Кондратов [и др.] // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2010. – Т. 42, № 3. – С. 23–26.
3. Биологическая и молекулярно-генетическая характеристика дальневосточной популяции вируса клещевого энцефалита и ее патогенетическое значение / Г. Н. Леонова, С. И. Беликов, Е. В. Павленко [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2007. – Т. 52, № 6. – С. 13–17.
4. Борисов, В. А. Клещевой энцефалит / В. А. Борисов, И. В. Малов, Н. Д. Ющук. – Новосибирск : Наука, 2002. – С. 183.
5. Вакцинопрофилактика клещевого энцефалита в Челябинской области: масштабы вакцинации, популяционный иммунитет, анализ случаев заболевания привитых / С. В. Лучинина, А. И. Семенов, О. Н. Степанова [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2016. – Т. 15(1). – С. 67–76. – DOI: 10.31631/2073-3046-2016-15-1-67-76
6. Василенко, В. А. Клещевой энцефалит в Эстонской ССР / В. А. Василенко, А. А. Потоцкий, М. Г. Чернышова // ЖМЭ. – 1990. – С. 43–47.
7. Взаимосвязь основных показателей эпидемического процесса и зараженности людей и клещей вирусом клещевого энцефалита в очагах юга дальнего Востока / Г. Н. Леонова, О. С. Майстровская, Н. В. Крылова [и др.] // Гетерогенность популяций бактерий и вирусов и ее отражение в эпидемиологии и клинике инфекционных болезней. – Владивосток, 2013. – С. 62–63.

8. Вирус клещевого энцефалита в Монголии / М. А. Хаснатинов, Г. А. Данчинова, В. И. Злобин [и др.] // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2012. – № 4. – С. 9–12.

9. Вирус клещевого энцефалита в Монголии / М. А. Хаснатинов, Г. А. Данчинова, В. И. Злобин [и др.] // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2012. – Т. 111, № 4. – С. 9–12

10. Генетические и биологические свойства оригинальной группы штаммов вируса клещевого энцефалита, циркулирующей в Восточной Сибири / И. В. Козлова, М. М. Верховина, Т. В. Демина [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2012. – Т. 3 (64). – С. 14–25.

11. Есть ли у нас шансы на победу над гепатитом С? [Электронный ресурс] // Новости науки. Элементы. – Режим доступа: https://elementy.ru/novosti_nauki/432587/Est_li_u_nas_shansy_na_pobedu_nad_gepatitom_C (дата обращения: 9.06.2020).

12. Захарычева, Т. А. Клиническая характеристика эффективности специфической терапии при клещевом энцефалите в Хабаровском крае : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Захарычева Татьяна Адольфовна. – Пермь, 1993. – С. 18.

13. Злобин, В. И. Клещевой энцефалит в Восточной Сибири / В. И. Злобин, В. А. Борисов, М. М. Верховина. – Иркутск : РИО ВСНЦ СО РАМН, 2002. – С. 184.

14. Злобин, В. И. Клещевой энцефалит в Российской Федерации: современное состояние проблемы и стратегия профилактики / В. И. Злобин // Вопросы вирусологии. – 2005. – Вып. 3. – С. 26–31.

15. Злобин, В. И. Клещевой энцефалит в Российской Федерации: этиология, эпидемиология и стратегия профилактики / В. И. Злобин // Terra Medica. – 2010. – Вып. 2 (61). – С. 13–21.

16. Злобин, В. И. Клещевой энцефалит. Этиология, эпидемиология и профилактика в Сибири / В. И. Злобин, О. З. Горин. – Новосибирск : Наука, 1996. – С. 177.

17. Злобин, В. И. Клещевые трансмиссивные инфекции / В. И. Злобин, Н. В. Рудаков, И. В. Малов. – Новосибирск : Наука, 2015. – С. 224.

18. Ингибирующая активность флавоноидов байкальского шлемника относительно вируса клещевого энцефалита / Г. Н. Леонова, А. Л. Шутикова, В. А. Лубова [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2019. – Т. 168, № 11. – С. 611–614.

19. Инструкции по применению иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита; утв. Главным санитарным врачом РФ от 31.10.2005. – № 0111/19405.

20. Карпов, С. П. Иммунология клещевого энцефалита / С. П. Карпов, Ю. В. Федоров. – Томск, 1969. – С. 182.

21. Клещевой энцефалит в Восточной Сибири: этиология, молекулярная эпидемиология, особенности клинического течения / К. А. Аитов, Т. М. Бурданова, М. М. Верховина [и др.] // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2018. – Т. 7, № 3. – С. 31–40.

22. Клещевой энцефалит с молниеносным течением и летальным исходом у многократно вакцинированного пациента / В. В. Погодина, Л. С. Левина, С. М. Скрынник [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2013. – Т. 58 (2). – С. 33–37.

23. Кодирующие нуклеотидные последовательности штаммов вируса клещевого энцефалита, изолированных из крови людей без клинических проявлений инфекции / С. И. Беликов, Г. Н. Леонова, И. Г. Кондратов [и др.] // Генетика. – 2010. – Т. 46, № 3. – С. 356–363.

24. Комплексная характеристика оригинальной группы штаммов вируса клещевого энцефалита, изолированных на территории Восточной Сибири / Ю. П. Джигоев, С. Е. Ткачев, Л. С. Карань [и др.] // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2012. – Т. 111 (4). – С. 80–85.

25. Коренберг, Э. И. Природно-очаговые инфекции, передающиеся иксодовыми клещами / Э. И. Коренберг, В. Г. Помелова, Н. С. Осин. – М., 2013. – 463 с.

26. Крылова, Н. В. Антиоксиданты как потенциальные противовирусные препараты при флавивирусных инфекциях / Н. В. Крылова, А. М. Попов, Г. Н. Леонова // Антибиотики и химиотерапия. – 2016. – Т. 61. – С. 5–6.

27. Кузнецова, Р. И. Эпидемиологическая характеристика клещевого энцефалита в Ленинградской области / Р. И. Кузнецова // Клещевой энцефалит : Сборник научных трудов. – Т. 65. – С. 12–20.
28. Леонова, Г. Н. Ингибирование репликации вируса клещевого энцефалита препаратами эпросартан и рибавирин *in vitro* и *in vivo* / Г. Н. Леонова, О. С. Майстровская, В. А. Лубова // Антибиотики и химиотерапия. – 2020. – Т. 65 (9–10). – С. 8–12. – DOI: 10.37489/0235-2990-2020-65-9-10-8-12
29. Леонова, Г. Н. Клещевой энцефалит в Приморском крае / Г. Н. Леонова. – Владивосток : Дальнаука, 1997. – 187 с.
30. Леонова, Г. Н. Клещевой энцефалит: актуальные аспекты / Г. Н. Леонова. – М. : Издатель И. В. Балабанов, 2009. – С. 168.
31. Мейерова, Р. А. Хронические формы клещевого энцефалита в Приангарье / Р. А. Мейерова. – Иркутск : Изд-во Иркут. ун-та, 1992. – С. 232.
32. Молекулярное типирование штаммов вируса клещевого энцефалита, выделенных от людей с различной тяжестью инфекции на территории юга Дальнего Востока / Г. Н. Леонова, С. И. Беликов, Н. В. Кулакова [и др.] // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2004. – № 2. – С. 32–37.
33. Необычный случай летального исхода клещевого энцефалита у пациента, привитого вакцинами разных генотипов (Челябинская область) / В. В. Погодина, С. В. Лучинина, О. Н. Степанова [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2015. – Т. 1. – С. 56–64.
34. Никитин, А. Я. Эпидемиологическая ситуация по клещевому вирусному энцефалиту в Российской Федерации в 2019 г. и прогноз на 2020 г / А. Я. Никитин, Е. И. Андаев, Е. В. Яцменко // Проблемы особо опасных инфекций. – 2020. – № 1. – С. 33–42. – DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-33-42
35. Особенности эпидемиологической ситуации по клещевому вирусному энцефалиту в Российской Федерации в 2017 г. и прогноз ее развития на 2018 г. / А. Я. Никитин, Е. И. Андаев, А. К. Носков [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2018. – № 1. – С. 44–49.

36. Оценка органных, гематологических и биохимических проявлений токсичности высоких доз эхинохрома – 1,4-нафтохинонового препарата, полученного из морского ежа *scaphechinus mirabilis* / А. В. Цыбульский, А. А. Артюков, А. М. Попов, О. Н. Кривошапко // Токсикологический вестник. – 2012. – № 5 (116). – С. 18–22.

37. Пенъевская, Н. А. Оценка эффективности этиотропной профилактики инфекций, передающихся иксодовыми клещами: систематизация понятий и методологические особенности / Н. А. Пенъевская, Н. В. Рудаков // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2018. – №17 (6). – С. 48–56. – DOI: 10.31631/2073-3046-2018-17-6-48-56.

38. Пенъевская, Н. А. Эффективность применения препаратов иммуноглобулина для постэкспозиционной профилактики клещевого энцефалита в России (обзор полувекового опыта) / Н. А. Пенъевская, Н. В. Рудаков // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2010. – №1. – С. 53–59.

39. Песков, А. С. Роль Хабаровского НИИ эпидемиологии и микробиологии и филиала ФГУН НПО «Микроген» Хабаровского предприятия по производству бакпрепаратов в разработке и совершенствовании донорских специфических иммуноглобулинов против клещевого энцефалита / А. С. Песков, Г. М. Воронкова // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2007. – № 11. – С. 27–46.

40. Погодина, В. В. 70-летие открытия клещевого энцефалита. Путь к достоверной истории / В. В. Погодина // Вопросы вирусологии. – 2007. – № 5. – С. 5–8.

41. Погодина, В. В. Актуальные проблемы клещевого энцефалита на рубеже XX-XXI веков / В. В. Погодина // Медицинская вирусология. – 2015. – Т. XXIX (2). – С. 24–32.

42. Противовирусная активность сульфатированных полисахаридов из бурых водорослей при экспериментальном клещевом энцефалите / И. Д. Макаренко, Г. Н. Леонова, О. С. Майстровская [и др.] // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2012. – № 1. – С. 44–46.

43. Противовирусная композиция : Патент № 2697886 Рос. Федерация ; МПК А61К 31/122, А61К 31/355, А61К 31/375 / С. А. Федореев, Н. П. Мищенко, Е. А. Васильева [и др.] ; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук (ТИБОХ ДВО РАН), Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» (ФГБНУ «НИИ ЭМ имени Г. П. Сомова». – № 2018129035 ; заявл. 06.08.2018 ; опубл. 21.08.2019.

44. Профилактика клещевого вирусного энцефалита: Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.3.2352-08. – М., 2008.

45. Ранняя активация лимфоцитов и моноцитов периферической крови человека компонентами протеобактерий *Pseudomonas nigrifaciens* / Т. П. Смолина, Т. С. Запорожец, Р. П. Горшкова, Е. Л. Назаренко // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2009. – № 3. – С. 45–48.

46. Современные аспекты клиники клещевого энцефалита / А. К. Тарбеев, В. А. Борисов, И. В. Малов [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2007. – № 5. – С. 33–37.

47. Современные подходы к изучению клещевых трансмиссивных инфекций в Кузбассе на основе молекулярных методов / Н. В. Рудаков, С. А. Рудакова, А. Р. Ефимова [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2017. – Т. 16, № 1. – С. 26–28.

48. Способ профилактики клещевого энцефалита : Патент № 2261105 Рос. Федерация ; МПК А61К38/19 / Галюков И. А. ; правообладатель Уральская государственная академия физической культуры. – № 2004108925/14 ; заявл. 29.03.2004 ; опубл. 27.09.2005.

49. Субботин, А. В. Случай развития хронического клещевого энцефалита у вакцинированного пациента / А. В. Субботин, В. А. Семенов, В. Д. Смирнов // Журнал эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2014. – № 3. – С. 104–109.

50. Чунихин, С. П. Экология и географическое распространение арбовирусов / С. П. Чунихин, Г. Н. Леонова. – М. : Медицина, 1985. – 125 с.

