



На правах рукописи

ХАЙБУЛЛИНА СВЕТЛАНА ФРАНЦЕВНА

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПАТОГЕНЕЗА
ХАНТАВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

14.03.03 – патологическая физиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Казань – 2015

Работа выполнена в ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» и Университете штата Невада, г. Рено, США.

Научный консультант: доктор биологических наук, доцент
Ризванов Альберт Анатольевич

Официальные оппоненты: **Санникова Ирина Викторовна**
доктор медицинских наук, профессор кафедры инфекционных болезней и фтизиатрии с курсом ДПО, ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет»

Василий Николаевич Цыган
доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии, ФГБВОУ ВПО Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова

Киселев Сергей Васильевич
доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой общей и органической химии ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет»

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»

Защита состоится «12» января 2016 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.034.01 при ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: г. Казань, ул. Бутлерова, д. 49.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (420012, г. Казань, ул. Бутлерова, д. 49, корпус Б) и на сайте: <http://www.kgmu.kcn.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Л.Д. Зубаирова

Общая характеристика работы

Актуальность исследования

Проблема терапии вирусных заболеваний остается актуальной и недостаточно исследованной в медицине. Эта актуальность обусловлена, с одной стороны, высокой встречаемостью этого вида патологии, а с другой — отсутствием эффективных терапевтических подходов для их лечения. Вирусные геморрагические лихорадки (ВГЛ) являются острыми заболеваниями, характеризующимися нарушениями молекулярных и клеточных процессов, регулирующих реологические свойства крови. Эндотелиальные клетки являются мишенью для вирусов, вызывающих ВГЛ (N.A. Dalrymple et al., 2012; R. Rodrigues et al., 2012). Проникнув в клетку, вирусы используют внутриклеточные механизмы для собственной репликации, таким образом, внося нарушения в ее нормальные физиологические процессы. Несмотря на интенсивные исследования, молекулярные механизмы патогенеза ВГЛ остаются недостаточно исследованными. Именно поэтому до сих пор не существует эффективных методов лечения этих заболеваний.

Начало 21-го века ознаменовалось значительным расширением эпидемических ареалов геморрагических лихорадок. Например, значительное распространение получила Конго-Крымская геморрагическая лихорадка (R.M. Vorou, 2009). Были отмечены изменения в ареалах распространения хантавирусных инфекций, таких как геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) в странах Европы и в России (Н.М. Окулова и др., 2013; Е.С. Мутных и др., 2014; А.А. Суздальцев и др., 2014). На основании этих данных можно сделать заключение, что в настоящее время происходит интенсивное распространение возбудителей ВГЛ. Основной причиной распространения ВГЛ являются изменение климата, расширение производственной деятельности человека и развитие туризма. Таким образом, человечество стоит перед новым вызовом 21 века: стремительным распространением ВГЛ на фоне отсутствия эффективных терапевтических средств.

В Российской Федерации ГЛПС является наиболее значимой из ВГЛ. Республика Татарстан относится к зоонозным очагам ГЛПС, где инфекционным агентом является хантавирус Пуумала (англ. Puumala virus, PUUV), вызывающий легкую форму заболевания с летальным исходом менее 0,4% (Е.А. Ткаченко и др., 2013; N.A. Khismatullina et al., 2015). Исследования тканей умерших пациентов выявило наличие вирусных антигенов в эндотелиальных клетках капилляров, а дальнейшие исследования *in vitro* подтвердили высокую чувствительность этих клеток к инфицированию хантавирусами (M. Mori et al., 1999; S.R. Zaki et al., 1995). Многочисленные исследования тканей умерших от ГЛПС выявили отсутствие поражений, связанных с репликацией вируса (M. Mori, et al., 1999; S.R. Zaki, et al., 1995). Поэтому было высказано предположение, что патогенез хантавирусной инфекции определяется реакцией организма на проникновение вируса и его репликацию. На основании накопленных данных была

предложена гипотеза «цитокинового шторма» для объяснения патогенеза этого заболевания (L.T. Figueiredo et al., 2014). Считается, что активация про-воспалительных цитокинов в ответ на хантавирусную инфекцию приводит к нарушению регуляции гемодинамических параметров, стимулируя иммунный ответ и активируя эндотелиальные клетки. Это в совокупности может приводить к нарушениям физиологических процессов регуляции коагуляционного каскада, приводящим к агрегации кровяных пластинок (тромбоцитов) и развитию коагулопатии, проявляющейся в виде геморрагического синдрома.

Значительные успехи в нашем понимании механизмов иммунного ответа и факторов его регуляции существенно изменили подходы в методах лечения многих заболеваний. Например, получило широкое распространение применение антител к различным воспалительным цитокинам при лечении ревматоидного артрита, а моноклональные антитела к ИЛ-5 используются при лечении бронхиальной астмы (G. Garcia et al., 2013; R.N. Maini et al., 2000). Одним из ярких примеров терапевтического использования моноклональных антител является лечение ряда аутоиммунных заболеваний антителами к интерферону (B. Skurkovich et al., 2003; S. Skurkovich et al., 2005). Однако принципы лечения ГЛПС и других хантавирусных инфекций остаются неизменными и малоэффективными в течение последних 50 лет и включают, в основном, симптоматическую терапию, которая не способна подавлять вирусную репликацию и предотвращать патологическое действие цитокинов (Z. Bi et al., 2008; C.B. Jonsson et al., 2008). Основной причиной отсутствия новых методов лечения хантавирусных инфекций, как уже отмечено, является наша ограниченность в понимании патогенеза заболевания. Это связано, в основном, с отсутствием модели на животных *in vivo*, а проведение исследований *in vitro* возможно только в лабораториях с повышенной степенью биобезопасности.

Таким образом, несмотря на многолетние исследования, молекулярные основы патогенеза хантавирусных инфекций остаются во многом неизвестными. Именно отсутствие глубокого понимания молекулярных механизмов ГЛПС является основной причиной отсутствия патогномичной терапии и методов предупреждения заболевания. Поэтому существует необходимость всесторонних исследований патогенеза ГЛПС с целью выявления и использования маркеров диагностики, лечения и предупреждения болезни.

Цель работы: выявление молекулярных и клеточных механизмов патогенеза хантавирусной инфекции.

Задачи исследования:

1. Анализ транскрипционной активности в эндотелиальных клетках человека, инфицированных патогенными и непатогенными хантавирусами.
2. Анализ механизмов активации ядерных транскрипционных факторов в эндотелиальных клетках человека, инфицированных различными хантавирусами.

3. Анализ механизмов противовирусной защиты, опосредованной активацией интерферон-индуцированных факторов в клетках человека, инфицированных хантавирусами.

4. Изучение механизмов активации интерферон-индуцированных белков в клетках, инфицированных хантавирусами.

5. Изучение роли сывороточных цитокинов в механизме иммунного ответа против хантавирусных инфекций.

6. Выявление причин низкой эффективности лечения хантавирусной инфекции препаратом Рибавирин.

7. Анализ особенностей репликации реассортантных вирусов между различными патогенными хантавирусами.

Научная новизна

Новыми являются данные по транскрипционной активности в эндотелиальных клетках, инфицированных патогенными и непатогенными для человека хантавирусами. Впервые показана активация ядерных транскрипционных факторов в клетках, инфицированных хантавирусами, и выявлены механизмы, объясняющие отсутствие цитопатического эффекта в этих клетках. Несомненной новизной обладают данные об активации уникального цитокинового профиля в клетках, инфицированных хантавирусами, позволяющие объяснить гистологические изменения, обнаруженные у больных хантавирусной инфекцией. Впервые показана активация интерферон-индуцированных генов (ИИГ) в клетках, инфицированных хантавирусами, а также зависимость вирусной репликации от способности клеток активировать интерферон индуцированные белки. Приоритетными являются данные о возможности ингибирования хантавирусной репликации путем активации интерферон индуцированных белков. Новыми являются результаты, указывающие на то, что патогенез хантавирусной инфекции у человека, вызванной вирусом Пуумала, определяется активацией цитокинов в сыворотке крови. Впервые показано, что тяжесть заболевания определяется активацией ИЛ-12 и ИФН- γ . Новизной обладают данные о влиянии препарата Рибавирин на активацию цитокинов в клетках, инфицированных хантавирусом. Показано, что неэффективность препарата Рибавирин при лечении хантавирусной инфекции, возможно, определяется его неспособностью ингибировать активацию цитокинов, вызванную инфекцией. Впервые получены реассортанты между патогенными для человека штаммами хантавирусов, циркулирующими в генетически отдаленных популяциях мелких грызунов, а также исследованы инфекционные характеристики новых химерных вирусов и их отличие от родительских штаммов.

Теоретическая и практическая значимость

Патогенез хантавирусных инфекций у человека остается в основном мало изученным. Это является основной причиной отсутствия эффективных препаратов для лечения и профилактики заболевания. Вирусы являются нецитопатичными, поэтому

фармакологическое влияние на внутриклеточные процессы, активированные хантавирусной инфекцией, представляется наиболее логичным в подходе к лечению хантавирусной инфекции. Однако именно эта область знаний оставалась наименее изученной. Поэтому полученные данные о влиянии хантавирусной инфекции на внутриклеточные процессы является важным шагом в дальнейшей разработке препаратов для лечения и предупреждения инфекции. В этом разрезе, особенно интересными представляются полученные данные о чувствительности хантавирусной инфекции к активации интерферон-индуцированных белков. Поэтому, данные об эффективности ингибирования хантавирусной инфекции путем активации внутриклеточных интерферон-индуцированных механизмов выявили новый подход к лечению хантавирусной инфекции. Также впервые показаны механизмы активации интерферон-индуцированных белков в клетках, инфицированных хантавирусом. Таким образом, был выявлен круг белков — потенциальных мишеней для терапевтического вмешательства. Далее, нужно отметить, что получены данные, подтверждающие гипотезу о роли активации цитокинов у больных ГЛПС. Показано, что тяжесть заболевания определяется активацией ИЛ-12 и ИФН γ . Более того, активация этих цитокинов приводит к развитию легкой формы болезни. Поэтому сделано заключение, что лекарственные вещества, способные активировать ИЛ-12 и ИФН γ в крови больных ГЛПС, могут обладать высокой терапевтической эффективностью при лечении этого заболевания. Таким образом, выявлены две потенциальные мишени для лечения хантавирусной инфекции, включающие интерферон-индуцируемые белки и цитокины ИЛ-12 и ИФН γ . Проведенные исследования впервые представили объяснение неэффективности препарата Рибавирин при лечении хантавирусной инфекции, что представляет важный вклад в разработку новых подходов к лечению ГЛПС. Важность полученных данных определяется и тем, что прежние представления о лечении хантавирусных инфекции противовирусными препаратами неприменимы к лечению хантавирусных инфекций. Показана важность купирования «цитокинового шторма», вызванного хантавирусной инфекцией, поскольку активация цитокинов определяет тяжесть заболевания.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Инфицирование эндотелиальных клеток человека вирусом Син Нобре (SNV) активирует транскрипционный фактор PML и приводит к образованию нуклеарных телец внутри клеточного ядра.
2. Активация интерферон зависимого белка MxA (p78) ингибирует хантавирусную репликацию и определяет эффективность репликации хантавирусов в культуре клеток.
3. Препарат Рибавирин подавляет хантавирусную репликацию, но не ингибирует активацию цитокинов, вызванную ФНО- α .
4. Патогенные хантавирусы Андес (AND) и Син Нобре (SNV), циркулирующие в различных подвидах мелких грызунов, образуют реассортанты *in vitro*, способные к репликации в клетках Vero E6.