51. Шаповал, А. Н. Клещевой энцефалит / А. Н. Шаповал. – М. : Медицина, 1980. – С. 254.
52. Шаповал, А. Н. Клещевой энцефаломиелит / А. Н. Шаповал. – Л. : Медицина, 1980. – С. 255.
53. Шубин, Н. В. Клещевой энцефалит в Западной Сибири : автореф. дис. ... докт. мед. наук / Шубин Николай Васильевич. – Томск, 1960. – С. 38.
54. 2'-deoxy purine, 2'-O-methyl pyrimidine (dRmY) aptamers as candidate therapeutics / P. E. Burmeister, C. Wang, J. R. Killough [et al.] // *Oligonucleotides*. – 2006. – Vol. 16. – P. 337–351.
55. 2'-fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain / J. Ruckman, L. S. Green, J. Beeson [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273 (32). – P. 20556–20567. – DOI: 10.1074/jbc.273.32.20556
56. A basic cluster in the N terminus of yellow fever virus NS2A contributes to infectious particle production / S. Voßmann, J. Wieseler, R. Kerber [et al.] // *J. Virol.* – 2015. – Vol. 89 (9). – P. 4951–4965. – DOI: 10.1128/JVI.03351-14
57. A capsule review of recent studies on the application of mass spectrometry in the analysis of Chinese medicinal herbs / Z. Cai, F. S. C. Lee, X. R. Wang [et al.] // *J. Mass Spectrom.* – 2002. – Vol. 37. – P. 1013–1024.
58. A cluster of two human cases of tick-borne encephalitis (TBE) transmitted by unpasteurised goat milk and cheese in Germany, May 2016 / S. O. Brockmann, R. Oehme, T. Buckenmaier [et al.] // *Euro Surveill.* – 2018. – Vol. 23 (15). – P. 17-00336.
59. A DNA aptamer prevents influenza infection by blocking the receptor binding region of the viral hemagglutinin / S. H. Jeon, B. Kayhan, T. Ben-Yedidia [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 48410–48419.
60. A flavivirus signal peptide balances the catalytic activity of two proteases and thereby facilitates virus morphogenesis / M. Lobigs, E. Lee, M. L. Ng [et al.] // *Virology.* – 2010. – Vol. 401 (1). – P. 80–89. – DOI: 10.1016/j.virol.2010.02.008

61. A G-quadruplex-containing RNA activates fluorescence in a GFP-like fluorophore / H. Huang, N. B. Suslov, N. S. Li [et al.] // *Nat. Chem. Biol.* – 2014. – Vol. 10 (8). – P. 686–691. – DOI: 10.1038/nchembio.1561

62. A new lignan with anti-HBV activity from the roots of *Bombax ceiba* / G. K. Wang, B. B. Lin, R. Rao [et al.] // *Nat. Prod. Res.* – 2013. – Vol. 27 (15). – P. 1348–1352.

63. A new naphthoquinone analogue and antiviral constituents from the root of *Rhinacanthus nasutus* / T. M. Ngoc, N. T. Phuong, N. M. Khoi [et al.] // *Nat. Prod. Res.* – 2019. – Vol. 33 (3). – P. 360–366.

64. A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau / X. Dai, G. Shang, S. Lu [et al.] // *China Emerg Microbes Infect.* – 2018. – Vol. 7 (1). – P. 74. – DOI: 10.1038/s41426-018-0081-6

65. A novel mechanism of antibody-mediated enhancement of flavivirus infection / D. Haslwanter, D. Blaas, F. X. Heinz [et al.] // *PLoS Pathog.* – 2017. – Vol. 13 (9). – P. e1006643. – DOI: 10.1371/journal.ppat.1006643

66. A protective chimeric antibody to tick-borne encephalitis virus / I. K. Baykov, A. L. Matveev, O. V. Stronin [et al.] // *Vaccine.* – 2014. – Vol. 32 (29). – P. 3589–3594. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.05.012

67. A putative host cell receptor for tick-borne encephalitis virus identified by anti-idiotypic antibodies and virus affino blotting / J. Kopecký, L. Grubhoffer, V. Kovár [et al.] // *Intervirology.* – 1999. – Vol. 42 (1). – P. 9–16. – DOI: 10.1159/000024954

68. A toggle switch controls the low pH-triggered rearrangement and maturation of the dengue virus envelope proteins / A. Zheng, F. Yuan, L. M. Kleinfelter [et al.] // *Nat. Commun.* – 2014. – Vol. 5. – P. 3877. – DOI: 10.1038/ncomms4877

69. Acosta, E. G. Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells / E. G. Acosta, V. Castilla, E. B. Damonte // *Cell Microbiol.* – 2009. – Vol. 11 (10) – P. 1533–1549. – DOI: 10.1111/j.1462-5822.2009.01345.x

70. Activity-based and fraction-guided analysis of *Phyllanthus urinaria* identifies loliolide as a potent inhibitor of hepatitis C virus entry / C. Y. Chung, C. H. Liu, T. Burnouf [et al.] // *Antiviral Res.* – 2016. – Vol. 30. – P. 58–68.

71. An mRNA structure that controls gene expression by binding S-adenosylmethionine / W. C. Winkler, A. Nahvi, N. Sudarsan [et al.] // *Nat. Struct. Biol.* – 2003. – Vol. 10. – P. 701–707.

72. Anaferon, released-active from of antibodies to IFN γ , as an effective medicine for treatment and prophylaxis of a wide spectrum of infections / S. A. Tarasov, M. V. Kachanova, E. A. Gorbunov [et al.] // *Clin. Res. Trials.* – 2016. – Vol. 2 (5). – P. 229–232. – DOI: 10.15761/CRT.1000152

73. Analysis of phenolic compounds in rhubarbs using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry / M. Ye, J. Han, H. Chen [et al.] // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 2007. – Vol. 18. – P. 82–91.

74. Analysis of the structural protein gene sequence shows Kyasanur Forest disease virus as a distinct member in the tick-borne encephalitis virus serocomplex / K. Venugopal, T. Gritsun, V. A. Lashkevich, E. A. Gould // *J. Gen. Virol.* – 1994. – Vol. 75 (1). – P. 227–232. – DOI: 10.1099/0022-1317-75-1-227

75. Antidepressants: From MAOIs to SSRIs and more / C. T. Ramachandrai, S. Narayana, B. K. Jurgen [et al.] // *Indian Journal of Psychiatry.* – 2011. – Vol. 53 (2). – P. 180–182. – DOI: 10.4103/0019-5545.82567

76. Anti-hepatitis C virus activity of 3-hydroxy caruilignan C from *Swietenia macrophylla* stems / S. F. Wu, C. K. Lin, Y. S. Chuang [et al.] // *J. Viral Hepat.* – 2012. – Vol. 19 (5). – P. 364–370.

77. Anti-HIV, anti-poxvirus, and anti-SARS activity of a nontoxic, acidic plant extract from the *Trifolium* species Secomet-V/anti-vac suggests that it contains a novel broad-spectrum antiviral / G. J. Kotwal, J. N. Kaczmarek, S. Leivers [et al.] // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2005. – Vol. 1056 (1). – P. 293–302. – DOI: 10.1196/annals.1352.014

78. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro ‘proof-of-concept’ / P. Cosa, A. J. Vlietinck, D. V. Berghe [et al.] // *J. Ethnopharmacol.* – 2006. – Vol. 106. – P. 290–302.

79. Anti-L-selectin aptamers: binding characteristics, pharmacokinetic parameters, and activity against an intravascular target *in vivo* / S. R. Watson, Y. F. Chang, D. O'Connell [et al.] // *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* – 2000. – Vol. 10. – P. 63–75.

80. Antimicrobial activity of certain natural-based plant oils against the antibiotic-resistant acne bacteria / A. Esmael, M. G. Hassan, M. M. Amer [et al.] // *Saudi J. Biol. Sci.* – 2020. – Vol. 27 (1). – P. 448–455. – DOI: 10.1016/j.sjbs.2019.11.006

81. Antioxidant therapy: Current status and future prospects / O. Firuzi, R. Miri, M. Tavakkoli [et al.] // *Curr. Med. Chem.* – 2011. – Vol. 18. – P. 3871–3888.

82. Antiviral activity of plants and their isolated bioactive compounds: An update / M. Denaro, A. Smeriglio, D. Barreca [et al.] // *Phytother. Res.* – 2020. – Vol. 34 (4). – P. 742–768. – DOI: 10.1002/ptr.6575

83. Antiviral activity of uridine derivatives of 2-deoxy sugars against tick-borne encephalitis virus / E. Krol, I. Wandzik, G. Brzuska [et al.] // *Molecules.* – 2019. – Vol. 24 (6). – P. 1129. – DOI: 10.3390/molecules24061129

84. Antiviral drug resistance as an adaptive process / K. K. Irwin, N. Renzette, T. F. Kowalik [et al.] // *Virus Evo.* – 2016. – Vol. 2 (1). – P. vew014.

85. Antiviral efficacy upon administration of a HepDirect prodrug of 2'-C-methylcytidine to hepatitis C virus-infected chimpanzees / S. S. Carroll, K. Koeplinger, M. Vavrek [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2011. – Vol. 55. – P. 3854–3860.

86. Application of biotechnology in production of medicinal plants / B. Siahshar, M. Rahimi, A. Tavassoli [et al.] // *Am. Eur. J. Agric. Environ. Sci.* – 2011. – Vol. 11. – P. 439–444.

87. Aptamer-17 β -estradiol-antibody sandwich ELISA for determination of gynecological endocrine function / Y. Huang, L. Zhang, Z. Li [et al.] // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 2021. – Vol. 68 (4). – P. 881–888. – DOI: 10.1002/bab.2008

88. Aptamer-facilitated protection of oncolytic virus from neutralizing antibodies / D. Muharemagic, A. Zamay, S. M. Ghobadloo [et al.] // *Mol. Ther. Nucleic Acids*. – 2014. – Vol. 3 (6). – P. 167. – DOI: 10.1038/mtna.2014.19
89. Aptamers as therapeutics / S. M. Nimjee, R. R. White, R. C. Becker [et al.] // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2017. – Vol. 57. – P. 61–79. – DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010716-104558
90. Aptamers in the therapeutics and diagnostics pipelines / H. Kaur, J. G. Bruno, A. Kumar [et al.] // *Theranostics*. – 2018. – Vol. 8 (15). – P. 4016–4032. – DOI: 10.7150/thno.25958
91. Apte-Sengupta, S. Coupling of replication and assembly in flaviviruses / S. Apte-Sengupta, D. Sirohi, R. J. Kuhn // *Curr. Opin. Virol.* – 2014 – Vol. 9. – P. 134–142. – DOI: 10.1016/j.coviro.2014.09.020
92. Arbidol (umifenovir): a broad-spectrum antiviral drug that inhibits medically important arthropod-borne flaviviruses / J. Haviernik, M. Štefánik, M. Fojtíková [et al.] // *Viruses*. – 2018. – Vol. 10 (4). – P. E184. – DOI: 10.3390/v10040184
93. Aristolochic acid-induced Fanconi's syndrome and nephropathy presenting as hypokalemic paralysis / S. S. Yang, P. Chu, Y. F. Lin [et al.] // *Am. J. Kidney Dis.* – 2002. – Vol. 39. – P. E14. – DOI: 10.1053/ajkd.2002.31425
94. Atrasheuskaya, A. V. Changes in immune parameters and their correction in human cases of tick-borne encephalitis / A. V. Atrasheuskaya, T. M. Fredeking, G. M. Ignatyev // *Clin Exp Immunol.* – 2003. – Vol. 131. – P. 148–154.
95. Bandaranayake, W. M. Quality control, screening, toxicity and regulations of herbal drugs / W. M. Bandaranayake // In: *Modern phytomedicine: Turning medicinal plants into drugs*; ed. by I. Ahmad, F. Aqil, M. Owais. – New York: John Wiley and Sons, 2006. – P. 25–57.
96. Best, S. M. The many faces of the flavivirus NS5 protein in antagonism of type I interferon signaling / S. M. Best // *J. Virol.* – 2017. – Vol. 91 (3). – P. e01970–16. – DOI: 10.1128/JVI.01970-16

97. Bhagwat, S. USDA database for the flavonoid content of selected foods / S. Bhagwat, D. B. Haytowitz, J. M. Holden // Release 3. Agricultural Research Service. – 2011. – Vol. 2. – P. 98–103.
98. Blaising, J. Arbidol as a broad-spectrum antiviral: an update / J. Blaising, S. J. Polyak, E. I. Pécheur // Antivir. Res. – 2014. – Vol. 107. – P. 84–94. – DOI: 10.1016/j.antiviral.2014.04.006
99. Blocking the initiation of coagulation by RNA aptamers to factor VIIa / C. P. Rusconi, A. Yeh, H. K. Lyerly [et al.] // Thromb. Haemost. – 2000. – Vol. 84. – P. 841–848.
100. Blouin, S. Folding of the lysine riboswitch: importance of peripheral elements for transcriptional regulation / S. Blouin, R. Chinnappan, D. A. Lafontaine // Nucleic Acids Res. – 2011. – Vol. 39 (8). – P. 3373–3387. – DOI: 10.1093/nar/gkq1247
101. Bogovic, P. Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management / P. Bogovic, F. Strle // World J. Clin. Cases. – 2015. – Vol. 3 (5). – P. 430–441. – DOI: 10.12998/wjcc.v3.i5.430
102. Bogovic, P. What tick-borne encephalitis may look like: clinical signs and symptoms / P. Bogovic, S. Lotric-Furlan, F. Strle // Trav. Med. Infect. Dis. – 2010. – Vol. 8 (4). – P. 246–250. – DOI: 10.1016/j.tmaid.2010.05.011
103. Boullata, J. I. Safety issues with herbal medicine / J. I. Boullata, A. M. Nace // Pharmacotherapy. – 2000. – Vol. 20. – P. 257–269. – DOI: 10.1592/phco.20.4.257.34886
104. Broad-spectrum agents for flaviviral infections: dengue, Zika and beyond / V. Boldescu, M. Behnam, N. Vasilakis [et al.] // Nat. Rev. Drug Discov. – 2017. – Vol. 16. – P. 565–586. – DOI: 10.1038/nrd.2017.33
105. Broad-spectrum antiviral activity of chebulagic acid and punicalagin against viruses that use glycosaminoglycans for entry / L. T. Lin, T. Y. Chen, S. C. Lin [et al.] // BMC Microbiol. – 2013. – Vol. 13. – P. 187. – DOI: 10.1186/1471-2180-13-187
106. Brody, E. N. Aptamers as therapeutic and diagnostic agents / E. N. Brody, L. Gold // J. Biotechnol. – 2000. – Vol. 74. – P. 5–13.

107. Broker, M. After a tick bite in a tick-borne encephalitis virus endemic area: current positions about postexposure treatment / M. Broker, H. Kollaritsch // *Vaccine*. – 2008. – Vol. 26. – P. 863–868. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.11.046
108. Bunka, D. H. J. Aptamers come of age – at last / D. H. J. Bunka, P. G. Stockley // *Nature Review. Microbiology*. – 2006. – Vol. 4. – P. 588–596.
109. Burgstaller, P. Aptamers and aptazymes: accelerating small molecule drug discovery / P. Burgstaller, A. Jenne, M. Blind // *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* – 2002. – Vol. 5. – P. 690–700.
110. Burke, D. S. Flavivirus / D. S. Burke, T. P. Monath // In : *Field virology ; 4th ed. ; ed. by D. M. Knipe, P. M. Howley*. – Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001. – P. 852–921.
111. Caffeic acid derivatives: A new type of influenza neuraminidase inhibitors / Y. Xie, B. Huang, K. Yu [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2013. – P. 3556–3560.
112. Cannell, R. J. P. Natural products isolation / R. J. P. Cannell. – New Jersey : Human Press Inc., 1998. – P. 165–208.
113. Capturing a flavivirus pre-fusion intermediate / B. Kaufmann, P. R. Chipman, H. A. Holdaway [et al.] // *PLoS Pathog.* – 2009. – Vol. 5 (11). – P. e1000672. – DOI: 10.1371/journal.ppat.1000672
114. Characterization of a Siberian virus isolated from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis / T. S. Gritsun, T. V. Frolova, A. I. Zhankov [et al.] // *J. Virol.* – 2003. – Vol. 77 (1). – P. 25–36.
115. Characterization of a structural intermediate of flavivirus membrane fusion / K. Stiasny, C. Kössl, J. Lepault [et al.] // *PLoS Pathog.* – 2007. – Vol. 3 (2). – P. e20. – DOI: 10.1371/journal.ppat.0030020
116. Charlton, J. In vivo imaging of inflammation using an aptamer inhibitor of human neutrophil elastase / J. Charlton, J. Sennello, D. Smith // *Chem. Biol.* – 1997. – Vol. 4. – P. 809–816.
117. Chemical defense balanced by sequestration and de novo biosynthesis in a lepidopteran specialist / J. Fürstenberg-Hägg, M. Zagrobelny, K. Jørgensen [et al.]

// PLoS One. – 2014. – Vol. 9 (10). – P. e108745. – DOI: 10.1371/journal.pone.0108745

118. Chen, J. Y. Development of hepatitis C virus vaccine using hepatitis B core antigen as immuno-carrier / J. Y. Chen, F. Li // *World Journal of Gastroenterology*. – 2006. – Vol. 12 (48). – P. 7774–7778. – DOI: 10.3748/wjg.v12.i48.7774

119. Chikungunya fever / M. Chhabra, V. Mittal, D. Bhattacharya [et al.] // *Indian J. Med. Microbiol.* – 2008. – Vol. 26 (1). – P. 5–12.

120. Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China / Chinese Pharmacopoeia Commission. – Beijing, China : China Medical Science Press, 2010.

121. Collett, J. R. Production and processing of aptamer microarrays / J. R. Collett, E. J. Cho, A. D. Ellington // *Methods*. – 2005. – Vol. 37. – P. 4–15.

122. Comparative transcriptome analysis to identify putative genes involved in thymol biosynthesis pathway in medicinal plant *Trachyspermum ammi* L / M. S. Howyzeh, S. A. S. Noori, V. Shariati [et al.] // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol. 8. – P. 13405. – DOI: 10.1038/s41598-018-31618-9

123. Comparison of P388D1 mouse macrophage cell line and human monocytes for assay of dengue-2 infection-enhancing antibodies / S. B. Halstead, K. Larsen, S. Kliks [et al.] // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 1983. – Vol. 32 (1). – P. 157–163. – DOI: 10.4269/ajtmh.1983.32.157

124. Comparison of the epidemiological and clinical features of tick-borne encephalitis in children and adults / M. Logar, M. Arnez, J. Kolbl [et al.] // *Infection*. – 2000. – Vol. 28. – P. 74–77. – DOI: 10.1007/s150100050050

125. Comprehensive N-glycosylation mapping of envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus grown in human and tick cells / E. Lattová, P. Straková, P. Pokorná-Formanová [et al.] // *Sci. Rep.* – 2020. – Vol. 10. – P. 13204. – DOI: 10.1038/s41598-020-70082-2

126. Conformational heterogeneity of the HIV envelope glycan shield / M. Yang, J. Huang, R. Simon [et al.] // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7. – P. 1–15.

127. Contemporary possibilities of extra nonspecific prophylaxis of tick born encephalitis in children / N. V. Skripchenko, N. V. Morgatskiy, G. P. Ivanova [et al.] // *Pediatricheskaya farmakologiya*. – 2007. – Vol. 7. – P. 23–26.

128. Context-dependent cleavage of the capsid protein by the West Nile virus protease modulates the efficiency of virus assembly / L. A. Van Blargan, K. A. Davis, K. A. Dowd [et al.] // *J. Virol.* – 2015. – Vol. 89 (16). – P. 8632–8642. – DOI: 10.1128/JVI.01253-15

129. Cör, D. Antitumour, antimicrobial, antioxidant and antiacetylcholinesterase effect of ganoderma lucidum terpenoids and polysaccharides: A review / D. Cör, Ž. Knez, M. Knez Hrnčič // *Molecules*. – 2018. – Vol. 23(3). – P. 649. – DOI: 10.3390/molecules23030649

130. Coutinho, E. M. Gossypol: A contraceptive for men / E. M. Coutinho // *Contraception*. – 2002. – Vol. 65 (4). – P. 259–263. – DOI: 10.1016/s0010-7824(02)00294-9

131. Creating plant molecular factories for industrial and nutritional isoprenoid production / M. Nogueira, E. M. Enfissi, J. Almeida [et al.] // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2018. – Vol. 49. – P. 80–87. – DOI: 10.1016/j.copbio.2017.08.002

132. Crotty, S. RNA virus error catastrophe: Direct molecular test by using ribavirin / S. Crotty, C. E. Cameron, R. Andino // *P. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2001. – Vol. 98. – P. 6895–6900.

133. Crystal structure of the capsid protein from Zika virus / Z. Shang, H. Song, Y. Shi [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2018. – Vol. 430 (7). – P. 948–962. – DOI: 10.1016/j.jmb.2018.02.006

134. CS-SELEX generates high-affinity ssDNA aptamers as molecular probes for hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 / F. Chen, Y. Hu, D. Li [et al.] // *PLoS One*. – 2009. – Vol. 4. – P. 12.

135. C-terminal fragment of human laminin-binding protein contains a receptor domain for venezuelan equine encephalitis and tick-borne encephalitis viruses / A. A. Malygin, E. I. Bondarenko, V. A. Ivanisenko [et al.] // *Biochemistry (Mosc)*. – 2009. – Vol. 74 (12). – P. 1328–1336. – DOI: 10.1134/s0006297909120050

136. Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology / M. Darmostuk, S. Rimpelova, H. Gbelcova [et al.] // *Biotechnol. Adv.* – 2015. – Vol. 33 (6 Pt 2). – P. 1141–1161. – DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.02.008
137. Current strategies for inhibition of chikungunya infection / B. Subudhi, S. Chattopadhyay, P. Mishra [et al.] // *Viruses.* – 2018. – Vol. 10 (5). – P. 235.
138. Danielová, V. Transovarial transmission rates of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks / V. Danielová, J. Holubová // In: Dusbabek F., Bukva V. (eds). *Modern acarology.* – Prague, Czech Republic : SPB Academic Publishing, 1991. – Vol. 2. – P. 7–10.
139. De Clercq, E. A 40-year journey in search of selective antiviral chemotherapy / E. De Clercq // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2011. – Vol. 51. – P. 1–24.
140. De Clercq, E. Antiviral agents acting as DNA or RNA chain terminators / E. De Clercq, J. Neyts // *Handb. Exp. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 189. – P. 53–84.
141. Dengue virus genome uncoating requires ubiquitination / L. A. Byk, N. G. Iglesias, F. A. De Maio [et al.] // *mBio.* – 2016. – Vol. 7 (3). – P. e00804–e00816. – DOI: 10.1128/mBio.00804-16
142. Derivation of RNA aptamer inhibitors of human complement C5 / G. Biesecker, L. Dihel, K. Enney [et al.] // *Immunopharmacology.* – 1999. – Vol. 42. – P. 219–230.
143. Designing and analysis of a potent bi-functional aptamers that inhibit protease and helicase activities of HCV NS3 / T. Umehara, K. Fukuda, F. Nishikawa [et al.] // *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf.).* – 2004. – Vol. 48. – P. 195–196.
144. Detection and plasma pharmacokinetics of an anti-vascular endothelial growth factor oligonucleotide-aptamer (NX1838) in rhesus monkeys / C. E. Tucker, L. S. Chen, M. B. Judkins [et al.] // *J. Chromatogr. Biomed. Sci. Appl.* – 1999. – Vol. 732. – P. 203–212.
145. Diamond, M. S. The structural immunology of antibody protection against West Nile virus / M. S. Diamond, T. C. Pierson, D. H. Fremont // *Immunol. Rev.* – 2008. – Vol. 225. – P. 212–225.

146. Direct in vitro selection of a 2'-O-methyl aptamer to VEGF / P. E. Burmeister, S. D. Lewis, R. F. Silva [et al.] // Chem. Biol. – 2005. – Vol. 12. – P. 25–33.

147. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells / H. M. van der Schaar, M. J. Rust, C. Chen [et al.] // PLoS Pathog. – 2008. – Vol. 4 (12). – P. e1000244. – DOI: 10.1371/journal.ppat.1000244

148. Diversity of oligonucleotide functions / L. Gold, B. Polisky, O. Uhlenbeck [et al.] // Annu. Rev. Biochem. – 1995. – Vol. 64. – P. 763–797.

149. DNase-mediated single-cycle selection of aptamers for proteins blotted on a membrane / Y. Liu, C. Wang, F. Li [et al.] // Anal. Chem. – 2012. – Vol. 84 (18). – P. 7603–7606.