Связь работы с базовыми научными программами

Представленная работа была поддержана грантом Национального Института Здоровья (НИИ) за номером AI36418, AI39808, AI45059и AI65359, а также офисом The Medical Service and Research Service of the Veteran Affairs Sierra Nevada Health Care System. Кроме того, исследования были финансированы Российским Министерством Науки и образования ФСП №14.А18.21.1930, ФСП №16.552.11.7083. Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров (5-ТОП-100).

Апробация работы

Материалы диссертации представлены на ежегодных естественно-научных конференциях Университета Штата Невада (г. Рено, Лейк Тахо, США, 1998 г. и 2006 г.). Кроме того, результаты представлены на IV Международной конференции по геморрагической лихорадке с почечным синдромом и хантавирусному легочному синдрому (г. Атланта, США, 1998 г.), V Международной конференции по геморрагической лихорадке с почечным синдромом и хантавирусному легочному синдрому (г. Аннси, Франция, 2001 г.), VI Международной конференции по геморрагической лихорадке с почечным синдромом и хантавирусному легочному синдрому и хантавирусам (г. Сеул, Корея, 2004 г.), VII Международной конференции по ГЛПС, ХЛС и хантавирусам (г. Буэнос Аэрес, Аргентина, 2007 г.). Также результаты были представлены на 22-м ежегодном собрании Американского общества Вирусологов (г. Давис, США, 2003 г.), и на собрании Американского общества Микробиологов: Viral Immune Evasion (г. Акапулько, Мексика, 2005 г.). Кроме того, результаты исследований были доложены на VI Ежегодном Международном симпозиуме «Актуальные вопросы генных и клеточных технологий» (г. Казань, Россия, 2013 г.), на IV Международной научно-практической конференции «Новые концепции механизмов воспаления, аутоиммунного ответа и развития опухоли» (г. Казань, Россия, 2014 г.), на XII Межгосударственной научно-практической конференции «Вклад государств-участников Содружества Независимых Государств в обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения в современных условиях» (г. Саратов, Россия, 2014 г.); на V Международной конференции «New concepts on the mechanisms of inflammation, autoimmunity and tumorigenesis» (г. Казань, Россия, 2015 г.), на 19-й Международной конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (г. Пущино, Россия, 2015 г.).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ, опубликованных в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК для защиты докторских диссертаций, а также 27 тезисов докладов на международных конференциях и конгрессах.

Место выполнения работы

Основные экспериментальные данные получены автором за время работы в лабораториях профессора Стива Ст. Джоура в Университете штата Невада, г. Рено, США (1996–2010) и в Казанском (Приволжском) федеральном университете (2010-2015).

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, результатов исследования, обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы (416 ссылок) и списка иллюстративного материала. Работа содержит 46 рисунков и 13 таблиц.

Личный вклад автора

Все данные, приведенные в работе, получены при непосредственном участии диссертанта на всех этапах проведения исследования, а именно: составление плана работы, подготовка и проведение экспериментов, анализ и систематизация полученных данных, а также оформление публикаций.

На основании самостоятельной работы автора решена важная патофизиологическая задача исследования роли активации клеточного ответа в патогенезе хантавирусной инфекции, что вносит важный вклад в разработку методов и научных принципов поиска новых эффективных лекарственных средств лечения хантавирусной инфекции. Данные, полученные лично автором, демонстрируют возможность использования методов активации интерферон-индуцируемых белков в качестве нового подхода в поиске терапевтических средств лечения хантавирусной инфекции. Кроме того, автором показана значимость активации ИЛ-12 и ИФН- γ в развитии легкой формы клинического течения хантавирусной инфекции, что открывает новые перспективы в подборе терапевтических средств лечения хантавирусной инфекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культуры клеток и реагенты. Эндотелиальные клетки вен пупочного канатика (HUVEC), клетки Vero clone E6 (Vero E6) и A549 были получены из ATCC. Клетки HUVEC растили на среде MCDB 131, обогащенной сосудистым эндотелиальным фактором роста человека, 2% гидрокортизоном, сывороткой крови плодов коровы (FBS), фактором роста фибробластов человека (0,5 мг; 1 мкг/мл), аскорбиновой кислотой, гепарином (0,5 мг; 1 мкг/мл) и гентамицином (Clonetics Corporation; Уолкерсвилль, Мериленд). Клетки использовали между 2-м и 4-м пассажами. Клетки Vero E6 и A549 растили с использованием среды DMEM, содержащей 20% FBS и 50 мкг/мл гентамицина. Альвеолярные макрофаги человека выделяли из бронхо-альвеолярного лаважа.

Сыворотки человека. Сыворотки от больных ГЛПС были собраны в различные сроки от начала заболевания. Образцы сыворотки здоровых доноров были использованы в качестве контроля. Разрешение этического комитета Казанского (Приволжского) федерального университета Российской Федерации на проведение сбора образцов сыворотки человека было получено на основании статьи 20 Федерального

Законодательства по «Защите Здоровья Граждан Российской Федерации» N323-FZ, 11.21.2011.

Вирусы. В исследованиях использовали вирус Андес (англ. Andes virus, ANDV; штамм 23), вирус Син Номбре (англ. Sin Nombre virus, SNV); штамм CC107), вирус Проспект Хилл (англ. Prospect Hill virus, PHV) и вирус Хантаан (англ. Hantaan, HTV). Для приготовления вирусного материала клетки Vero E6 инфицировали хантавирусами (множественность инфицирования MOI 0,1). Супернатант собирали на 14-й день культивирования и хранили при температуре -80°C . В экспериментальных исследованиях, клетки инфицировали с использованием MOI 1. Для этого вирусный концентрат был приготовлен путем ультрацентрифугирования вирусного материала (1 час, 30 000 об/мин, 4°C). Полученный осадок, содержащий вирус, ресуспендировали в среде DMEM (10% FBS, глутамин, 50 мкг/мл гентамицина).

Метод непрямого бляшкообразования. Титр вируса определяли методом непрямого бляшкообразования. Для этого, монослой клеток Vero E6 инокулировали инфекционным супернатантом и инкубировали в течение 1 часа (37°C , 5% CO_2). Через 14 дней инкубирования, агарозу удаляли, клеточный монослой фиксировали в течение 10 мин в растворе ацетона и метанола в соотношении 1:3 (4°C) и инкубировали с антителами мыши к нуклеокапсиду вируса Пуумала (1:1000; CDC) в течение 1 часа при 37°C . После 3-х кратной промывки (ФСБ; 0,5% Твин), монослой инкубировали со вторичными антителами к иммуноглобулинам мыши (1:5000; Santa Cruz), конъюгированными с щелочной фосфатазой. Связавшиеся антитела выявляли с использованием набора Alkaline Phosphatase Substrate KIT I kit (Vector).

Выделение общей РНК. Общую РНК выделяли с использованием реагента Trizol (Invitrogen) согласно протоколу производителя. Выделенную РНК обрабатывали ДНКазой для удаления возможной ДНК-контаминации. Полученную общую РНК хранили при температуре -80°C .

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Флуоресцентные зонды (пробы) и праймеры для ПЦР-РВ были разработаны с применением программного обеспечения Primer Express (Applied Biosystems) в соответствии с рекомендациями производителя. Рибосомная РНК (18S) использовалась в качестве внутреннего контроля. Стандартные графики для относительной количественной оценки РНК, кодирующей S-сегмент хантавируса, мРНК, кодирующей клеточные белки, и 18S рРНК строили, используя последовательные разведения кДНК, полученные от инфицированных и неинфицированных контрольных образцов, в зависимости от специфики эксперимента. В каждом эксперименте значения ПЦР-РВ, полученные для S-сегмента хантавирусной РНК, а также для мРНК, кодирующей клеточные белки, нормализовали по значениям ПЦР-РВ для 18S рРНК соответствующего образца.

Анализ ДНК-чипов. Изменения внутриклеточной концентрации мРНК оценивали с использованием набора Human Genome HG-U95 Gene Chip (Affymetrix) согласно

рекомендациям производителя. После гибридизации чипы промывали и окрашивали стрептавидин фикоэритрином и использовали для сканирования согласно протоколу Affymetrix.

Иммуногистохимический анализ. Монослой инфицированных хантавирусом клеток фиксировали метанолом и ацетоном (3:1) в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем препараты промывали и инкубировали со специфичными первичными антителами в различных комбинациях. После инкубации препаратов с соответствующими вторичными флуоресцентно мечеными антителами визуализацию проводили используя флуоресцентный конфокальный микроскоп (Nicon C1). Изображения обрабатывали с помощью программы Easy C1. В некоторых экспериментах проводилась колориметрическая окраска с помощью набора Alkaline Phosphatase Substrate KIT I kit (Vector).

Получение клеточной линии, экспрессирующей p78. Клетки Vero E6 трансфицировались двумя плазмидами: 1) pcDNA3-NA-p78, содержащей открытую рамку считывания (англ. Open reading frame, ORF) гена p78 (предоставлена доктором Халлером, Фрейбургский университет, Германия) или 2) плазмидой pEGFP-puro, содержащей зеленый флуоресцентный белок (англ. Green fluorescent protein, GFP) и ген устойчивости к пиромидину. Липофектамин (Life Technology) был использован для трансфекции клеток согласно рекомендациям производителя. Эффективность трансфекции определяли путем подсчета GFP-положительных клеток, используя флуоресцентный микроскоп.

Для получения стабильно трансформированных клеток, трансфицированные клетки Vero E6 растили в чашках Петри, содержащих среду DMEM (10% FBS) с добавлением 1 мкг/мл пиромидина (MP Biomedicals).

Твердофазный иммуоферментный анализ (ИФА). Содержание цитокинов в культуральной среде определяли с помощью метода иммуоферментного анализа (R&D Systems) согласно рекомендациям производителя.

Мультиплексный анализ. Метод мультиплексного анализа на основе технологии xMAP Luminex использовали для определения сывороточных цитокинов/хемокинов в крови больных ГЛПС и здоровых доноров. Количественный анализ уровня цитокинов/хемокинов оценивали методом проточной флуориметрии на мультиплексном анализаторе Bioplex®200™ (Bio-Rad) в соответствии с инструкцией фирмы производителя (Bio-Rad).