150. Dowd, K. A. Antibody-mediated neutralization of flaviviruses: A reductionist view / K. A. Dowd, T. C. Pierson // Virology. – 2011. – Vol. 411 (2). – P. 306–315. – DOI: 10.1016/j.virol.2010.12.020

151. Dueva, E. V. Homeopathy in disguise. Comment on Don et al.: dosedependent antiviral activity of released-active form of antibodies to interferongamma against influenza A / E. V. Dueva, A. Y. Panchin // J. Med. Virol. – 2017. – Vol. 89. – P. 1125–1126. – DOI: 10.1002/jmv.24761

152. Dumpis, U. Tick-borne encephalitis / U. Dumpis, D. Crook, J. Oksi // Clin. Infect. Dis. – 1999. – Vol. 28. – P. 882–890. – DOI: 10.1086/515195

153. Dunnick, J. K. The toxicity and pathology of selected dietary herbal medicines / J. K. Dunnick, and A. Nyska // Toxicol. Pathol. – 2013. – Vol. 41. – P. 374–386. – DOI: 10.1177/0192623312466451

154. Duraipandiyan, V. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India / V. Duraipandiyan, M. Ayyanar, S. Ignacimuthu // BMC Complement Altern. Med. – 2006. – Vol. 6 (35). – DOI: 10.1186/1472-6882-6-35

155. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe: Transmission dynamics in multi-host systems, influence of molecular processes and effects of climate

change / A. Mannelli, L. Bertolotti, L. Gern [et al.] // FEMS Microbiol. Rev. – 2012. – Vol. 36 (4). – P. 837–861. – DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00312.x

156. Electron tomography analysis of tick-borne encephalitis virus infection in human neurons / T. Bílý, M. Palus, L. Eyer [et al.] // Sci. Rep. – 2015. – Vol. 5. – P. 10745. – DOI: 10.1038/srep10745

157. Electrospray ionization mass spectrometry: A technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte / S. Banerjee, S. Mazumdar // Int. J. Anal. Chem. – 2012. – Vol. 2012. – P. 282574. – Doi: 10.1155/2012/282574

158. Ellington, A. E. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands / A. E. Ellington, J. W. Szostak // Nature. – 1990. – Vol. 346. – P. 818–822.

159. Enhanced taxonomy annotation of antiviral activity data from ChEMBL / A. A. Nikitina, A. A. Orlov, L. I. Kozlovskaya [et al.] // Database. – 2019. – Vol. 2019. – bay139. – DOI: 10.1093/database/bay139

160. Epitope mapping of Japanese encephalitis envelope protein using monoclonal antibodies against an Indian strain / D. Cecilia, D. A. Gadkari, N. Kedarnath [et al.] // J. Gen. Virol. – 1988. – Vol. 69. – P. 2741–2747.

161. Escape of tick-borne flavivirus from 2'-Cmethylated nucleoside antivirals is mediated by a single conservative mutation in NS5 that has a dramatic effect on viral fitness / L. Eyer, H. Kondo, D. Zouharova [et al.] // J. Virol. – 2017. – Vol. 91 (21). – P. e01028-17. – DOI: 10.1128/JVI.01028-17

162. Essential oil yield and agro-morphological traits in some Iranian ecotypes of ajowan (*Carum copticum* L.) / M. Niazian, S. A. Sadat Noori, M. Tohidfar [et al.] // J. Essent. Oil Bear Plants. – 2017. – Vol. 20. – P. 1151–1156. – DOI: 10.1080/0972060X.2017.1326849

163. Ethnopharmacology in overdrive: The remarkable anti-HIV activity of *Artemisia annua* / A. Lubbe, I. Seibert, T. Klimkait [et al.] // J. Ethnopharmacol. – 2012. – P. 854–859.

164. European Centre for Disease Prevention and Control. Epidemiological situation of tick-borne encephalitis in the European Union and European Free Trade

Association countries / European Centre for Disease Prevention and Control. – 2012. – DOI: 10.2900/62311

165. Evaluation of direct antiviral activity of the Deva-5 herb formulation and extracts of five Asian plants against influenza A virus H3N8 / N. Oyuntsetseg, M. A. Khasnatinov, P. Molor-Erdene [et al.] // BMC Complement Altern. Med. – 2014. – Vol. 14. – P. 235. – DOI: 10.1186/1472-6882-14-235

166. Evidence for antigenic stability of tick-borne encephalitis virus by the analysis of natural isolates / F. Guirakhoo, A. C. Radda, F. X. Heinz [et al.] // J. Gen. Virol. – 1987. – Vol. 68 (3). – P. 859–864. – DOI: 10.1099/0022-1317-68-3-859

167. Extension of flavivirus protein C differentially affects early RNA synthesis and growth in mammalian and arthropod host cells / S. Schrauf, C. W. Mandl, L. Bell-Sakyi [et al.] // J. Virol. – 2009. – Vol. 83 (21). – P. 11201–11210. – DOI: 10.1128/JVI.01025-09

168. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts / S. Sasidharan, Y. Chen, D. Saravanan [et al.] // Afr. J. Tradit. Complement Altern. Med. – 2011. – Vol. 8 (1). – P. 1–10.

169. Eyetech Study Group. Antivascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age related macular degeneration: Phase II study results / Eyetech Study Group // Ophthalmology. – 2003. – Vol. 110. – P. 979–986.

170. Eyetech Study Group. Preclinical and phase 1A clinical evaluation of an anti-VEGF pegylated aptamer (EYE001) for the treatment of exudative age related macular degeneration / Eyetech Study Group // Retina. – 2002. – Vol. 22. – P. 143–152.

171. Fabricant, D. S. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery / D. S. Fabricant, N. R. Farnsworth // Environ. Health Perspect. – 2001. – Vol. 109. – P. 69–75. – DOI: 10.1289/ehp.01109s169

172. Fanconi's syndrome, interstitial fibrosis and renal failure by aristolochic acidin Chinese herbs / Y. T. Hong, L. S. Fu, L. H. Chung [et al.] // Pediatr. Nephrol. – 2006. – Vol. 21. – P. 577–579. – DOI: 10.1007/s00467-006-0017-6

173. Fayyad, A. G. Phytochemical screening and antiviral activity of *Marrubium vulgare* / A. G. Fayyad, N. Ibrahim, W. A. Yaakob // *Malays. J. Microbiol.* – 2014. – Vol. 10 (2). – P. 106–111.
174. Fitter, S. Deconvolution of a complex target using DNA aptamers / S. Fitter, R. James // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280. – P. 34193–34201.
175. Flaviviridae / B. D. Lindenbach, C. L. Murray, H.-J. Thiel [et al.] // In: *Fields virology*; ed. by D. Knipe, P. Howley. – Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
176. Flavivirus entry receptors: An update / M. Perera-Lecoin, L. Meertens, X. Carnec [et al.] // *Viruses.* – 2013. – Vol. 6 (1). – P. 69–88. – DOI: 10.3390/v6010069
177. Force-induced globule-coil transition in laminin binding protein and its role for viral-cell membrane fusion / B. N. Zaitsev, F. Benedetti, A. G. Mikhaylov [et al.] // *J. Mol. Recognit.* – 2014. – Vol. 27 (12). – P. 727–38. – DOI: 10.1002/jmr.2399
178. Fusion activity of flaviviruses: comparison of mature and immature (prM-containing) tick-borne encephalitis virions / F. Guirakhoo, F. X. Heinz, C. W. Mandl [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 1991. – Vol. 72 (6). – P. 1323–1329. – DOI: 10.1099/0022-1317-72-6-1323
179. GAG-binding variants of tick-borne encephalitis virus / L. I. Kozlovskaya, D. I. Osolodkin, A. S. Shevtsova [et al.] // *Virology.* – 2010. – Vol. 398 (2). – P. 262–72. – DOI: 10.1016/j.virol.2009.12.012
180. Garst, A. D. Riboswitches: structures and mechanisms / A. D. Garst, A. L. Edwards, R. T. Batey // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* – 2011. – Vol. 3 (6). – P. a003533. – DOI: 10.1101/cshperspect.a003533
181. Genomics grand for diversified plant secondary metabolites / X. Fang, C. M. A. Q. Yang, L. Yang [et al.] // *Plant Divers Resour.* – 2011. – Vol. 33. – P. 53–64.
182. GnRH binding RNA and DNA Spiegelmers: A novel approach toward GnRH antagonism / S. Leva, A. Lichte, J. Burmeister [et al.] // *Chem. Biol.* – 2002. – Vol. 9. – P. 351–359.

183. Gould, E. A. Growth, titration and purification of togaviruses / E. A. Gould, J. C. S. Clegg // In: *Virology: A practical approach*; ed. by B. W. J. Mahy – Oxford: IRL Press Ltd., 1985. – P. 43–48.

184. Gritsun, T. S. Tick-borne flaviviruses / T. S. Gritsun, P. A. Nuttall, E. A. Gould // In: *Advances in Virus Research*; ed. by T. J. Chambers, T. P. Monath. – 2003. – Vol. 61. – P. 317–371.

185. Guirakhoo, F. Epitope model of tick-borne encephalitis virus envelope glycoprotein E: Analysis of structural properties, role of carbohydrate side chain, and conformational changes occurring at acidic pH / F. Guirakhoo, F. X. Heinz, C. Kunz // *Virology*. – 1989. – Vol. 169 (1). – P. 90–99. – DOI: 10.1016/0042-6822(89)90044-5

186. Harrison, A. The importance of the aggregation of ticks on small mammal hosts for the establishment and persistence of tick-borne pathogens: An investigation using the R0 model / A. Harrison, N. Bennett // *Parasitology*. – 2012. – Vol. 139 (12). – P. 1605–1613. – DOI: 10.1017/S0031182012000893

187. Hassan, A. R. B. Medicinal plants (importance and uses) / A. R. B. Hassan // *Pharm. Anal. Acta*. – 2012. – P. e139.

188. Heinz, F. X. Flaviviruses and their antigenic structure / F. X. Heinz, K. Stiasny // *J. Clin. Virol* – 2012. – Vol. 55. – P. 289–295. – DOI: 10.1016/j.jcv.2012.08.024

189. Helices alpha2 and alpha3 of West Nile virus capsid protein are dispensable for assembly of infectious virions / P. Schlick, C. Taucher, B. Schittl [et al.] // *J. Virol*. – 2009. – Vol. 83 (11). – P. 5581–5591. – DOI: 10.1128/JVI.02653-08

190. Hendrix, D. K. RNA structural motifs: building blocks of a modular biomolecule / D. K. Hendrix, S. E. Brenner, S. R. Holbrook // *Q. Rev. Biophys.* – 2005. – Vol. 38. – P. 221–243.

191. Heparan sulfate proteoglycans are required for cellular binding of the hepatitis E virus ORF2 capsid protein and for viral infection / M. Kalia, V. Chandra, S. A. Rahman [et al.] // *J. Virol*. – 2009. – Vol. 83 (24). – P. 12714–12724. – DOI: 10.1128/JVI.00717-09

192. Hepatotoxicity of Flos Farfarae and the contained alkaloid to mice / Y. Zhang, F. Huang, D. Wu [et al.] // *Lishizhen Med. Mater. Med. Res.* – 2008. – Vol. 19. – P. 1810–1811.

193. Heppell, B. Folding of the SAM aptamer is determined by the formation of a K-turn-dependent pseudoknot / B. Heppell, D. A. Lafontaine. // *Biochemistry.* – 2008. – Vol. 47. – P. 1490–1499.

194. Herbal does not mean innocuous: ten cases of severe hepatotoxicity associated with dietary supplements from Herbalife products / A. M. Schoepfer, A. Engel, K. Fattinger [et al.] // *J. Hepatol.* – 2007. – Vol. 47. – P. 521–526. – DOI: 10.1016/j.jhep.2007.06.014

195. High-affinity oligonucleotide ligands to human IgE inhibit binding to Fc epsilon receptor I / T. W. Wiegand, P. B. Williams, S. C. Dreskin [et al.] // *J. Immunol.* – 1996. – Vol. 157. – P. 221–230.

196. Hughes, D. Evolutionary trajectories to antibiotic resistance / D. Hughes, D. I. Andersson // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2017. – Vol. 71. – P. 579–596. – DOI: 10.1146/annurev-micro-090816-093813

197. Human laminin binding protein as a cell receptor for the tick-borne encephalitis virus / E. V. Protopopova, A. V. Sorokin, S. N. Konovalova [et al.] // *Zentralblatt für Bakteriologie.* – 1999. – Vol. 289 (5). – P. 632–638. – DOI: 10.1016/S0934-8840(99)80021-8

198. Identifying consensus patterns and secondary structure in SELEX sequence sets / J. P. Davis, N. Janji, B. E. Javornik [et al.] // *Methods in Enzymology.* – 1996. – Vol. 267. – P. 302–306.

199. Immature and mature dengue serotype 1 virus structures provide insight into the maturation process / V. A. Kostyuchenko, Q. Zhang, J. L. Tan [et al.] // *J. Virol.* – 2013. – Vol. 87 (13). – P. 7700–7707. – DOI: 10.1128/JVI.00197-13

200. Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission / M. Labuda, J. M. Austyn, E. Zuffova [et al.] // *Virology.* – 1996. – Vol. 219 (2). – P. 357–366.

201. Importance of transcription factors in the regulation of plant secondary metabolism and their relevance to the control of terpenoid accumulation / P. Broun, Y. Liu, E. Queen [et al.] // *Phytochem. Rev.* – 2006. – Vol. 5 (1). – P. 27–38.

202. *In vitro* assembly of nucleocapsid-like particles from purified recombinant capsid protein of dengue-2 virus / C. López, L. Gil, L. Lazo [et al.] // *Arch. Virol.* – 2009. – Vol. 154 (4). – P. 695–698. – DOI: 10.1007/s00705-009-0350-8

203. *In vitro* selection of DNA aptamers to anthrax spores with electrochemiluminescence detection / J. G. Bruno, J. L. Kiel // *Bioelectron.* – 1999. – Vol. 14. – P. 457–464.

204. *In vitro* selection of RNA-based irreversible inhibitors of human neutrophil elastase / D. Smith, G. P. Kirschenheuter, J. Charlton [et al.] // *Chem. Biol.* – 1995. – Vol. 2. – P. 741–750.

205. Induction of endoplasmic reticulum-derived replication-competent membrane structures by West Nile virus non-structural protein 4B / P. H. Kaufusi, J. F. Kelley, R. Yanagihara [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9 (1). – P. e84040. – DOI: 10.1371/journal.pone.0084040

206. Infectious cDNA clones of tick-borne encephalitis virus European subtype prototypic strain Neudorfl and high virulence strain Hypr / C. W. Mandl, M. Ecker, H. Holzmann [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 1997. – Vol. 78. – P. 1049–1057.

207. Inhibition of flaviviruses by targeting a conserved pocket on the viral envelope protein / M. de Wispelaere, W. Lian, S. Potisophon [et al.] // *Cell Chem. Biol.* – 2018. – Vol. 25 (8). – P. 1006–1016.e8. – DOI: 10.1016/j.chembiol.2018.05.011

208. Inhibition of HIV-1 replication by a tricyclic coumarin GUT-70 in acutely and chronically infected cells / E. Kudo, M. Taura, K. Matsuda [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2013. – P. 606–609.

209. Inhibition of receptor binding by high-affinity RNA ligands to vascular endothelial growth factor / D. Jellinek, L. S. Green, C. Bell [et al.] // *Biochemistry.* – 1994. – Vol. 33. – P. 10450–10456.

210. Inhibitory activity of *Scutellaria baicalensis* flavonoids against tick-borne encephalitis virus / G. N. Leonova, A. L. Shutikova, V. A. Lubova [et al.] // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2020. – Vol. 168 (5). – P. 665–668. – DOI: 10.1007/s10517-020-04776-y
211. Interaction of Glycine betaine and plant hormones: protection of the photosynthetic apparatus during abiotic stress / L. V. Kurepin, A. G. Ivanov, M. Zaman [et al.] // In: *Photosynthesis: Structures, mechanisms, and applications*; ed. by H. J. M. Hou, M. M. Najafpour, G. F. Moore, S. I. Allakhverdiev. – Springer International Publishing, Cham., 2017. – P. 185–202.
212. Isolation of capsid protein dimers from the tick-borne encephalitis flavivirus and in vitro assembly of capsid-like particles / S. Kiermayr, R. M. Kofler, C. W. Mandl [et al.] // *J. Virol.* – 2004. – Vol. 78 (15). – P. 8078–8084. – DOI: 10.1128/JVI.78.15.8078-8084.2004
213. Isolation of tick-borne encephalitis virus from *Ixodes ovatus* (Acari: Ixodidae) in Japan / T. Takeda, T. Ito, M. Chiba [et al.] // *J. Med. Entomol.* – 1998. – Vol. 35 (3). – P. 227–231. – DOI: 10.1093/jmedent/35.3.227
214. Isolation of virus-neutralizing RNAs from a large pool of random sequences / W. Pan, R. C. Craven, Q. Qiu [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – Vol. 92. – P. 11509–11513.
215. Isozyme-specific inhibition of protein kinase C by RNA aptamers / R. Conrad, L. M. Keranen, A. D. Ellington [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269. – P. 32051–32054.
216. Jain, R. K. The next frontier of molecular medicine: delivery of therapeutics / R. K. Jain // *Nat. Med.* – 1998. – Vol. 4. – P. 655–657.
217. James, W. Aptamers in the virologists' toolkit / W. James // *J. Gen. Virol.* – 2007. – Vol. 88. – P. 351–364.
218. Jayasena, S. D. Aptamers: An emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics / S. D. Jayasena // *Clinical Chemistry.* – 1999. – Vol. 45 (9). – P. 1628–1650.
219. Kaiser, R. Tick-borne encephalitis / R. Kaiser // *Infect. Dis. Clin. North Am.* – 2008. – Vol. 22. – P. 561–575. – DOI: 10.1016/j.idc.2008.03.013

220. Kapoor, R. Antiviral phytochemicals: an overview / R. Kapoor, B. Sharma, S. S. Kanwar // *Biochem. Physiol.* – 2017. – Vol. 6 (2). – P. 7.

221. Kiermayr, S. Impact of quaternary organization on the antigenic structure of the tick-borne encephalitis virus envelope glycoprotein E / S. Kiermayr, K. Stiasny, F. X. Heinz // *J. Virol.* – 2009. – Vol. 83 (17). – P. 8482. – DOI: 10.1128/JVI.00660-09

222. Komarova, N. Inside the black box: What makes SELEX better? / N. Komarova, A. Kuznetsov // *Molecules.* – 2019. – Vol. 24 (19). – P. 3598. – DOI: 10.3390/molecules24193598

223. Kovalev, S. Y. Reconsidering the classification of tick-borne encephalitis virus within the Siberian subtype gives new insights into its evolutionary history / S. Y. Kovalev, T. A. Mukhacheva // *Infect. Genet. Evol.* – 2017. – P. 159–165.

224. Kulbachinskiy, A. V. Methods for selection of aptamers to protein targets / A. V. Kulbachinskiy // *Biochemistry.* – 2007. – Vol. 72. – P. 1505–1518.

225. Kunze, U. The Austrian vaccination paradox: Tick-borne encephalitis vaccination versus influenza vaccination / U. Kunze, M. Kunze // *Cent. Eur. J. Public Health.* – 2015. – Vol. 23 (3). – P. 223–226. – DOI: 10.21101/cejph.a4169

226. Li, H. B. Separation methods used for *Scutellaria baicalensis* active components / H. B. Li, Y. Jiang, F. Chen // *J. Chromatogr. B.* – 2004. – Vol. 812. – P. 277–290.

227. Lindenbach, B. D. Molecular biology of flaviviruses / B. D. Lindenbach, C. M. Rice // *Adv. Virus Res.* – 2003. – Vol. 59. – P. 23–61. – DOI: 10.1016/s0065-3527(03)59002-9

228. Lindquist, L. Tick-borne encephalitis / L. Lindquist, O. Vapalahti // *Lancet.* – 2008. – Vol. 371 (9627). – P. 1861–1871. – DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60800-4

229. Lu, J. Determination of punicalagin isomers in pomegranate husk / J. Lu, K. Ding, Q. Yuan // *Chroma.* – 2008. – Vol. 68. – P. 303–306.

230. Luo, D. The flavivirus NS2B-NS3 protease-helicase as a target for antiviral drug development / D. Luo, S. G. Vasudevan, J. Lescar // *Antiviral Res.* – 2015. – Vol. 118. – P. 148–158. – DOI: 10.1016/j.antiviral.2015.03.014

231. Ma, Z. Q. Light intensity affects growth, photosynthetic capability, and total flavonoid accumulation of *Anoectochilus* plants / Z. Q. Ma, S. S. Zhang // *HortScience*. – 2010. – Vol. 45. – P. 863–867.

232. MALDI-TOF mass spectrometry in the investigation of large high-molecular biological compounds / L. V. Porubl'ova, A. V. Rebriev, T. Hromovyi [et al.] // *Ukr. Biokhim. Zh.* – 2009. – Vol. 81 (3). – P. 46–56.

233. Maldov, D. G. Tick-borne encephalitis virus interaction with the target cells / D. G. Maldov, G. G. Karganova, A. V. Timofeev. // *Arch. Virol.* – 1992. – Vol. 127 (1-4). – P. 321–325. – DOI: 10.1007/BF01309594

234. Mapping of functional elements in the stem-anchor region of tick-borne encephalitis virus envelope protein E / S. L. Allison, K. Stiasny, K. Stadler [et al.] // *J. Virol.* – 1999. – Vol. 73 (7). – P. 5605–5612. – DOI: 10.1128/JVI.73.7.5605-5612.1999

235. Matkowski, A. Plant in vitro culture for the production of antioxidants – A review / A. Matkowski // *Biotechnol. Adv.* – 2008. – Vol. 26. – P. 548–560. – DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.07.001

236. Maturation of flaviviruses starts from one or more icosahedrally independent nucleation centres / P. Plevka, A. J. Battisti, J. Junjhon [et al.] // *EMBO Rep.* – 2011. – Vol. 12 (6). – P. 602–606. – DOI: 10.1038/embor.2011.75

237. McCauley, T. G. Aptamer-based biosensor arrays for detection and quantification of biological macromolecules / T. G. McCauley, N. Hamaguchi, M. Stanton // *Anal. Biochem.* – 2003. – Vol. 319. – P. 244–250.

238. McDaniel, B. A. A tertiary structural element in S box leader RNAs is required for S-adenosylmethionine directed transcription termination / B. A. McDaniel, F. J. Grundy, T. M. Henkin // *Mol. Microbiol.* – 2005. – Vol. 57. – P. 1008–1021.

239. McMinn, P. C. The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flaviviruses / P. C. McMinn // *J. Gen. Virol.* – 1997. – Vol. 78 (11). – P. 2711–2722. – DOI: 10.1099/0022-1317-78-11-2711

240. Mechanism of anti-rotavirus synergistic activity by epigallocatechin gallate and a proanthocyanidin-containing nutraceutical / S. M. Lipson, G. Karalis, L. Karthikeyan [et al.] // Food Environ. Virol. – 2017. – Vol. 9 (4). – P. 434–443.

241. Medicinal plants: Influence of environmental factors on the content of secondary metabolites / C. V. Borges, I. O. Minatel, H. A. Gomez-Gomez [et al.] // Medicinal Plants and Environmental Challenges. – 2017. – P. 259–277.

242. Milne, A. The ecology of the sheep tick, *Ixodes ricinus* L. Host relationships of the tick. Part 2. Observation on hill and moorland grazings in northern England / A. Milne // Parasitology. – 1949. – Vol. 39. – P. 173–197.

243. *Moringa oleifera* Lam and derived phytochemicals as promising antiviral agents: A review / D. Biswas, S. Nandy, A. Mukherjee [et al.] // S. Afr. J. Bot. – 2019. – Vol. 129. – P. 272–282. – DOI: 10.1016/j.sajb.2019.07.049

244. Murray Valley encephalitis virus envelope protein antigenic variants with altered haemagglutination properties and reduced neuroinvasiveness in mice / P. C. McMinn, E. Lee, S. Hartley [et al.] // Virology. – 1995. – Vol. 211. – P. 10–20.

245. National Toxicology Program. NTP toxicology and carcinogenesis studies of Ginkgo biloba extract (CASNo.90045-35-6) in F344/N rats and B6C3F1 mice (Feed Studies) / National Toxicology Program // Natl. Toxicol. Prog. Tech. Rep. Ser. – 2012. – Vol. 578. – P. 1–224.