Иммуноблотинг. Лизаты клеток использовали для электрофореза в агарозном геле в денатурирующих условиях в системе Лаэмли (SDS-PAGE). После переноса белков, мембрану блокировали и инкубировали с первичными и вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (ПХ) (Vector Laboratories, Inc, Бурлингем, Калифорния). Комплексы антиген-антитело идентифицировали с помощью субстрата ПХ (Vector Laboratories, Inc, Бурлингем, Калифорния) согласно инструкции производителя.

Получение поликлональных антител к гликопротеину G2. Анти-пептидные антитела получали к пептидам, синтезированным на основе аминокислотных последовательностей гликопротеина G2 хантавирусов ANDV (штамм 23), вируса SNV (штамм CC107). Участок гликопротеина G2 SNV, расположенный на С-конце (aa 480-489; CPVRNRKKNKAN), и участок гликопротеина G2 ANDV, расположенный на С-конце (aa 480-488; CPRRGHKKTV), синтезировали с помощью Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer. Очищенные с применением ВЭЖХ пептиды ковалентно сшивали с белком-переносчиком гемоцианин лимфы улитки (KLH) через N-концевой цистеин пептида для формирования пептид-белковых конъюгатов. Смесь пептидов ANDV или SNV с полным адьювантом Фрейнда использовали для иммунизации кроликов. Сыворотку собирали через 2 месяца после первой иммунизации. Специфические антитела к гликопротеину G2 ANDV и SNV очищали с применением аффинной хроматографии на колонке SulfoLink Kit (Pierce), конъюгированной с соответствующими пептидами. Специфичность генерируемых анти-G2 антител определялась с помощью ИФА и иммуноблотинга.

Клональная селекция хантавирусов. Монослой клеток Vero E6 инфицировался содержащим вирус супернатантом и покрывался средой, содержащей агарозу (DMEM, 2% FBS, 0,6% агароза). Через 12 дней раствор нейтрального красного добавлялся поверх агарозной среды и инкубировался в течение последующих 24-х часов (37°C, 5% CO₂). При этом инфицированные клетки окрашивались нейтральным красным. Вирусные бляшки собирались и индивидуально переносились на свежий монослой клеток Vero E6 в 24-луночной планшете, где инкубирование продолжалось в течение еще 10 дней (37°C, 5% CO₂). По окончании инкубации, инфицированные клетки и культуральная жидкость собирались и хранились при -80 °C. Аликвоты собранного материала использовали для выделения общей РНК с использованием реагента Trizol согласно рекомендациям производителя (Invitrogen).

Скрининг на вирусные реассортанты. Для скрининга потенциальных вирусных реассортантов проводили два цикла вирусной селекции. После первого цикла селекции, вирусные клоны анализировали на присутствие РНК, кодирующей S, M и L сегменты вирусов SNV и ANDV с использованием смеси специфических праймеров и проб по технологии ПЦР-РВ. Общая РНК из клеток Vero E6, инфицированных хантавирусами SNV или ANDV, использовалась в качестве положительного контроля. Рекомбинанты, удовлетворявшие St-критерию для SNV и ANDV, отбирались для селекции во втором цикле селекции.

Реакция обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Общая РНК была использована для получения кДНК с использованием случайных гексамерных праймеров (Invitrogen) и реакции обратной транскрипции. Реакцию ПЦР проводили с помощью Platinum Taq (Life Technologies) согласно инструкции фирмы производителя.

Анализ TUNEL. Анализ TUNEL выполнялся с применением набора *in situ* Cell Death-POD kit (Roche) в соответствии с инструкциями производителя.

Статистический анализ. Статистический анализ выполнялся с помощью *t*-критерия Стьюдента. Статистическую значимость устанавливали на уровне *p*-значения <0,05. Данные представляли как среднее значение ± стандартное отклонение.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Патогенез хантавирусной инфекции

Цитокины играют важную роль в патогенезе вирусных инфекций. Однако влияние цитокинов на вирусную репликацию остается неизвестным. Поэтому была поставлена задача выяснить влияние ФНО- α на аккумуляцию вирусного белка в клетках, инфицированных хантавирусом. В экспериментах ФНО- α (50 нг/мл) снижал накопление нуклеокапсидного белка в клетках Vero E6 на 1-й, 3-й, 4-й, 5-й, 6-й и 7-й дни после инфицирования, но не оказывал влияния на процент инфицированных клеток или проявления видимого цитопатического эффекта в клетках Vero E6. Дальнейшие исследования показали, что эффект ФНО- α является дозозависимым.

Известным является факт увеличения синтеза оксида азота в клетках в присутствии ФНО- α (W. Song et al., 2000; J. Yamaoka et al., 2000). Поскольку оксид азота является неспецифическим противовирусным веществом (J.B. Mannick 1995), увеличение его концентрации в инфицированных клетках может объяснять подавляющий эффект цитокина на накопление нуклеокапсидного белка вируса SNV. Для изучения этой гипотезы были использованы схемы изолированного или сочетанного использования ФНО- α и N(G)-монометил-L-аргинина (ММА) — ингибитора синтазы оксида азота. Ингибитор синтазы оксида азота не устранял подавляющего эффекта ФНО- α на накопление нуклеокапсидного белка SNV в инфицированных клетках.

Известно, что противовоспалительный препарат пентоксифиллин устраняет эффекты ФНО- α (С. Elbim et al., 1995). Поэтому, чтобы удостовериться, что ингибирующий эффект ФНО- α не обусловлен паракринными воздействиями, а непосредственным влиянием цитокина, было изучено накопление вирусного нуклеопротеина в инфицированных клетках Vero E6, инкубированных в присутствии ФНО- α и препарата пентоксифиллина. Сочетанное применение ФНО- α и препарата пентоксифиллин устраняло эффект цитокина и восстанавливало накопление вирусного нуклеокапсидного белка до уровня контрольной группы.

Модифицированная камера Бойдена (Boyden) использовалась для определения влияния инфекции вирусом SNV на проницаемость монослоя эндотелиальных клеток HUVEC. Трансмембранная диффузия пероксидазы хрена использовали для выявления изменений проницаемости эндотелиального монослоя согласно описанию Feldmann с соавт. (H. Feldmann et al., 1996). Инфицирование монослоя HUVEC вирусом SNV не вызывало статистически значимого увеличения проницаемости. Однако на протяжении всего периода наблюдения сохранялась тенденция к увеличению проницаемости монослоя

HUVEC, инфицированного вирусом SNV, по сравнению с неинфицированным контролем. Увеличение проницаемости эндотелия не было вызвано цитопатическим эффектом SNV. Добавление ФНО- α в верхний компартмент вызывало статистически значимое ($p < 0,05$, $p < 0,001$) повышение проницаемости монослоя клеток HUVEC через 5 и 24 часа после начала эксперимента. Эти результаты позволяют предположить, что проницаемость эндотелиального монослоя является следствием воздействия цитокинов на эндотелиальные клетки.

Исследования показали, что ФНО- α не производится эндотелиальными клетками, инфицированными хантавирусом. Поэтому были проведены эксперименты по выявлению способности макрофагов к инфицированию хантавирусами и активации секреции ФНО- α . Полученные результаты показали, что альвеолярные макрофаги человека могут быть инфицированы вирусом SNV *in vitro*. Кроме того, инфицированные хантавирусом альвеолярные макрофаги вырабатывали ФНО- α . Культуральная жидкость от инфицированных вирусом SNV альвеолярных макрофагов человека не вызывала статистически значимых различий в проницаемости монослоя клеток HUVEC.

Таким образом: (1) ФНО- α обладает подавляющим эффектом на накопление нуклеокапсидного белка вируса SNV в инфицированных клетках; (2) альвеолярные макрофаги человека восприимчивы к инфицированию SNV и реагируют выработкой ФНО- α ; (3) культуральная жидкость инфицированных альвеолярных макрофагов человека неспособна индуцировать проницаемость эндотелиального монослоя; (4) инфицирование эндотелиального монослоя вирусом SNV приводит к незначительному повышению проницаемости, которая может быть признаком структурных изменений в межклеточных контактах эндотелия.

Были проведены исследования по оценке влияния хантавирусной инфекции на активацию транскрипции клеточных генов в эндотелиальных клетках человека. В исследованиях применялись ДНК-чипы, содержащие 12625 генов человека. Экспрессия клеточных генов в инфицированных хантавирусами клетках HUVEC сравнивали с таковой в ложно-инфицированных клетках, при этом различие в экспрессии генов в 2 раза рассматривалось как значимая.

Несмотря на раннюю стадию инфекции (4 и 12 часов после инфицирования), изменения в транскрипции 11 и 12 генов группы интерферон-индуцированных генов (ИИГ) обнаружались в эндотелиальных клетках, инфицированных PHV и SNV, соответственно. Усиление транскрипционной активности интерферон-индуцируемого белка 54 кДа и белка Cig5 обнаруживалось только в клетках, инфицированных SNV. Хантавирусная инфекция значительно влияла на транскрипцию генов олигосинтетаз. Транскрипция генов 2'-5'-синтетазы, индуцируемой интерфероном, и 2'-5'-олигоаденилат синтетазы E усиливалась в 10,8 и в 28,7 раза, соответственно, в клетках HUVEC, инфицированных PHV, через 12 часов после инфицирования. В то же время, увеличение транскрипционной активности тех же генов в клетках HUVEC, инфицированных SNV,

возрастало в 5,1 и 15,5 раз, соответственно. Однако транскрипция 2'-5'-олигоаденилат синтетазы белка 69 кДа в HUVEC, инфицированных вирусом PHV, не изменялась, тогда как инфицирование вирусом SNV усиливало экспрессию этого гена (в 15,9 раза).

Транскрипция трех IRF генов (IRF-7, IRF-1 и IRF-9) активировалась в клетках, инфицированных хантавирусами. Транскрипционная активность IRF-9 в HUVEC была существенно выше после инфицирования (через 4 часа) SNV и PHV по сравнению с неинфицированным контролем. Внутриклеточные уровни мРНК IRF-7 увеличивались через 12 часов после инфицирования вирусами SNV и PHV. Инфицирование SNV значительно усиливало транскрипцию IRF-7 в HUVEC, по сравнению с PHV (4,2 против 11,4 раза). Транскрипция IRF-7 увеличивалась через 12 часов после инфицирования только в клетках, инфицированных SNV. Инфицирование SNV усиливало транскрипцию 17 генов, образующих группу нуклеарных и транскрипционных факторов. Транскрипция большей части генов (13 генов) увеличивалась к 12 часам после инфицирования, тогда как меньшая группа генов (4 гена) характеризовалась усилением транскрипции через 4 часа после инфицирования.