246. Natural tick-borne encephalitis infection among wild small mammals in the southeastern part of western Siberia / V. N. Bakhvalova, A. K. Dobrotvorsky, V. V. Panov [et al.] // Vector Borne Zoonotic Dis. Russia. – 2006. – Vol. 6. – P. 32–41.

247. Nephropathy associated with use of a Chinese herbal product containing aristolochic acid / W. Chau, R. Ross, J. Y. Li [et al.] // Med. J. Aust. – 2011. – Vol. 194. – P. 367–368.

248. Neurotoxicity following chronic intravenous use of “Russian cocktail” / F. Varlibas, I. Delipoyraz, G. Yuksel [et al.] // Clin. Toxicol. – 2009. – Vol. 47. – P. 157–160. – DOI: 10.1080/15563650802010388

249. New tools in nucleoside toolbox of tick-borne encephalitis virus reproduction inhibitors / A. A. Orlov, M. S. Drenichev, V. E. Oslovsky [et al.]

- // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2017. – Vol. 27 (5). – P. 1267–1273. – DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.01.040
250. Niazian, M. Application of genetics and biotechnology for improving medicinal plants / M. Niazian // *Planta.* – 2019. – Vol. 249. – P. 953–973. – DOI: 10.1007/s00425-019-03099-1
251. Nimjee, S. M. Aptamers: An emerging class of therapeutics / S. M. Nimjee, C. P. Rusconi, B. A. Sullenger // *Annual Reviews of Medicine.* – 2005. – Vol. 56. – P. 555–583.
252. N-linked glycan in tick-borne encephalitis virus envelope protein affects viral secretion in mammalian cells, but not in tick cells / K. Yoshii, N. Yanagihara, M. Ishizuka [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 2013. – Vol. 94 (10). – P. 2249–2258. – DOI: 10.1099/vir.0.055269-0
253. Non-viraemic transmission of tick-borne encephalitis virus: a mechanism for arbovirus survival in nature / M. Labuda, P. Nuttall, O. Kozuch [et al.] // *Experientia.* – 1993. – Vol. 49. – P. 802–805.
254. Novel applications of mass spectrometry-based metabolomics in herbal medicines and its active ingredients: current evidence / X. J. Wang, J. L. Ren, A. H. Zhang [et al.] // *Mass Spectrom. Rev.* – 2019. – Vol. 38 (4-5). – P. 380–402. – DOI: 10.1002/mas.21589
255. Novel approach to activity evaluation for release-active forms of anti-interferon-gamma antibodies based on enzyme-linked immunoassay // *PLoS One.* – 2018. – Vol. 13 (5). – DOI: 10.1371/journal.pone.0197086
256. Nowak, T. Analysis of disulphides present in the membrane proteins of West Nile flavivirus / T. Nowak, G. Wengler // *Virology.* – 1987. – Vol. 156. – P. 127–137.
257. NS4A regulates the ATPase activity of the NS3 helicase: a novel cofactor role of the non-structural protein NS4A from West Nile virus / S. A. Shiryaev, A. V. Chernov, A. E. Aleshin [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 2009. – Vol. 90 (9). – P. 2081–2085. – DOI: 10.1099/vir.0.012864-0

258. Nucleic acid aptamers in cancer medicine / L. Cerchia, J. Hamm, D. Libri [et al.] // *FEBS Lett.* – 2002. – Vol. 528. – P. 12–16.

259. Nucleoside analogs as a rich source of antiviral agents active against arthropod-borne flaviviruses / L. Eyer, R. Nencka, E. de Clercq [et al.] // *Antivir. Chem. Chemother.* – 2018. – Jan-Dec. – 2040206618761299. – DOI: 10.1177/2040206618761299

260. Nucleoside inhibitors of tick-borne encephalitis virus / L. Eyer, J. J. Valdés, V. A. Gil [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2015. – Vol. 59 (9). – P. 5483–5493. – DOI: 10.1128/AAC.00807-15

261. Offerdahl, D. K. Stability of a tick-borne flavivirus in milk / D. K. Offerdahl, N. G. Clancy, M. E. Bloom // *Front Bioeng. Biotechnol.* – 2016. – Vol. 4. – P. 40.

262. Osborne, S. E. Aptamers as therapeutic and diagnostic reagents: problems and prospects / S. E. Osborne, I. Matsumura, A. D. Ellington // *Current Opinion in Chemical Biology.* – 1997. – Vol. 1. – P. 5–9.

263. Outbreak of alimentary tick borne encephalitis in Podlaskie voivodeship, Poland / M. E. Krol, B. Borawski, A. Nowicka-Cieluszecka [et al.] // *Problems of Infection.* – 2019. – Vol. 73 (2). – P. 239–248. – DOI: 10.32394/pe.73.01

264. P63-2804: Chemoprophylaxis of tick-borne encephalitis in children / N. V. Skripchenko, G. P. Ivanova, M. V. Ivanova [et al.] // *Eur. J. Paediatr. Neurol.* – 2015. – Vol. 19, Suppl. 1. – P. S111–S112. – DOI: 10.1016/S1090-3798(15)30376-7

265. Pal, S. K. Herbal medicine: current status and the future / S. K. Pal, Y. Shukla // *Asian Pac. J. Cancer Prev.* – 2003. – Vol. 4 (4). – P. 281–288.

266. Pavlova, N. Riboswitch distribution, structure, and function in bacteria / N. Pavlova, D. Kaloudas, R. Penchovsky // *Gene.* – 2019. – Vol. 708. – P. 38–48. – DOI: 10.1016/j.gene.2019.05.036

267. Pen'evskaia, N. A. Efficiency of use of immunoglobulin preparations for the postexposure prevention of tick-borne encephalitis in Russia (a review of semi-centennial experience) / N. A. Pen'evskaia, N. V. Rudakov // *Med. Parazitol. (Mosk).* – 2010. – Vol. 1. – P. 53–59.

268. Penievsckaya, N. A. Etiotropic preparations for post-exposure tick-borne encephalitis prevention: Perspective development and problems of epidemiological effectiveness evaluation / N. A. Penievsckaya // *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika*. – 2010. – Vol. 1. – P. 39–45.
269. Perret, G. Aptamer affinity ligands in protein chromatography / G. Perret, E. Boschetti // *Biochimie*. – 2018. – Vol. 145. – P. 98–112. – DOI: 10.1016/j.biochi.2017.10.008
270. Perret, G. Aptamer-based affinity chromatography for protein extraction and purification/ G. Perret, E. Boschetti // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* – 2020. – Vol. 174. – P. 93–139. – DOI: 10.1007/10_2019_106
271. Pestourie, C. Aptamers against extracellular targets for in vivo applications / C. Pestourie, B. Tavitian, F. Duconge // *Biochimie*. – 2005. – Vol. 87. – P. 921–930.
272. Pfeffer, M. Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration / M. Pfeffer, G. Dobler // *Parasit. Vectors*. – 2010. – Vol. 3 (1). – P. 35. – DOI: 10.1186/1756-3305-3-35
273. Pharmacokinetics and biodistribution of novel aptamer compositions / J. M. Healy, S. D. Lewis, M. Kurz [et al.] // *Pharm. Res.* – 2004. – Vol. 21. – P. 2234–2246.
274. Phillipotts, R. J. Antibody-dependent enhancement of tick-borne encephalitis virus infectivity / R. J. Phillipotts, J. R. Stephenson, J. S. Porterfield // *J. Gen. Virol.* – 1985. – Vol. 66 (8). – P. 1831–1837. – DOI: 10.1099/0022-1317-66-8-1831
275. Photoaptamer arrays applied to multiplexed proteomic analysis / C. Bock, M. Coleman, B. Collins [et al.] // *Proteomics*. – 2004. – Vol. 4. – P. 609–618.
276. Physical and biological properties of dengue-2 virus and associated antigens / T. J. Smith, W. E. Brandt, J. L. Swanson [et al.] // *J. Virol.* – 1970. – Vol. 5 (4). – P. 524–532. – DOI: 10.1128/JVI.5.4.524-532.1970
277. Phytochemicals as antibiotic alternatives to promote growth and enhance host health / H. Lillehoj, Y. Liu, S. Calsamiglia [et al.] // *Vet. Res.* – 2018. – Vol. 49 (1). – P. 76.

278. Pierson, T. C. Molecular mechanisms of antibody-mediated neutralisation of flavivirus infection / T. C. Pierson, M. S. Diamond // *Expert Rev. Mol. Med.* – 2008. – Vol. 10. – P. e12.

279. Plants as potential sources for drug development against Alzheimer's disease / K. Dastmalchi, H. D. Dorman, H. Vuorela [et al.] // *Int. J. Biomed. Pharm. Sci.* – 2007. – Vol. 1 (2). – P. 83–104.

280. Pletnev, A. G. Nucleotide sequence of the genome and complete amino acid sequence of the polyprotein of tick-borne encephalitis virus / A. G. Pletnev, V. F. Yamshchikov, V. M. Blinov // *Virology.* – 1990. – Vol. 174 (1). – P. 250–263. – DOI: 10.1016/0042-6822(90)90073-z

281. Pogodina, V. V. Resistance of tick-borne encephalitis virus to gastric juice / V. V. Pogodina // *Vopr Virusol.* – 1958. – Vol. 3. – P. 271–275.

282. Polyak, S. J. Identification of hepatoprotective flavonolignans from silymarin / S. J. Polyak, C. Morishima, V. Lohmann // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2010. – P. 5995–5999.

283. Porter, R. S. A review of the antiviral properties of black elder (*Sambucus nigra* L.) / R. S. Porter, R. F. Bode // *Products Phytother Res.* – 2017. – Vol. 31 (4). – P. 533–554. – DOI: 10.1002/ptr.5782

284. Post-SELEX combinatorial optimization of aptamers / B. E. Eaton, L. Gold, B. J. Hicke [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* – 1997. – Vol. 5. – P. 1087–1096.

285. Potential genotoxicity of traditional Chinese medicinal plants and phytochemicals: an overview / J. Zhou, M. Ouedraogo, F. Qu [et al.] // *Phytother. Res.* – 2013. – Vol. 27 (12). – P. 1745–1755. – DOI: 10.1002/ptr.4942

286. Potential significance of transovarial transmission in the circulation of tick-borne encephalitis virus / V. Danielova, J. Holubova, M. Pejcoch [et al.] // *Folia Parasitol (Praha).* – 2002. – Vol. 49. – P. 323–325.

287. Pouvreau, B. From plant metabolic engineering to plant synthetic biology: The evolution of the design/build/test/learn cycle / B. Pouvreau, T. Vanhercke, S. Singh // *Plant Sci.* – 2018. – Vol. 273. – P. 3–12. – DOI: 10.1016/j.plantsci.2018.03.035

288. Proske, D. Aptamers – basic research, drug development, and clinical Application / D. Proske, M. Blank, R. Buhmann // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2005. – Vol. 69. – P. 367–374.

289. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin / K. Stadler, S. L. Allison, J. Schalich [et al.] // *J. Virol.* – 1997. – Vol. 71 (11). – P. 8475–8481. – DOI: 10.1128/JVI.71.11.8475-8481.1997

290. Pulkkinen, L. I. A. Tick-borne encephalitis virus: A structural view / L. I. A. Pulkkinen, S. J. Butcher, M. Anastasina // *Viruses.* – 2018. – Vol. 10 (7). – P. 350. – DOI: 10.3390/v10070350

291. Rai, A. Integrated omics analysis of specialized metabolism in medicinal plants / A. Rai, K. Saito, M. Yamazaki // *Plant J.* – 2017. – Vol. 90 (4). – P. 764–787. – DOI: 10.1111/tpj.13485

292. Randal, J. Hepatitis C vaccine hampered by viral complexity, many technical restraints / J. Randal // *Journal of the National Cancer Institute.* – 1999. – Vol. 91 (11) – P. 906–908. – DOI: 10.1093/jnci/91.11.906

293. Randolph, S. Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission / S. Randolph, L. Gern, P. Nuttall // *Parasitol. Today* – 1996. – Vol. 12 (12). – P. 472–479. – DOI: 10.1016/S0169-4758(96)10072-7

294. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs / J. L. Vanherweghem, C. Tielemans, D. Abramowicz [et al.] // *Lancet.* – 1993. – Vol. 341. – P. 387–391. – DOI: 10.1016/0140-6736(93)92984-2

295. Rastogi, M. Flavivirus NS1: A multifaceted enigmatic viral protein / M. Rastogi, N. Sharma, S. K. Singh // *Virology J.* – 2016. – Vol. 13. – P. 131. – DOI: 10.1186/s12985-016-0590-7

296. Recent advances in fluorescent nucleic acid probes for living cell studies / K. Wang, J. Huang, X. Yang [et al.] // *Analyst.* – 2013. – Vol. 138. – P. 62–71.