Одной из самых представительных является группа генов, связанных с регуляцией клеточного роста или смерти. Эта группа генов была разделена на две под-группы: 1. кодирующие белки, связанные с ростом или гибелью клетки и 2. белки, связанные с апоптозом. Транскрипционная активность 36 генов увеличивалась в клетках, инфицированных SNV. Большая часть этих генов (31 ген) характеризовалась увеличением транскрипции через 12 часов после инфицирования, тогда как транскрипция 5 генов увеличивалась через 4 часа после инфицирования. Напротив, активация транскрипции была отмечена у значимо малочисленной группы генов (3 гена) в клетках HUVEC, инфицированных вирусом PHV.

Было показано повышение внутриклеточного уровня мРНК для генного кластера СС хемокинов, включающего MIP1-1, HCC-2, HCC-1, LEC и CCL5 в клетках HUVEC, инфицированных SNV и PHV. Увеличение экспрессии генов, расположенных в этом кластере, обнаруживалось через 4 часа после инфицирования и оставалось повышенным спустя 12 часов. Следует отметить, что патогенные и непатогенные хантавирусы активировали транскрипционную активность генов СС хемокинов на ранней стадии инфекции.

Для подтверждения полученных результатов, был проведен ПЦР-РВ анализ экспрессии отдельных генов (Рисунок 1). Поскольку ген CCL5 был частью генного кластера СС хемокинов, включенного в ДНК-чипы, нами было принято решение изучить экспрессию мРНК CCL5 в инфицированных хантавирусом клетках. Кроме того, были исследованы внутриклеточные уровни мРНК генов p78, Cig5 и Bcl2.

Показано, что инфицирование эндотелиальных клеток человека способствует увеличению транскрипционной активности генов, кодирующих белки с известной противовирусной активностью. Ген p78 принадлежит к группе генов, кодирующих белки,

ингибирующие репликацию вирусов. При этом внутриклеточные уровни РНК S-сегмента ANDV были сравнимы в клетках Vero E6, A549 и HUVEC через 3 часа после инфицирования. Однако дальнейшее накопление РНК S-сегмента различалось между этими клеточными линиями. Например, к 24 часам после инфицирования внутриклеточный уровень РНК S-сегмента ANDV повышался примерно в 10 раз в клетках Vero E6 и HUVEC, тогда как в клетках линии A549 уровень РНК S-сегмента ANDV повышался примерно в 2 раза. Внутриклеточный уровень РНК S-сегмента ANDV продолжал увеличиваться в клетках Vero E6 до 72 часов после инфицирования. Напротив, уровень РНК S-сегмента ANDV в клетках HUVEC существенно снижался в тот же период времени, возвращаясь к уровню, наблюдаемому через 3 часа после инфицирования. Внутриклеточный уровень РНК S-сегмента ANDV в клетках A549 продолжал увеличиваться в течение 72 часов после инфицирования. Активация гена p78 обратно пропорциональна репликационной активности вирусов. Механизм активации белка p78 основан на нуклеарной транслокации IRF-3. Поэтому было принято решение изучить влияние хантавирусной инфекции на внутриклеточную локализацию IRF-3, где обнаружение IRF-3 в ядре инфицированных клеток являлось бы доказательством активации этого транскрипционного фактора. Как и ожидалось, в неинфицированных клетках HUVEC локализация IRF-3 ограничивалась цитоплазмой. Однако через 48 часов после инфицирования IRF-3 перемещался в ядра клеток HUVEC, инфицированных вирусом ANDV.

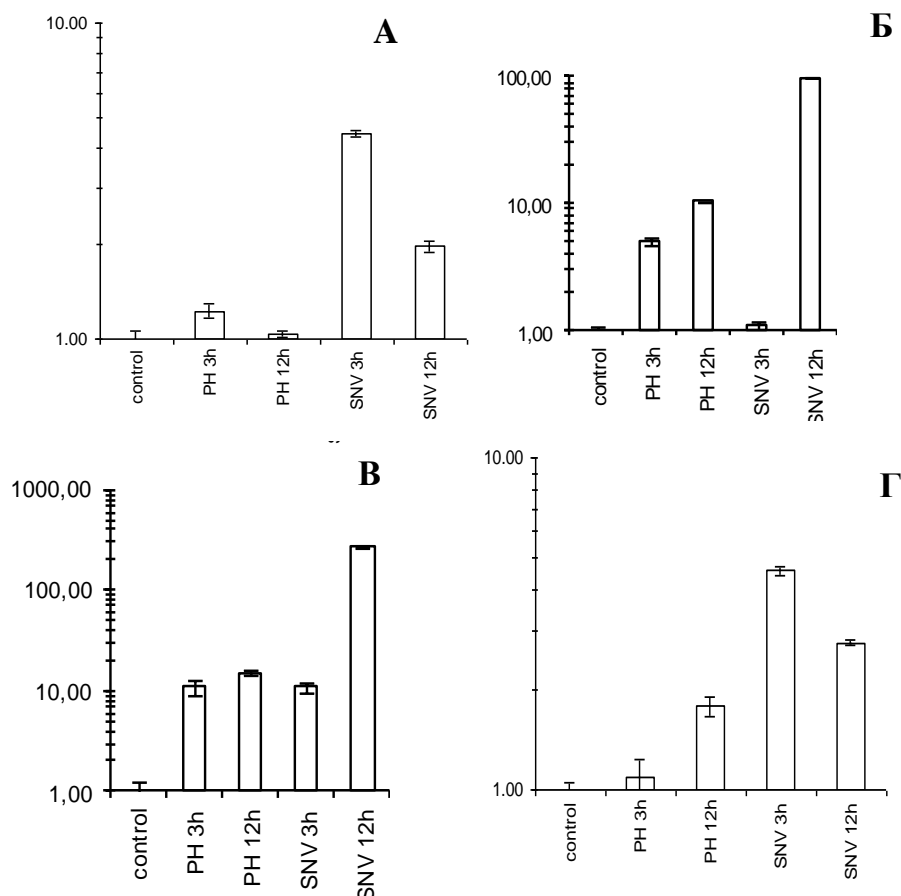


Рисунок 1 – Внутриклеточный уровень мРНК генов CCL5, p78, Cig5 и Bcl2 в клетках HUVEC, инфицированных вирусами SNV и PHV. Общая РНК собиралась через 4 и 12 часов после инфицирования и использовалась для анализа уровня экспрессии генов с помощью ПЦР-РВ: А — CCL5; Б — p78, В — Cig5 и Г — Bcl2.

Поскольку активация p78 была обратно пропорциональна накоплению хантавирусной РНК, нами было принято решение изучить влияние экспрессии белка p78 на хантавирусную репликацию. Повышенная экспрессия белка p78 обеспечивалась трансфекцией клеток Vero E6 плазмидой, кодирующей открытую рамку считывания белка p78. Повышенная экспрессия белка p78 клетками Vero E6 подавляла репликацию вируса ANDV. Внутриклеточный уровень нуклеокапсидного белка ANDV был ниже в p78-трансфицированных клетках Vero E6 по сравнению с клетками, трансфицированными плазмидой pEGFP-puro. Аналогично, внутриклеточный уровень РНК S-сегмента ANDV был в 10 раз ниже в клетках Vero E6, трансфицированных геном p78, по сравнению с клетками, трансфицированными плазмидой pEGFP-puro. Клетки Vero E6, трансфицированные плазмидой pEGFP-puro, поддерживали репликацию ANDV, при которой вирусные титры достигали 2×10^5 БОЕ/мл на 6-й день после инфицирования. Однако в клетках Vero E6/p78 репликация ANDV подавлялась, что проявлялось в снижении вирусного титра до 3×10^3 БОЕ/мл на 6-й день после инфицирования. Экспрессия белка p78

была обнаружена только в цитоплазме контрольных клеток HUVEC (Рисунок 2). В клетках HUVEC часть белка p78 сочеталась с эндоплазматической сетью (ЭПС), тогда как другая часть была неравномерно распределена в цитоплазме за пределами ЭПС. Кроме того, белок p78 не локализовался в комплексе Гольджи (КГ). Инкубация монослоев клеток HUVEC с антителами к нуклеокапсидному белку вируса PUUV и к белку p78 выявила колокализацию p78 и хантавирусного белка. В то же время локализация белка p78 не совпадала с локализацией хантавирусных гликопротеинов (Рисунок 3).

В ходе исследований была выявлена активация нуклеарных факторов в клетках, инфицированных хантавирусом. Известно, что PML может индуцироваться интерфероном и повышать вирусную резистенцию клеток организма (T. Regad et al., 2001). Поэтому было принято решение исследовать влияние хантавирусной инфекции на активацию PML в клетках HUVEC. Небольшое число и низкая интенсивность нуклеарных телец (англ. Nuclear bodies, NB), содержащих белок PML, обнаруживались в ложно-инфицированных клетках HUVEC через 72 часа после инфицирования (Рисунок 4). Однако число NB, содержащих белок PML, и интенсивность их окраски увеличивались в клетках HUVEC, инфицированных ANDV и HTNV, по сравнению с ложно-инфицированными клетками. Активация PML в инфицированных хантавирусом клетках HUVEC была дополнительно подтверждена с использованием иммуноблотинга и анализом пиксельной интенсивности флуоресценции.

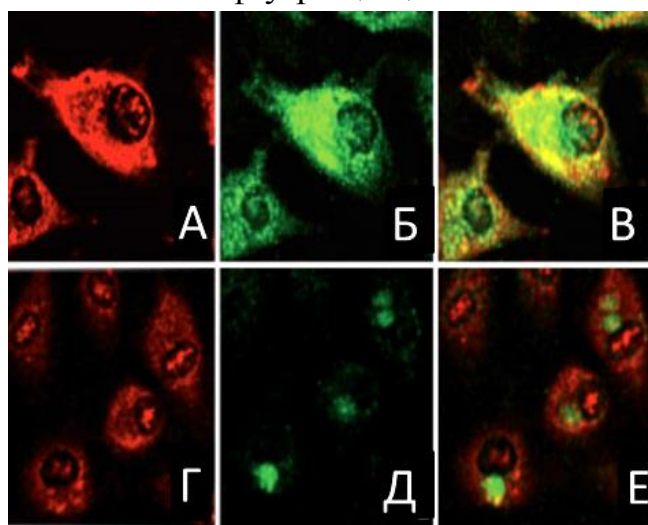


Рисунок 2 – Внутриклеточная локализация белка p78. Локализация белка p78 выявлялась с помощью антител к p78. Определение расположения ЭПС и КГ выявлялось с помощью антител к кальнексину (Affinity Bioreagents) и антител к белку 58К (Sigma), соответственно. А — белок p78 (красная флуоресценция Alexa555). Б — ЭПС (зеленая флуоресценция Alexa488); В — наложенные изображения А и Б; Г — белок p78 (зеленая флуоресценция Alexa488); Д — комплекс Гольджи (красная флуоресценция Alexa555); Е — наложенные изображения Г и Д.

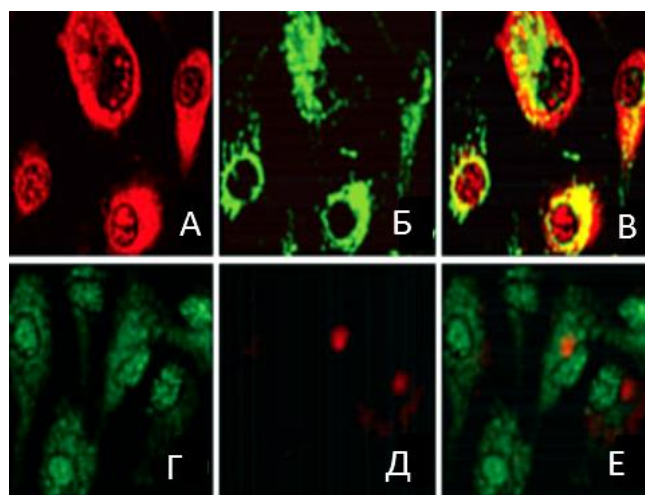


Рисунок 3 – Внутриклеточная локализация белков p78 и хантавирусных белков. Локализация белков p78, нуклеокапсидного белка и гликопротеинов G1/G2 хантавирусов выявлялась с помощью специфичных антител. А—белок p78 (красная флуоресценция Alexa555). Б— нуклеокапсидный белок вируса ANDV (зеленая флуоресценция Alexa 488); В — наложенные изображений А и Б. Г — белок p78 (зеленая флуоресценция Alexa 488); Д — гликопротеины G1/G2 вируса ANDV (красная флуоресценция Alexa555); Е — наложенные изображений Д и Е.

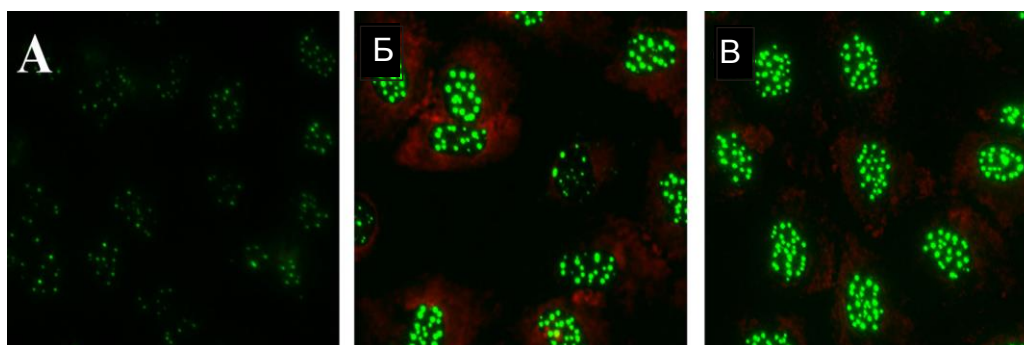


Рисунок 4 – Активация PML в клетках HUVEC, инфицированных вирусами ANDV и HTV. А — ложно-инфицированный монослой клеток HUVEC; В — монослой клеток HUVEC, инфицированных вирусом ANDV; С — монослой клеток HUVEC, инфицированных вирусом HTV.

Известно, что активация PML вызывает ядерную транслокацию S100 и DAXX и их ко-локализацию в нуклеарных тельцах NB. Поэтому мы решили выяснить, совпадает ли локализация PML с S100 и DAXX в инфицированных хантавирусом клетках HUVEC. Полученные результаты показали, что PML и S100 ко-локализовались в клетках HUVEC, инфицированных вирусами ANDV и HTNV (Рисунок 5).

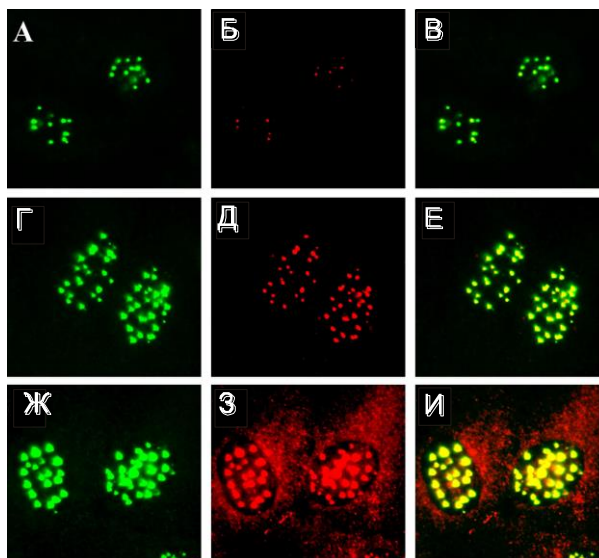


Рисунок 5 – Внутриклеточная локализация PML и SP100 в клетках HUVEC, инфицированных ANDV и HTV. А—PML в ложно-инфицированных клетках HUVEC; Б—SP100 в ложно-инфицированных клетках HUVEC; В— наложенные изображения А и Б; Г—PML в инфицированных ANDV клетках HUVEC; Д—SP100 в инфицированных ANDV клетках HUVEC; Е— наложенные изображения Г и Д; Ж—PML инфицированных HTV клетках HUVEC; З—SP100 в инфицированных HTV клетках HUVEC; И— наложенные изображения Ж и З.

В то же время PML был обнаружен преимущественно вокруг DAXX в инфицированных клетках HUVEC. Только небольшая часть PML была обнаружена тесно связанной с DAXX. Связь PML со многими индуцируемыми белками, включая ISG-20, является важным компонентом активности интерферона (С. Gongora et al., 1997). По этой причине было принято решение проверить, оказывает ли влияние хантавирусная инфекция на ядерную локализацию ISG-20 в клетках HUVEC. Было обнаружено, что инфицирование вирусами ANDV и HTNV усиливает экспрессию PML и ISG-20 в клетках HUVEC через 72 часа после инфицирования. Оба белка обнаруживались в ядре. Однако ISG-20 распределялся по всему ядру, а его распределение было лишь частично перекрывало распределение NB, содержащих белок PML (Рисунок 6). Кроме того, было показано, что хантавирусная репликация необходима для активации PML в клетках HUVEC.

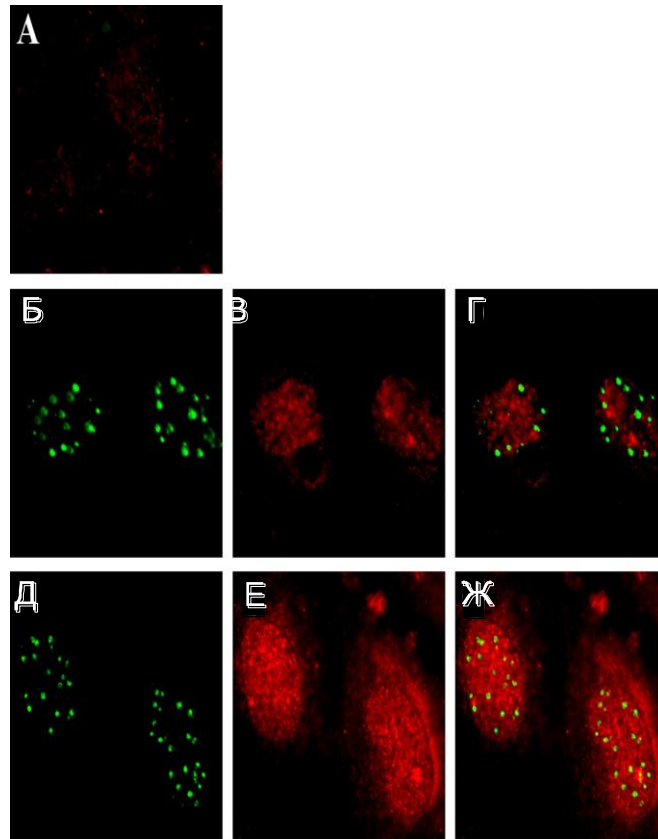


Рисунок 6 – Субклеточная локализация PML и ISG-20 в клетках HUVEC инфицированных ANDV и HTV. А — ISG-20 в ложно-инфицированных клетках HUVEC; Б — PML в инфицированных ANDV клетках HUVEC; В — ISG-20 в инфицированных ANDV клетках HUVEC; Г — наложенные изображения Б и В; Д — PML в инфицированных HTV клетках HUVEC; Е — ISG-20 в инфицированных HTV клетках HUVEC; Ж — наложенные изображения Д и Е.

Известно, что для нуклеарной транслокации PML требуется SUMO-модификации и их ко-локализация в NB. По этой причине было принято решение определить, подвергается ли PML SUMO-модификации в инфицированных хантавирусами клетках HUVEC. Показано, что PML локализовался в ядре клеток HUVEC, инфицированных ANDV. Однако выяснилось, что SUMO локализуется в цитоплазме инфицированных клеток HUVEC и его локализация не совпадает с PML. Используя реакцию иммунопреципитации было показано, что локализация нуклеокапсидного белка ANDV совпадала с локализацией SUMO в цитоплазме инфицированных клеток HUVEC.

Повышенные уровни ФНО- α в сыворотке больных ГЛПС описаны в многочисленных исследованиях, свидетельствуя о важной роли этого цитокина в патогенезе данного заболевания. Это предположение подкреплено также данными о том, что ФНО- α способен увеличивать проницаемость сосудов, что является краеугольным камнем в патогенезе ГЛПС. Поэтому было высказано предположение, что увеличение проницаемости сосудов и кровотечения, наблюдаемые у больных ГЛПС, могут быть

результатом действия про-воспалительных цитокинов. Однако разнообразие клинических симптомов трудно объяснить только активацией ФНО- α . Кроме того, нами и другими исследователями была показана *in vitro* активация множества цитокинов, ранее неизученных у больных ГЛПС. Поэтому были проведены эксперименты по изучению развернутого цитокинового профиля больных ГЛПС.