297. Recent advances in SELEX technology and aptamer applications in biomedicine / Z. Zhuo, Y. Yu, M. Wang [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – Vol. 18 (10). – P. 2142.

298. Recent advances in traditional plant drugs and orchids / J. M. Kong, N. K. Goh, L. S. Chia [et al.] // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2003. – Vol. 24 (1). – P. 7–21.
299. Reed, C. J. Drug metabolism in the nasal cavity: relevance to toxicology / C. J. Reed // *Drug Metab. Rev.* – 1993. – Vol. 25. – P. 173–205. – DOI: 10.3109/03602539308993975
300. Reed, L. J. A simple method of estimating fifty per cent endpoints / L. J. Reed, H. Muench // *American Journal of Epidemiology.* – 1938. – Vol. 27 (3). – P. 493–497.
301. Reid, C. R. The nucleolar helicase DDX56 redistributes to West Nile virus assembly sites / C. R. Reid, T. C. Hobman // *Virology.* – 2017. – Vol. 500. – P. 169–177. – DOI: 10.1016/j.virol.2016.10.025
302. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse / P. T. Jones, P. H. Dear, J. Foote [et al.] // *Nature.* – 1986. – Vol. 321 (6069) – P. 522–525. – DOI: 10.1038/321522a0
303. Respiratory tract lesions in non-inhalation studies / D. M. Sells, A. E. Brix, A. Nyska [et al.] // *Toxicol. Pathol.* – 2007. – Vol. 35. – P. 170–177. – DOI: 10.1080/01926230601059969
304. Ribavirin-induced anemia: mechanisms, risk factors and related targets for future research / S. Russmann, I. Grattagliano, P. Portincasa [et al.] // *Curr. Med. Chem.* – 2006. – Vol. 13 (27). – P. 3351–3357. – DOI: 10.2174/092986706778773059
305. Rigid amphipathic nucleosides suppress reproduction of the tick-borne encephalitis virus / A. A. Orlov, A. A. Chistov, L. I. Kozlovskaya [et al.] // *Medchemcomm.* – 2016. – Vol. 7 (3). – P. 495–499. – DOI: 10.1039/c5md00538h
306. Robert, A. M. Drug discovery / A. M. Robert, B. E. Shohreh // *Humana Press.* – 1990. – P. 143–154.
307. Roberts, J. E. Tyler's herbs of choice. The therapeutic use of phytomedicinals / J. E. Roberts, V. E. Tyler. – New York : The Haworth Press, 1997.
308. Rohini, M. V. Preliminary phytochemical screening of selected medicinal plants of polyherbal formulation / M. V. Rohini, E. Padmini // *J. Pharmacogn. Phytochem.* – 2016. – Vol. 5 (5). – P. 277.

309. Role of heparan sulfate for attachment and entry of tick-borne encephalitis virus / H. Kroschewski, S. L. Allison, F. X. Heinz [et al.] // *Virology*. – 2003. – Vol. 308 (1). – P. 92–100. – DOI: 10.1016/s0042-6822(02)00097-1
310. Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly / J. Y. Leung, G. P. Pijlman, N. Kondratieva [et al.] // *J. Virol.* – 2008. – Vol. 82 (10). – P. 4731–4741. – DOI: 10.1128/JVI.00002-08
311. Role of secondary metabolites and brassinosteroids in plant defense against environmental stresses / A. Bartwal, R. Mall, P. Lohani [et al.] // *J. Plant Growth Regul.* – 2013. – Vol. 32 (1). – P. 216–232
312. Role of the N-linked glycans of the prM and E envelope proteins in tick-borne encephalitis virus particle secretion / A. Goto, K. Yoshii, M. Obara [et al.] // *Vaccine*. – 2005. – Vol. 23 (23). – P. 3043–3052. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2004.11.068
313. Ruzek, D. Tick-borne encephalitis: pathogenesis and clinical implications / D. Ruzek, G. Dobler, O. D. Mantke // *Travel Med. Infect. Dis.* – 2010. – Vol. 8. – P. 223–232.
314. Saikosaponin b2 is a naturally occurring terpenoid that efficiently inhibits hepatitis C virus entry / L. T. Lin, C. Y. Chung, W. C. Hsu [et al.] // *J. Hepatol.* – 2015. – Vol. 62 (3). – P. 541–548.
315. Sanchita, A. Gene expression analysis in medicinal plants under abiotic stress conditions / A. Sanchita // *Plant Metabolites and Regulation under Environmental Stress*. – 2018. – P. 407–414.
316. Selection strategy to generate aptamer pairs that bind to distinct sites on protein targets / Q. Gong, J. Wang, K. M. Ahmad [et al.] // *Anal. Chem.* – 2012. – Vol. 84 (12). – P. 5365–5371.
317. Selective targeting and inhibition of yeast RNA polymerase II by RNA aptamers / M. Thomas, S. Chedin, C. Carles [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272. – P. 27980–27986.

318. Selikoff, I. J. Tuberculosis chemotherapy with hydrazine derivatives of isonicotinic acid / I. J. Selikoff, E. H. Robitzek // American College of Chest Physicians CHEST. – 1952. – Vol. 21 (4). – P. 385–438.

319. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia / M. Ecker, S. L. Allison, T. Meixner, F. X. Heinz // J. Gen. Virol. – 1999. – Vol. 80 (Pt 1). – P. 179–185. – DOI: 10.1099/0022-1317-80-1-179

320. Sequential conformational rearrangements in flavivirus membrane fusion / L. H. Chao, D. E. Klein, A. G. Schmidt [et al.] // Elife. – 2015. – Vol. 4. – P. e08656. – DOI: 10.7554/eLife.08656

321. Serganov, A. Structural insights into amino acid binding and gene control by a lysine riboswitch / A. Serganov, L. Huang, D. J. Patel // Nature. – 2008. – Vol. 455. – P. 1263–1267.

322. Single amino acid codon changes detected in louping ill virus antibody-resistant mutants with reduced neurovirulence / W. R. Jiang, A. Lowe, S. Higgs [et al.] // J. Gen. Virol. – 1993. – Vol. 74 (5). – P. 931–935. – DOI: 10.1099/0022-1317-74-5-931

323. Single nucleotide polymorphism in the promoter region of the CD209 gene is associated with human predisposition to severe forms of tick-borne encephalitis / A. V. Barkhash, A. A. Perelygin, V. N. Babenko [et al.] // Antiviral Res. – 2012. – Vol. 93 (1). – P. 64–8. – DOI: 10.1016/j.antiviral.2011.10.017

324. Skoulidis, F. Ma Huang associated acute liver failure requiring liver transplantation / F. Skoulidis, G. J. Alexander, S. E. Davies // Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. – 2005. – Vol. 17. – P. 581–584. – DOI: 10.1097/00042737-200505000-00017

325. Spectrum of antiviral activity of 4-aminopyrimidine N-oxides against a broad panel of tick-borne encephalitis virus strains / E. V. Dueva, K. K. Tuchynskaya, L. I. Kozlovskaya [et al.] // Antiviral Chemistry and Chemotherapy. – 2020. – Vol. 28. – P. 1–10. – DOI: 10.1177/2040206620943462

326. Stephenson, J. R. The synthesis of immunogenic polypeptides encoded by tick-borne encephalitis virus / J. R. Stephenson, A. J. Crooks, J. M. Lee // *J. Gen. Virol.* – 1987. – Vol. 68 (5). – P. 1307–1316. – DOI: 10.1099/0022-1317-68-5-1307
327. Stiasny, K. Characteristics of antibody responses in tick-borne encephalitis vaccination breakthroughs / K. Stiasny, H. Holzmann, F. X. Heinz // *Vaccine.* – 2009. – Vol. 27 (50). – P. 7021–7026. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.09.069
328. Structural changes and functional control of the tick-borne encephalitis virus glycoprotein E by the heterodimeric association with protein prM / F. X. Heinz, K. Stiasny, G. Püschner-Auer G [et al.] // *Virology.* – 1994. – Vol. 198 (1). – P. 109–117. – DOI: 10.1006/viro.1994.1013
329. Structure of acidic pH dengue virus showing the fusogenic glycoprotein trimers / X. Zhang, J. Sheng, S. K. Austin [et al.] // *J. Virol.* – 2015. – Vol. 89 (1). – P. 743–750. – DOI: 10.1128/JVI.02411-14
330. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion / R. J. Kuhn, W. Zhang, M. G. Rossmann [et al.] // *Cell.* – 2002. – Vol. 108. – P. 717–725.
331. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation / I. M. Yu, W. Zhang, H. A. Holdaway [et al.] // *Science.* – 2008. – Vol. 319 (5871) – P. 1834–1837. – DOI: 10.1126/science.1153264
332. Structure of the immature Zika virus at 9 Å resolution / V. M. Prasad, A. S. Miller, T. Klose [et al.] // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2017. – Vol. 24 (2). – P. 184–186. – DOI: 10.1038/nsmb.3352
333. Structure of tick-borne encephalitis virus and its neutralization by a monoclonal antibody / T. Füzik, P. Formanová, D. Růžek [et al.] // *Nat. Commun.* – 2018. – Vol. 9 (1). – P. 436. – DOI: 10.1038/s41467-018-02882-0
334. Structure-activity relationships of nucleoside analogues for inhibition of tickborne encephalitis virus / L. Eyer, M. Šmídková, R. Nencka [et al.] // *Antivir. Res.* – 2016. – Vol. 133. – P. 119–129. – DOI: 10.1016/j.antiviral.2016.07.018

335. Structures of immature flavivirus particles / Y. Zhang, J. Corver, P. R. Chipman [et al.] // *EMBO J.* – 2003. – Vol. 22 (11). – P. 2604–2613. – DOI: 10.1093/emboj/cdg270

336. Superti, F. New advances in anti-HSV chemotherapy / F. Superti, M. G. Ammendolia, M. Marchetti // *Curr. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 15 (9). – P. 900–911.

337. Survival dynamics of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks / M. Slovák, M. Kazimírová, M. Siebenstichová // *Ticks Tick Borne Dis.* – 2014. – Vol. 5(6). – P. 962–969.

338. Süß, J. Tick-borne encephalitis 2010: Epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia-an overview / J. Süß // *Ticks Tick Borne Dis.* – 2011. – Vol. 2. – P. 2–15. – DOI: 10.1016/j.ttbdis.2010.10.007

339. Süß, J. Tick-borne encephalitis in Europe and beyond – The epidemiological situation as of 2007 / J. Süß // *Euro Surveill.* – 2008. – Vol. 13. – P. 18916.

340. Synthetic biosystems for the production of high-value plant metabolites / P. J. Facchini, J. Bohlmann, P. S. Covello [et al.] // *Trends Biotechnol.* – 2012. – Vol. 30 (3). – P. 127–31. – DOI: 10.1016/j.tibtech.2011.10.001

341. Synthetic fusion peptides of tick-borne encephalitis virus as models for membrane fusion / J. Pan, C. B. Lai, W. R. Scott [et al.] // *Biochemistry.* – 2010. – Vol. 49 (2). – P. 287–296. – DOI: 10.1021/bi9017895

342. Systematic evolution of a DNA aptamer binding to rat brain tumor microvessels. selective targeting of endothelial regulatory protein pigpen / M. Blank, T. Weinschenk, M. Priemer [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 16464–16468.

343. Tasset, D. M. Oligonucleotide inhibitors of human thrombin that bind distinct epitopes / D. M. Tasset, M. F. Kubik, W. Steiner // *J. Mol. Biol.* – 1997. – Vol. 272. – P. 688–698.

344. The antiviral compound ribavirin modulates the T helper (Th)1/Th2 subset balance in hepatitis B and C virus-specific immune responses / C. Hultgren, D. R. Milich, O. Weiland [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 1998. – Vol. 79. – P. 2381–2391.

345. The building blocks and motifs of RNA architecture / N. B. Leontis, A. Lescoute, E. Westhof [et al.] // *Current Opinion in Structural Biology.* – 2006. – Vol. 16. – P. 279–287.