В ходе работы был проведен анализ цитокинового профиля у 29 больных ГЛПС (24 мужчины и 5 женщин). Средний срок госпитализации составил 15 день, а средняя продолжительность лихорадочного и олигурического периодов составила $4,5 \pm 1,2$ дней и $6,7 \pm 1,9$ дней, соответственно. Диагноз ГЛПС был основан на клинической картине, эпидемиологических данных и последующего серологического подтверждения. Сывороточные концентрации ИФН- γ , ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-10, ИЛ-8, ИЛ-12 (p70) и CCL2 цитокинов были изучены у больных ГЛПС в раннем и позднем периоде заболевания. Лихорадочная фаза болезни характеризуется значительно сниженными уровнями ИЛ-2 и ИЛ-12 (p70), в то время как уровни ИЛ-10 и CCL2 были значительно увеличены по сравнению с сыворотками здоровых людей. Во время фазы олигурии, сывороточные уровни ИЛ-2 и ИЛ-12 (p70) оставались значительно сниженными по сравнению со здоровым контролем. Однако концентрация ИЛ-10 и CCL2 продолжала увеличиваться в сыворотке и была выше той, что была зарегистрирована в лихорадочную фазу. Кроме того, уровни ИЛ-1 β оказались значительно сниженными, а уровень CXCL8 значительно увеличенным по сравнению с сывороткой здоровых людей. Сывороточные уровни ИЛ-2, ИЛ-12 (p70), ИЛ-10 и CCL2 не изменялись в фазу полиурии и оставались схожими с тем, что обнаруживалось в лихорадочный период. В период конвалесценции, сывороточные уровни ИФН- γ , ИЛ-10 и CCL2 были значительно увеличены, в то время как сывороточные уровни ИЛ-1 β и ИЛ-12 (p70) значительно снизились по сравнению со здоровыми людьми.

Наши данные свидетельствуют о том, что в ходе ГЛПС, происходят существенные изменения сывороточных уровней цитокинов и хемокинов, которые участвуют в регуляции воспаления и активации иммунной реакции. Дальнейший анализ сывороточных уровней цитокинов в сыворотках отобранных в фазу конвалесценции выявил наличие двух групп больных, различающихся по сывороточной концентрации ИФН- γ (Таблица 1).

Первая группа (группа 1) характеризуется повышением уровня ИФН- γ по сравнению со здоровым контролем ($1123,5 \pm 25$ против 20 ± 7 нг/мл, соответственно, $p \leq 0,0034$ Манн-Уитни), в то время как вторая группа (группа 2) характеризовалась уровнями ИФН- γ , ($12,3 \pm 5,1$) сопоставимыми с тем, что обнаруживалось в контроле. Повышение концентрации ИФН- γ обычно ассоциируется с активацией цитотоксических Т лимфоцитов (ЦТЛ). Кроме того, активация ЦТЛ сопровождается увеличением сывороточного ИЛ-12. Поэтому, было решено проанализировать наличие различий в сывороточных уровнях ИЛ-12 между группами 1 и 2. Изучение полученных результатов не выявило статистически значимых различий в уровнях ИЛ-12 между группами 1 и 2 ($p < 0,053$). Поэтому, мы приняли решение исследовать наличие различий в тяжести

заболевания между этими двумя группами больных ГЛПС. Группы 1 и 2 значительно отличались по всем отобраным параметрам. Длительность лихорадки и олигурической фазы болезни были значительно короче в группе 1 по сравнению с группой 2 ($p < 0,0245$ и $p < 0,0015$, соответственно). Кроме того, длительность госпитализации была значительно короче в группе 1 по сравнению с группой 2 ($p < 0,01938$). Далее, вторая группа больных характеризовалась более высокой частотой случаев кровотечений (80% против 0% в группе 1) и почечной недостаточностью (80% против 44,4% в группе 1).

Таблица 1 – Уровень цитокинов в сыворотке крови больных ГЛПС

Значения	Группа 1	Группа 2	Здоровый контроль
ИФН- γ р-значение	123,5 \pm 25 <0,0034* <0,02**	12,3 \pm 5,1 <0,001*	20 \pm 7
ИЛ-12(p75) р-значение	131,3 \pm 60,1 <0,1* <0,053**	29,8 \pm 40,2	352,2 \pm 28
Титр антител (1) р-значение	985,5 \pm 240 <0,4**	768,2 \pm 135,2	
Титр антител (2) р-значение	1874,7 \pm 256 <0,9**	1984,8 \pm 143	
Госпитализация (дни) р-значение	14,3 \pm 1,1 <0,019**	18,2 \pm 1,2	
Фебрильная фаза (дни) р-значение	3,9 \pm 1,2 <0,02**	5,6 \pm 0,5	
Олигурическая фаза (дни) р-значение	5,4 \pm 1,8 <0,002**	9,0 \pm 1,0	
Сывороточная мочевины р-значение	13,5 \pm 24,2 <0,004* <0,28**	116,2 \pm 79 <0,7*	66,3 \pm 20,3
Сывороточный креатинин р-значение	187,0 \pm 20,5 <0,05* <0,18**	293 \pm 98 <0,001*	5,2 \pm 2,1
Тромбоциты (1) р-значение	205 \pm 67 <0,5* <0,2**	77,2 \pm 79 <0,005*	283 \pm 45
Тромбоциты (2) р-значение	474,1 \pm 26 <0,02* <0,3**	406,4 \pm 158 <0,2*	283 \pm 45
Кровотечения	0/9 (0%)	4/5 (80%)	
Почечная недостаточность/эдема*	4/9 (44,4%)	4/5 (80%)	

*Р значения по сравнению с контролем

**Р значения между Группой 1 и Группой 2

Полученные данные позволяют предположить, что случаи ГЛПС характеризующиеся высокими уровнями сывороточного ИФН- γ и, как правило, имеют более мягкое течение заболевания и меньшую частоту серьезных осложнений. Поскольку длительность фазы олигурии является основным клиническим параметром, указывающим на повреждение почек, а также служит индикатором тяжести заболевания, мы предположили наличие корреляции между сывороточным ИФН- γ и продолжительностью олигурической фазы. Действительно, регрессионный анализ показал наличие значительной корреляции между ИФН- γ и продолжительностью фазы олигурии ($R^2 = 78,1\%$), таким образом, подтвердив правильность нашей гипотезы.

Далее, было решено проверить наличие корреляции между продолжительностью олигурической фазы и сывороточными уровнями ИЛ-12 (p70). Корреляция между олигурической фазой и уровнем ИЛ-12 (p70) была слабой ($R^2 = 38\%$). Однако, если корреляционный анализ проводился между продолжительностью олигурической фазы и уровнями ИФН- γ или ИЛ-12 (p70) то уровень корреляции значительно увеличивался ($R^2 = 84,7\%$). Эти данные позволяют предположить, что ИФН- γ и ИЛ-12 (p70) влияют на тяжесть заболевания, однако механизмы их активности, вероятно, различны.

Анализ механизмов низкой эффективности препарата Рибавирин при хантавирусной инфекции

В настоящее время не существует специфической терапии ГЛПС и хантавирусного легочного синдрома (ХЛС). Лечение, главным образом, симптоматическое и во многом опирается на врачебный опыт. С разной степенью успешности предпринимались попытки применения нескольких препаратов, включая ИФН- α , глюкокортикоиды и циклофосфамид (M. Martinuš Vergoč et al., 2013; J. Bai et al., 1997; C.J. Wang 1979). Терапия препаратом Рибавирин продемонстрировала снижение летальности только при назначении этого препарата на ранних стадиях ГЛПС (X.J. Wang 1988). Однако препарат Рибавирин неэффективен для лечения ХЛС на стадии развития сердечно-легочного поражения (С.В. Jonsson et al., 2008). В отсутствие эффективной терапии, лечение ГЛПС и ХЛС основывается на осторожной инфузионной терапии, мониторинге гемодинамики и контроле водно-электролитного баланса.

Изучение эффекта препарата Рибавирин на вирусную репликацию показало, что в инфицированных клетках, не подвергшихся воздействию препарата, уровень РНК S-сегмента вируса ANDV существенно повышался к 12-ти часам после инфицирования, достигая максимума к 24-м часам после инфицирования. Добавление препарата Рибавирин существенно снижало уровни РНК S-сегмента ANDV к 12-и, 24-м и 72-м часам после инфицирования. Снижение уровня вирусной РНК не было связано с цитотоксичным действием препарата.

Как было показано ранее, хантавирусная инфекция активирует транскрипцию гена CCL5 в клетках HUVEC. Поэтому было проведено исследование влияния препарата Рибавирин на активацию транскрипции гена CCL5 в HUVEC, инфицированных вирусом

ANDV, с использованием метода ПЦР-РВ. Препарат Рибавирин существенно снижал уровень мРНК гена CCL5 в клетках, инфицированных ANDV, через 12, 24 и 72 часа после инфицирования по сравнению с инфицированными клетками, не обработанными препаратом. Препарат Рибавирин в сочетании с ФНО- α существенно снижал уровень мРНК гена CCL5 только к 72-м часам после инфицирования вирусом ANDV по сравнению с инфицированными клетками, обработанными только ФНО- α . Изменений в уровне мРНК гена ИЛ-6 не наблюдалось в клетках, инкубированных в присутствии препарата Рибавирин и ФНО- α . Поэтому полученные данные указывают на то, что препарат не способен подавлять стимулированную ФНО- α активацию CCL5 и ИЛ-6 в клетках HUVEC, инфицированных вирусом ANDV.

Известно, что NF- κ B регулирует активацию генов CCL5 и ИЛ-6 (J. Pękalski et al., 2013; T. Nomma et al., 2010). Поэтому было принято решение определить статус активации NF- κ B в ответ на ФНО- α и/или инфицирование ANDV. В экспериментах связывание ядерных белков с олигонуклеотидами, кодирующими сайты связывания NF- κ B, оставалось повышенным в клетках HUVEC, инфицированных ANDV и обработанных ФНО- α и препаратом Рибавирин. Таким образом, несмотря на то, что препарат Рибавирин существенно снижает вирусную репликацию, препарат не способен ингибировать внутриклеточную активацию цитокинов в инфицированных клетках. Как следствие, патологические изменения в тканях продолжают нарастать, приводя к поражению эндотелиальной проницаемости и нарушению работы почек.

Получение и исследование реассортантных хантавирусов

Реассортация геномных сегментов является одним из способов, используемых сегментированными вирусами для достижения высокой инфекционности и адаптации к новым организмам-хозяевам (L.M. Chen et al., 2008; S.C. Weaver 2006). Этот механизм продемонстрирован на примере феномена антигенных сдвигов вируса гриппа, приводящего к глобальным эпидемиям и пандемиям (I. York and R.O. Donis 2013; E.D. Kilbourne et al., 2002). В наших исследованиях была поставлена задача определить возможность реассортации между патогенными вирусами SNV и ANDV *in vitro*, проанализировали частоту рекомбинации и провести генетический анализ вирусного потомства.

Для получения рекомбинантных вирусов, клетки Vero E6 инфицировали вирусами ANDV и SNV с высокой множественностью инфицирования (MOI 3). Нами было исследовано 337 вирусных бляшек на наличие вирусных реассортаций между ANDV и SNV. Среди изученных бляшек реассортантные генотипы были выявлены в 30 бляшках (8,9% от общего числа изученных бляшек). Большая часть дочерних бляшек сохранила родительский генотип ANDV (281 бляшка) и SNV (26 бляшек). Был выявлен только один моноплоидный тип реассортированного генома. Этот реассортант содержал S- и L-сегменты от вируса SNV и M-сегмент от вируса ANDV. Было обнаружено всего 10 бляшек с подобным генотипом. Большая часть бляшек содержала диплоидные S, M или L-

сегменты от обоих родительских штаммов (всего 20 бляшек). Эти результаты согласуются с ранее опубликованными результатами Rodriguez с соавт. (L.L. Rodriguez et al., 1998). Для подтверждения получения реассортанта был проведен иммуногистохимический анализ с применением специфичных антител к гликопротеинам G2 вирусов ANDV и SNV. В подтверждении молекулярно-генетических данных, реассортантный клон VI.1 показал иммунореактивность к гликопротеину G2 вируса Андес (Рисунок 7).

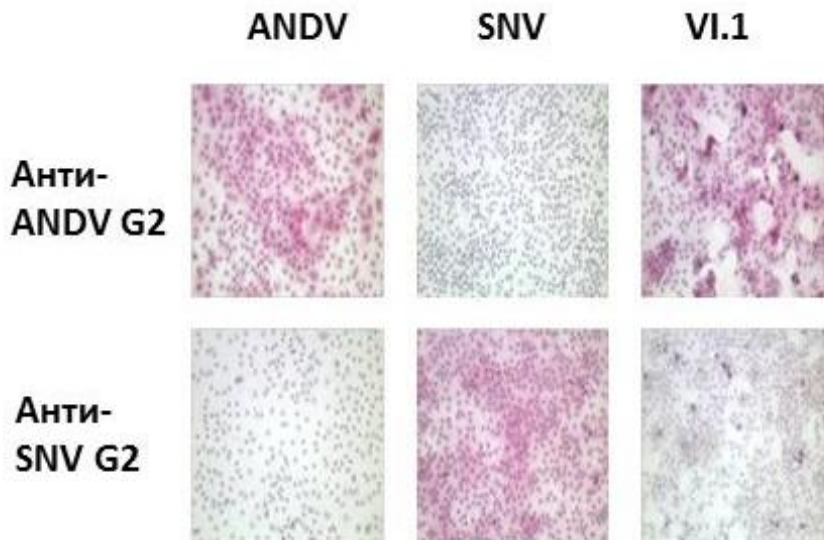


Рисунок 7 – Иммуногистохимический анализ родительских штаммов ANDV и SNV, а также реассортантного вируса VI.1. Монослой клеток Vero E6, инфицированных вирусами AND, SNV или VI.1, после фиксации инкубировали с антителами к гликопротеину G2 вируса AND или SNV. Затем препараты инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с щелочной фосфатазой. Окраску проводили с использованием набора Alkaline Phosphatase Substrate KIT I kit (Vector).

В наших экспериментах рекомбинантный генотип между SNV и ANDV образовывался в 8,9% случаев. После второго цикла селекции сохранился только один моноплоидный генотип, содержащий S- и L-сегменты от родительского штамма SNV и M-сегмент от ANDV. Эти результаты, по видимому, указывают на важность сохранения S- и L-сегментов от одного родительского штамма.

ОБСУЖДЕНИЕ

Хантавирусы вызывают ГЛПС и ХЛС — заболевания, клинически характеризующиеся острым началом и симптомами повышенной эндотелиальной проницаемости. Несмотря на значительные усилия, патогенез этих заболеваний остается неизвестным. В работе были проведены исследования по выявлению внутриклеточных механизмов взаимодействия вирусов с белками клеток хозяина. Изучение влияния вирусной репликации на транскрипционную активность клеток выявило различия в активации экспрессии клеточных генов в клетках, инфицированных патогенными и

непатогенными хантавирусами, где в целом SNV индуцировал в 5 раз больше генов, чем непатогенный PHV. Одной из самых интригующих находок было увеличение экспрессии ИИГ в инфицированных хантавирусом эндотелиальных клетках. Патогенные и непатогенные хантавирусы были сопоставимы в отношении индукции ИИГ. Причем эта активация происходила без увеличения экспрессии ИФН- β . Недавно было показано, что активация некоторых IRF не требует стимуляции ИФН- β и может индуцироваться только вирусной инфекцией (S.J. Baigent et al., 2002; M. Yoneyama et al., 1998).

Нами показано, что экспрессия трех IRF [IFR7, IRF-1 и IRF-9 (ISGF-3)] активировалась в инфицированных хантавирусами клетках. Интересно, что экспрессия всех факторов была выше в клетках, инфицированных SNV, по сравнению с клетками, инфицированными PHV. Была выявлена повышенная транскрипция генного кластера CC хемокинов. Этот кластер включает ген CCL5, основной функцией которого является привлечение мононуклеарных иммунных эфффекторов к месту воспаления (T. Kawai et al., 1999; T.J. Schall et al., 1990). CCL5 не оказывает прямого влияния на проницаемость эндотелия. Потому вклад этого хемокина в патогенез хантавирусной инфекции, вызывающей повышение сосудистой проницаемости, может быть опосредованным через усиление миграции иммунных эфффекторов через эндотелиальный монослой. Таким образом, мы полагаем, что хантавирусная инфекция может избирательно индуцировать миграцию мононуклеарных иммунных эфффекторов в инфицированные ткани. Это предположение подтверждается результатами исследования тканей от смертельных случаев ХЛС, где интерстициальная пневмония сочеталась преимущественно с мононуклеарно-клеточной инфильтрацией (M. Mori et al., 1999; S. Zaki et al., 1995). Можно с уверенностью сказать, что миграция лейкоцитов через сосудистый эндотелий, вызванная высокой концентрацией CCL5, способна нарушать целостность эндотелия, увеличивая его проницаемость.

Было обнаружено, что хантавирусный нуклеокапсидный белок локализуется в цитоплазме, а точнее в перинуклеарной области клетки, и, что самое важное, ко-локализуется совместно с белком p78. Кроме того, было продемонстрировано, что белок p78 не ко-локализуется с хантавирусными гликопротеинами. Эти результаты указывают на то, что хантавирусные гликопротеины с меньшей вероятностью являются мишенью для p78. Кроме того, белок p78 не обнаруживается в КГ, позволяя предположить, что КГ не является местом ко-локализации p78 и нуклеокапсидного белка.

Широко известна роль белка PML в регуляции клеточного роста, дифференцировке гемопоэтических клеток, канцерогенезе и апоптозе (Z.M. Mu et al., 1997; Z.G. Wang et al., 1998). В норме PML локализуется в NB, расположенных в клеточном ядре (K.L. Borden, 2002). Предполагается, что белок PML, содержащийся в NB, способен участвовать в процессах пост-трансляционной модификации ядерных белков (Z.G. Wang et al., 1998; S. Grisendi et al., 2005). Полученные данные указывают на активацию PML в клетках HUVEC, инфицированных хантавирусом *in vitro*. Результаты исследования указывают на

новый механизм активации клеточных ответов в инфицированных хантавирусами клетках, дополнительно к уже известным путям, связанным с активацией NF- κ B и IRF-3 (J.B. Sundstrom et al., 2001). Кроме того, полученные данные показывают, что при хантавирусной инфекции активируются белки NB, расположенные в ядре клетки. Это происходит даже несмотря на то, что транскрипция и репликация вирусов происходит исключительно в цитоплазме. Усиление экспрессии PML в инфицированных хантавирусом клетках требует репликации хантавируса и, что особенно важно, синтеза хантавирусных белков.

Локализация PML совпадает с локализацией SP100 в NB клеток HUVEC, инфицированных хантавирусом. Белок SP100 является фактором регуляции транскрипции и компонентом NB (A.I. Lamond and W.C. Earnshaw 1998; J. Seeler et al., 1998). SP100 взаимодействует с белком гетерохроматина 1 (HP1), который действует как репрессор транскрипции (J. Seeler et al., 1998). Таким образом, можно предположить, что ко-локализация SP100 с PML в NB, позволяет белку SP100 участвовать в регуляции транскрипционной активности в ядре клеток HUVEC, инфицированных хантавирусом. Далее, было показано, что усиление экспрессии PML в инфицированных хантавирусом клетках не увеличивает его модификацию белком SUMO. Кроме того, полученные данные демонстрируют, что усиление экспрессии PML не сопровождается его ко-локализацией с DAXX. Известно, что SUMO-1 модификация необходима для ко-локализации PML и DAXX. Также известно, что локализация DAXX в NB коррелирует с апоптотической активностью DAXX (S. Torii et al., 1999). Эти данные показывают, что DAXX и PML, в случае ко-локализации в NB, способны вызывать апоптоз. Нами и другими исследователями было показано, что хантавирусная инфекция не вызывает апоптоз в клетках HUVEC (S.F. Khaiboullina et al., 2000; S.F. Khaiboullina et al., 2004; J.B. Sundstrom et al., 2001; M.N. Pensiero et al., 1992). Полученные результаты позволяют предположить, что хантавирусы не вызывают апоптоз в инфицированных клетках HUVEC, поскольку усиление экспрессии PML не сопровождается SUMO модификацией, таким образом, предотвращая локализацию DAXX в NB. Для изучения этой гипотезы требуются дополнительные исследования.

Полученные данные показали, что хантавирусная инфекция активирует транскрипцию гена ISG-20 в инфицированных хантавирусом клетках HUVEC. ISG-20 — интерферон-индуцируемый белок, тесно связанный с PML в NB (C. Gongora et al., 1997). Было показано, что экспрессия ISG-20 усиливается при инфицировании хантавирусами клеток HUVEC. Кроме того, обнаружено, что ISG-20 локализуется в ядре и тесно связан с PML. ISG-20 является РНКазой и подобно РНКазе L регулируется интерфероном (L.H. Nguyen et al., 2001; L. Espert et al., 2003). Также показано, что хантавирусная инфекция активирует p78, еще один интерферон-индуцируемый белок, в клетках HUVEC (S.F. Khaiboullina et al., 2005).

Принято считать, что патогенез ГЛПС обусловлен «цитокиновым штормом». Это утверждение основано на значительном количестве публикаций, указывающих на высокие сывороточные уровни про-воспалительных цитокинов у больных ГЛПС (W. Fan et al., 2012; T. Krakauer et al., 1995). В настоящем исследовании мы обнаружили повышенные уровни CXCL8 и ИЛ-10 в сыворотке ГЛПС по сравнению со здоровыми донорами. Сывороточные уровни ИЛ-2 были снижены на ранней стадии заболевания, однако, к концу заболевания ИЛ-2 повышался в сыворотке больных, превосходя значения у здоровых доноров. Таким образом, наши данные согласуются с уже опубликованными исследованиями, свидетельствующими об активации воспалительных цитокинов в сыворотке больных ГЛПС. Детальный анализ активации ИФН- γ и ИЛ-12 при ГЛПС выявил 2 группы больных, которые различались по сывороточному уровню ИФН- γ . В итоге, мы обнаружили, что больные с высоким уровнем в ИФН- γ сыворотке имели значительно более короткий период госпитализации и продолжительность лихорадочной и олигурической фаз заболевания.