346. The effect of Sambucol, a black elderberry-based, natural product, on the production of human cytokines: I. Inflammatory cytokines / V. Barak, T. Halperin, I. Kalickman // *Eur. Cytokine Netw.* – 2001. – Vol. 12. – P. 290–296.

347. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation / L. Li, S. M. Lok, I. M. Yu [et al.] // *Science.* – 2008. – Vol. 319 (5871). – P. 1830–1834. – DOI: 10.1126/science.1153263

348. The membrane-proximal “stem” region increases the stability of the flavivirus E protein postfusion trimer and modulates its structure / K. Stiasny, S. Kiermayr, A. Bernhart [et al.] // *J. Virol.* – 2013. – Vol. 87 (17). – P. 9933–9938. – DOI: 10.1128/JVI.01283-13

349. The potential of aptamers as anticoagulants / S. M. Nimjee, C. P. Rusconi, R. A. Harrington [et al.] // *Trends Cardiovasc. Med.* – 2005. – Vol. 15 (1). – P. 41–45.

350. The role of natural products in drug discovery and development against neglected tropical diseases / P. M. Cheuka, G. Mayoka, P. Mutai [et al.] // *Molecules.* – 2016. – Vol. 22 (1). – P. 58. – DOI: 10.3390/molecules22010058

351. Therapeutic guide to herbal medicines / M. Blumenthal, W. R. Brusse, A. Goldberg [et al.]. – Austin : The American Botanical Council, 1998.

352. Therapeutic potential of flavonoids and their mechanism of action against microbial and viral infections – A review / A. Ahmad, M. Kaleem, Z. Ahmed [et al.] // *Food Res Int.* – 2015. – Vol. 77. – P. 221–235.

353. Tick-borne encephalitis associated with consumption of raw goat milk, Slovenia, 2012 / N. Hudopisk, M. Korva, E. Janet [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* – 2013. – Vol. 19 (5). – P. 806–808.

354. Tick-borne encephalitis from eating goat cheese in a mountain region of Austria / H. Holzmann, S. W. Aberle, K. Stiasny [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 15 (10). – P. 1671–1673.

355. Tick-borne encephalitis in an area of high endemicity in Lithuania: Disease severity and long-term prognosis / A. Mickiene, A. Laiskonis, G. Gunther [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* – 2002. – Vol. 35. – P. 650–658.

356. Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: Review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines / D. Ruzek, T. A. Županc, J. Borde [et al.] // *Antiviral Res.* – 2019. – Vol. 164. – P. 23–51. – DOI: 10.1016/j.antiviral.2019.01.014

357. Tick-borne encephalitis outbreak in Hungary due to consumption of raw goat milk / Z. Balogh, E. Ferenczi, K. Szeles [et al.] // *J. Virol Methods.* – 2010. – Vol. 163 (2). – P. 481–485.

358. Tick-borne encephalitis virus – A review of an emerging zoonosis / K. L. Mansfield, N. Johnson, L. P. Phipps [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 2009. – Vol. 90. – P. 1781–1794. – DOI: 10.1099/vir.0.011437-0

359. Tick-borne encephalitis virus and the immune response of the mammalian host / B. Dorrbecker, G. Dobler, M. Spiegel [et al.] // *Travel Med. Infect. Dis.* – 2010. – Vol. 8. – P. 213–222.

360. Tick-borne encephalitis virus in cows and unpasteurized cow milk from Norway / D. Gurung, A. Soleng, K. Stiasny [et al.] // *Zoonoses Public Health.* – 2019. – Vol. 66 (2). – P. 216–222. – DOI: 10.1111/zph.12554

361. Tick-borne encephalitis virus replication, intracellular trafficking, and pathogenicity in human intestinal Caco-2 cell monolayers / C. Yu, K. Achazi, L. Möller [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9 (5). – P. e96957. – DOI: 10.1371/journal.pone.0096957

362. Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks cofeeding on specific immune natural rodent hosts / M. Labuda, O. Kozuch, E. Zuffova [et al.] // *Virology.* – 1997. – Vol. 235. – P. 138–143.

363. Tick-borne encephalitis virus vaccines / P. N. Barrett, D. Porthsmouth, H. J. Ehrlich // In : Vaccines ; ed. by S. A. Plotkin, W. Orenstein, P. A. Offit. – PA, USA : Elsevier, 2013. – P. 773–788.

364. Tick-borne flavivirus reproduction inhibitors based on isoxazole core linked with adamantane / D. A. Vasilenko, E. V. Dueva, L. I. Kozlovskaya [et al.] // Bioorganic Chemistry. – 2019. – Vol. 87. – P. 629–637. – DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.03.028

365. Tick-borne flaviviruses alter membrane structure and replicate in dendrites of primary mouse neuronal cultures / M. Hirano, K. Yoshii, M. Sakai [et al.] // J. Gen. Virol. – 2014. – Vol. 95 (4). – P. 849–861. – DOI: 10.1099/vir.0.061432-0

366. Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants / B. Patra, C. Schluttenhofer, Y. M. Wu [et al.] // BBA Gene Regul. Mech. – 2013. – Vol. 1829 (11). – P. 1236–1247.

367. Transient blindness due to posterior reversible encephalopathy syndrome following Ephedra overdose / F. J. Moawad, J. D. Hartzell, T. J. Biega [et al.] // South Med. J. – 2006. – Vol. 99. – P. 511–514. – DOI: 10.1097/01.smj.0000215739.90211.3b

368. Transmembrane domains of NS2B contribute to both viral RNA replication and particle formation in Japanese encephalitis virus / X. D. Li, C. L. Deng, H. Q. Ye [et al.] // J. Virol. – 2016. – Vol. 90 (12). – P. 5735–5749. – DOI: 10.1128/JVI.00340-16

369. Tsao, R. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals / R. Tsao, Z. Deng // J. Chromatogr. B. – 2004. – Vol. 812. – P. 85–99.

370. Tuerk, C. RNA pseudoknots that inhibit human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase / C. Tuerk, S. MacDougal, L. Gold // Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 1992. – Vol. 89. – P. 6988–6992.

371. Tuerk, C. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA-polymerase / C. Tuerk, L. Gold // Science. – 1990. – Vol. 249. – P. 505–510.

372. Two distinct sets of NS2A molecules are responsible for dengue virus RNA synthesis and virion assembly / X. Xie, J. Zou, C. Puttikhunt [et al.] // *J. Virol.* – 2015. – Vol. 89 (2). – P. 1298–1313. – DOI: 10.1128/JVI.02882-14

373. Tzima, K. Evaluation of the impact of chlorophyll removal techniques on polyphenols in rosemary and thyme by-products / K. Tzima, N. P. Brunton, D. K. Rai // *J. Food Biochem.* – 2020. – Vol. 44 (3). – P. e13148. – DOI: 10.1111/jfbc.13148

374. U. S. Food and Drug Administration. Kava-containing dietary supplements may be associated with severe liver injury [Электронный ресурс] / U. S. Food and Drug Administration. – 2002. – Режим доступа: <http://www.fda.gov/Food/ResourcesForYou/Consumers/ucm085482.htm> (дата обращения: 9.06.2020).

375. Uphoff, K. W. *In vitro* selection of aptamers: the dearth of pure reason / K. W. Uphoff, S. D. Bell, A. D. Ellington // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 1996. – Vol. 6. – P. 281–288.

376. Urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (*Aristolochia fangchi*) / J. L. Nortier, M. C. Martinez, H. H. Schmeiser [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2000. – Vol. 342. – P. 1686–1692. – DOI: 10.1056/NEJM200006083422301

377. Use of Anaferon for treatment and prophylaxis of tick-borne encephalitis / A. Y. Pavlova, M. V. Kachanova, M. S. Zak [et al.] // *Poliklinika.* – 2009. – Vol. 3. – P. 92–93.

378. Vaisviliene, D. TBE in Lithuania / D. Vaisviliene // In : *Proceedings of the Fourth International Potsdam Symposium on Tick-Borne Diseases*; ed. by J. Süß, O. Kahl. – Lengerich : Pabst Science Publishers, 1997. – P. 100–113.

379. Verhoeyen, M. Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity / M. Verhoeyen, C. Milstein, G. Winter // *Science.* – 1988. – Vol. 239 (4847). – P. 1534–1536. – DOI: 10.1126/science.2451287

380. Viperin targets flavivirus virulence by inducing assembly of noninfectious capsid particles / K. Vonderstein, E. Nilsson, P. Hubel [et al.] // *J. Virol.* – 2017. – Vol. 92 (1). – P. e01751–17. – DOI: 10.1128/JVI.01751-17

381. Vorndam, V. Molecular and biological characterization of a non-glycosylated isolate of Saint Louis encephalitis virus / V. Vorndam, J. H. Mathews, A. D. T. Barrett // *J. Gen. Virol.* – 1993. – Vol. 74. – P. 2653–2660. – DOI: 10.1016/0042–6822(89)900044-5

382. Wahlberg, P. Tick-borne viral encephalitis in Finland: the clinical features of Kumlinge disease during 1959–1987 / P. Wahlberg, P. Saikku, M. Brummer-Korvenkontio // *J. Intern. Med.* – 1989. – Vol. 225. – P. 173–177.

383. Waites, G. Gossypol: reasons for its failure to be accepted as a safe, reversible male antifertility drug / G. Waites, C. Wang, P. Griffin // *Int. J. Androl.* – 1998. – Vol. 21. – P. 8–12.

384. Wang, J. *In vitro* selection of novel RNA ligands that bind human cytomegalovirus and block viral infection / J. Wang, H. Jiang, F. Liu // *RNA.* – 2000. – Vol. 6. – P. 571–583.

385. Wang, Y. Aptamer-based western blot for selective protein recognition / Y. Wang, Z. Li, H. Yu // *Front Chem.* – 2020. – Vol. 8. – P. 570528. – DOI: 10.3389/fchem.2020.570528

386. Warowicka, A. Antiviral activity of berberine / A. Warowicka, R. Nawrot, A. Goździcka-Józefiak // *Arch. Virol.* – 2020. – Vol. 165 (9). – P. 935–945. – DOI: 10.1007/s00705-020-04706-3

387. Weng, J. K. The evolutionary paths towards complexity: A metabolic perspective / J. K. Weng // *New Phytol.* – 2014. – Vol. 201 (4). – P. 1141–1149. – DOI: 10.1111/nph.12416

388. West Nile virus core protein; tetramer structure and ribbon formation / T. Dokland, M. Walsh, J. M. Mackenzie [et al.] // *Structure.* – 2004. – Vol. 12 (7). – P. 1157–1163. – DOI: 10.1016/j.str.2004.04.024.

389. Wilson, D. S. *In vitro* selection of functional nucleic acids / D. S. Wilson, J. W. Szostak // *Annu. Rev. Biochem.* – 1999. – Vol. 68. – P. 611–647.

390. Winkler, J. Therapeutic oligonucleotides with polyethylene glycol modifications / J. Winkler // *Future Med. Chem.* – 2015. – Vol. 7 (13). – P. 1721–1731. – DOI: 10.4155/fmc.15.94

391. World Health Organization. WHO Global malaria programme: Position statement on ITNs [Электронный ресурс] / World Health Organization. – 2005a. – Режим доступа: <http://www.who.int/malaria/docs/itn/ITNspospaperfinal.pdf> (дата обращения: 9.06.2020).

392. World Health Organization. WHO Global vector control response 2017–2030 / World Health Organization. – Geneva, 2017.

393. World Health Organization. WHO monographs on selected medicinal plants / World Health Organization. – Geneva, 2002. – Vol. 2.

394. Yang, Z. Combined administration of low-dose gossypol acetic acid with desogestrel/mini-dose ethinylestradiol/testosterone undecanoate as an oral contraceptive for men / Z. Yang, W. Ye, G. Cui // *Contraception.* – 2004. – Vol. 70 (3). – P. 203–211.

395. Zhang, Z. Nucleic acid aptamers in human viral disease / Z. Zhang, M. Blank, H. J. Schluesener // *Arch. Immunol. Ther. Exp.* – 2004. – Vol. 52. – P. 307–315.

396. Zmurko, J. Flaviviral NS4b, chameleon and jack-in-the-box roles in viral replication and pathogenesis, and a molecular target for antiviral intervention / J. Zmurko, J. Neyts, K. Dallmeier // *Rev. Med. Virol.* – 2015. – Vol. 25 (4). – P. 205–23. – DOI: 10.1002/rmv.1835