Несмотря на высокую эффективность препарата Рибавирин против многих РНК-вирусов *in vitro*, клинически эффективность препарата подтверждена только в лечении хронического гепатита С и инфекции, вызванной респираторно-синцитиальным вирусом (W.E. Severson et al., 2003; V. Meier et al., 2003; J.W. Huggins et al., 1991). Очевидно, что прямая противовирусная активность препарата Рибавирин оказывает небольшой вклад в клиническую эффективность препарата (E. De Clercq 2004). Таким образом, предполагается, что механизм терапевтической эффективности препарата может включать его иммуномодулирующие свойства (J.F. Hruska et al., 1980).

Было показано, что препарат Рибавирин подавляет репликацию вируса AND в эндотелиальных клетках *in vitro*. Однако, препарат Рибавирин не способен подавить опосредованную ФНО- α активацию CCL5 и ИЛ-6 в эндотелиальных клетках, инфицированных вирусом ANDV. Сделано предположение, что опосредованная ФНО- α активация NF- κ B приводит к усилению экспрессии ИЛ-6 и CCL5 в эндотелиальных клетках, инфицированных вирусом ANDV. Хотя препарат Рибавирин подавляет репликацию вируса ANDV *in vitro*, препарат не оказывает влияния на активацию NF- κ B, вызванную ФНО- α , которая поддерживает транскрипционную активацию ИЛ-6 и CCL5.

ВЫВОДЫ

1. Инфекция вирусами SNV и PHV приводит к различным изменениям транскрипционной активности в эндотелиальных клетках человека. Инфицирование клеток патогенным хантавирусом SNV приводила к изменению экспрессии 20 интерферон-индуцированных генов, 17 факторов транскрипции и 35 генов, связанных с клеточным ростом и апоптозом. Инфицирование клеток непатогенным хантавирусом PHV приводила к изменению экспрессии 17 интерферон-индуцированных генов, 4 факторов транскрипции и 3 генов, связанных с клеточным ростом и апоптозом. При

инфицировании хантавирусами наблюдалась активация транскрипции кластера генов, кодирующих хемокины.

2. В клетках, инфицированных патогенными вирусами ANDV или HTNV, происходит нуклеарная транслокация ядерного транскрипционного фактора PML, сопровождающаяся ко-локализацией PML и белка S100 в ядрах клеток. Белок DAXX располагается вне комплекса PML-S100, что объясняет отсутствие цитопатического эффекта вирусов на инфицированные клетки.

3. Инфекция патогенным SNV и непатогенным PHV вирусами активирует интерферон-индуцированные гены (ИИГ) в эндотелиальных клетках человека. Активация ИИГ обусловлена транслокацией IRF3 в клеточное ядро.

4. Репликация патогенного хантавируса ANDV обратно пропорциональна активации p78 — одного из представителей семейства ИИГ. Механизм антивирусной активности белка p78 опосредован связыванием с нуклеокапсидным белком хантавируса.

5. Хантавирусная инфекция характеризуется повышенным уровнем CXCL8, ИЛ-10, CCL2, ИЛ-12 и ИФН γ в сыворотке крови больных ГЛПС. Кроме того, корреляционный анализ выявил, что активация ИЛ-12 и ИФН γ была наиболее выражена у больных с легкой формой заболевания, что указывает на роль цитотоксических лимфоцитов в патогенезе хантавирусной инфекции у человека. Повышенное содержание хемокина CCL2 в сыворотке крови больных ГЛПС может объяснить увеличение миграции мононуклеарных лейкоцитов в инфицированные хантавирусом ткани у больных.

6. Препарат Рибавирин подавляет вирусную репликацию в эндотелиальных клетках человека. Ингибирование вирусной репликации сопровождалось снижением активации хемокина CCL5 в инфицированных клетках. Однако, препарат Рибавирин не влияет на активацию цитокинов в клетках, инфицированных хантавирусом в присутствии ФНО- α , что может объяснять низкую эффективность препарата Рибавирин при лечении больных ГЛПС.

7. Продемонстрирована принципиальная возможность получения хантавирусных реассортантов между патогенными штаммами ANDV и SNV, циркулирующими в различных видах грызунов. Наиболее стабильными являются реассортантные хантавирусы, имеющие S и L сегменты вируса SNV и M сегмент вируса ANDV.

Список основных публикаций по теме диссертации:

1. Khaiboullina, S.F. Effects of TNF-alpha on Sin Nombre virus infection *in vitro* / **S.F. Khaiboullina**, D.M. Netski, P. Krumpke [et al.] // J. Virol. – 2000. – V.74. – P.11966-11971.
2. Khaiboullina S.F. Hantavirus immunology / **S.F. Khaiboullina**, S.C. St. Jeor // Viral Immunol. – 2002. – V.15. – P.609-625.
3. Khaiboullina S.F. Regulation of cellular gene expression in endothelial cells by sin nombre and prospect hill viruses / **S.F. Khaiboullina**, A. Rizvanov, E. Otteson [et al.] // Viral Immunology. – 2004. – V.17. – P.234-251.

4. Rizvanov A.A. Development of reassortant viruses between pathogenic hantavirus strains / A.A. Rizvanov, **S.F. Khaiboullina**, S.C. St. Jeor // *Virology*. – 2004. – V.327. – P.225-232.
5. Khaiboullina S.F. Hantaviruses: molecular biology, evolution and pathogenesis / **S.F. Khaiboullina**, S.P. Morzunov, S.C. St. Jeor // *Current Molecular Medicine*. –2005. – V.5. – P.773-790.
6. Khaiboullina S.F. Andes virus stimulates interferon-inducible mxa protein expression in endothelial cells / **S.F. Khaiboullina**, A.A. Rizvanov, V.M. Deyde [et al.] // *J. Med. Virol.* –2005. –V.75. –P.267-275.
7. Rizvanov A.A. Analysis of recombinant and wild type *Peromyscus maniculatus* cytomegalovirus infection *in vitro* and *in vivo* using Real-Time PCR / A.A. Rizvanov, **S.F. Khaiboullina**, A.G.M. van Geelen [et al.] // *Vaccine*. – 2006. – V.24. – P.327-334.
8. Khaiboullina S.F. Yellow fever virus strains Asibi and 17d-204 infect human umbilical cord endothelial cells and induce novel changes in gene expression / **S.F. Khaiboullina**, A.A. Rizvanov, M.R. Holbrook [et al.] // *Virology*. – 2005. – V.342. – P.167-176.
9. Rizvanov A.A. Replication and immunoactivity of the recombinant *Peromyscus maniculatus* cytomegalovirus expressing hantavirus G1 glycoprotein *in vivo* and *in vitro* / A.A. Rizvanov, **S.F. Khaiboullina**, A.G.M. van Geelen [et al.] // *Vaccine*. – 2006. – V.24. – P.327-34.
10. Khaiboullina S.F. Andes-virus-induced cytokine storm is partially suppressed by ribavirin / **S.F. Khaiboullina**, A.A. Rizvanov, V.C. Lombardi [et al.] // *Antivir. Ther.* – 2013. – V.18. – P.575-84.
11. Khaiboullina S.F. Death-domain associated protein-6 (DAXX) mediated apoptosis in hantavirus infection is counter-balanced by activation of interferon-stimulated nuclear transcription factors / **S.F. Khaiboullina**, Morzunov S.P., Boichuk S.V. [et al.] // *Virology*. –2013. – V.443 – P.338-348.
12. Khaiboullina S.F. Upregulation of IFN- γ and IL-12 is associated with a milder form of hantavirus hemorrhagic fever with renal syndrome / **S.F. Khaiboullina**, E.V. Martynova, Z.L. Khamidullina [et al.] // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* –2014. – V.33. – P.2149-56.
13. Khismatullina N.A. Epidemiological dynamics of Nephropatia epidemica in the Republic of Tatarstan, Russia, during the period of 1997-2013 / N.A. Khismatullina, M.M. Karimov, K.S. Khaertynov, E.A. Shuralev, S.P. Morzunov, I.M. Khaertynova, A.A. Ivanov, I.V. Milova, M.B. Khakimzyanova, G. Sh. Sayfullina, A.A. Gaynullin, A.V. Ivanov, A.A. Rizvanov, **S.F. Khaiboullina** // *Epidemiology and Infection*. – 2015. – DOI: 10.1017/S0950268815001454.

Список сокращений

ANDV	—	вирус Андес (от англ. Andes virus)
DAXX	—	белок, ассоциированный с доменом Death (от англ. Death-associated protein)
DMEM	—	среда Игла, модифицированная по методу Дульбекко (от англ. Dulbecco's modified Eagle's medium)
FBS	—	сыворотка крови плодов коровы (от англ. fetal bovine serum)

GFP	—	зеленый флуоресцентный белок (от англ. green fluorescent protein)
HTV	—	вирус Хантаан (от англ. Hantaan)
HUVEC	—	эндотелиальные клетки вен пупочного канатика (от англ. human umbilical vein endothelial cells)
IRF	—	интерферон-регулирующий фактор (от англ. interferon regulatory factor)
ISG-20	—	интерферон-индуцируемый ген 20 (от англ. interferon-stimulated gene)
MMA	—	монометил-L-аргинина
MOI	—	множественность инфицирования (от англ. multiplicity of infection)
MPIF	—	миелоидный предшественник ингибирующего фактора (от англ. Myeloid progenitor inhibitory factor)
MxA	—	белок резистентности к миксовирусу (от англ. Mxovirus resistance protein)
ORF	—	открытая рамка считывания (от англ. open reading frame)
PHV	—	вирус Проспект Хилл (от англ. prospect Hill virus)
PML	—	промиелоцитарный лейкоз (от англ. promyelocytic leukemia)
PUUV	—	вирус Пуумала (от англ. Puumala virus)
SNV	—	вирус Син Номбре (от англ. Sin Nombre virus)
ВГЛ	—	вирусные геморрагические лихорадки
ГЛПС	—	геморрагической лихорадки с почечным синдромом
ДНК	—	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИИГ	—	интерферон-индуцированные гены
ИЛ	—	интерлейкин
ИФА	—	иммуноферментный анализ
ИФН	—	интерферон
КТ	—	комплекс Гольджи
кДа	—	килодальтон
кДНК	—	комплементарная ДНК
мРНК	—	матричная РНК
ПЦР	—	полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	—	полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
РНК	—	рибонуклеиновая кислота
ФБС	—	фосфатно-солевой буфер
ФНО- α	—	фактор некроза опухоли альфа
ХЛС	—	хантавирусный легочный синдром
ЦТЛ	—	цитотоксические Т- лимфоциты
ЭПС	—	эндоплазматическая сеть