



УДК 577.113.6:546.82431+578.832.1:578.282

ЭФФЕКТИВНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ ВИРУСА ГРИППА А ЧЕЛОВЕКА ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМИ, ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИ ФИКСИРОВАННЫМИ НА ПОЛИЛИЗИНСОДЕРЖАЩИХ TiO₂-НАНОЧАСТИЦАХ

© 2014 г. А. С. Левина*, М. Н. Репкова*, З. Р. Исмагилов**,
Н. В. Шикина**, Н. А. Мазуркова***, В. Ф. Зарытова*.*

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины, СО РАН, 630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8

**Институт катализа СО РАН, Новосибирск

***Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор", Новосибирская обл., пос. Кольцово

Поступила в редакцию 14.08.2013 г. Принята к печати 14.10.2013 г.

На культуре клеток MDCK, инфицированных вирусом гриппа А человека (подтип H3N2), исследована противовирусная активность нанобиокомпозитов TiO₂•PL•DNA, в которых DNA-фрагменты электростатически связаны с наночастицами диоксида титана с предварительно иммобилизованным полилизинном (PL). Показано, что TiO₂•PL•DNA(v3') – нанобиокомпозит, несущий фрагмент DNA(v3'), направленный к 3'-концу некодирующей области сегмента 5 вирусной vRNA, при низкой концентрации DNA(v3') в составе нанобиокомпозита, равной 0.1 и 0.2 мкМ, эффективно и специфично подавляет репродукцию вируса на 99.8 и 99.9% (т.е. в ~400 и 1000 раз) соответственно. Олигонуклеотид DNA(v3'), не связанный с наночастицами, или нанобиокомпозит TiO₂•PL•DNA(r), несущий олигонуклеотид, некомплементарный вирусной RNA, проявляют низкую активность (подавление репродукции в 1.3 или ~3.5 раза соответственно).

Ключевые слова: наночастицы, нанокмозиты, DNA-фрагменты, сайт-специфическое действие, вирус гриппа.

DOI: 10.7868/S0132342314020092

ВВЕДЕНИЕ

Вирусы гриппа, относящиеся к семейству Orthomyxoviridae, широко распространены в природе и часто являются причиной возникновения пандемий. Они поражают млекопитающих, в том числе людей, а также птиц. Геном вируса гриппа А представлен восемью одноцепочечными сегментами RNA отрицательной полярности, каждый из которых кодирует 1–2 вирусных белка: гемагглютинин (HA), нейраминидазу (NA), три субъединицы РНК-зависимой РНК-полимеразы (PB1, PB2 и PA), нуклеопротеин (NP), матричный белок (M1), мембранный белок (M2) и неструктур-

ные белки (NS1 и NS2) [1, 2]. Гемагглютинин и нейраминидаза несут антигенные детерминанты вируса гриппа и определяют его подтипы (H5N1, H3N2, H1N1 и т.д.).

При поддержке американского Управления по продовольствию и медикаментам (Food and drug administration) были разработаны лекарственные средства на основе низкомолекулярных соединений – ингибиторы мембранного белка M2 (амантадин и ремантадин) и нейраминидазы (озельтамивир-тамифлю, занамивир-реленза). В последнее время отмечается, что ингибиторы нейраминидазы могут вызывать психические расстройства и быть малоэффективными, если лечение начато на вторые-третьи сутки [3]. Кроме того, геном вируса гриппа А постоянно подвергается точечным мутациям и рекомбинации сегментов, что приводит к появлению новых штаммов вируса, устойчивых к созданным лекарственным препаратам. Поэтому разработка новых эффективных лекарственных форм, селективно действующих на вирусы гриппа А, до сих пор остается актуальной проблемой.

Сокращения: PL – поли-L-лизин; vRNA – исходная вирусная RNA; mRNA – матричная РНК, комплементарная исходной vRNA; cRNA – реплицированная RNA, комплементарная vRNA; DNA(v3') – олигонуклеотид, комплементарный 3'-некодирующей области сегмента 5 vRNA; DNA(c5') – олигонуклеотид, комплементарный 5'-некодирующей области cRNA и mRNA; DNA(r) – олигонуклеотид со случайной последовательностью; префикс d в обозначении олигодезоксинуклеотидов опущен.

#Автор для связи (тел.: +7 (383) 363-51-24, эл. почта: zarytova@niboch.nsc.ru).

В последние годы серьезное внимание уделяется созданию фармацевтических препаратов нового поколения на основе фрагментов нуклеиновых кислот. При разработке методов эффективного и селективного воздействия на внутриклеточные нуклеиновые кислоты-мишени, как правило, используют фрагменты РНК или ДНК, их аналоги, ДНКзимы, РНКзимы, аптамеры, малые интерферирующие РНК (siRNA), продуценты малых РНК. Все эти соединения способны узнавать определенные последовательности генов или мРНК и блокировать их функции в клетке или в составе целого организма. Поскольку препараты на основе НК направлены на определенную мишень, они способны селективно воздействовать на генетический материал клетки, и, таким образом, должны обладать максимальной эффективностью с минимумом побочных эффектов.

Известно, что фрагменты НК и их аналогов сами по себе обладают весьма низкой эффективностью проникновения в клетки. Для их доставки клетки подвергаются дополнительной обработке специальными химическими препаратами (трансфекционными агентами) или физическому воздействию (например, электропорации).

В последние несколько лет появилось огромное число публикаций, описывающих различные системы доставки фрагментов нуклеиновых кислот в клетки (см. обзоры [4–6]), в том числе использование неорганических наночастиц [7–10]. Ранее для доставки фрагментов ДНК в клетки мы предложили использовать нанокompозиты на основе наночастиц диоксида титана [11, 12], которые, как известно, проникают в эукариотические клетки [13, 14]. Диоксид титана широко используется в медицине как биосовместимый материал [15]. Недавние исследования показали, что TiO_2 -наночастицы в относительно низких дозах (до 200 мкг/мл) проявляют лишь незначительную токсичность в отношении клеток [16], бактерий [17], и животных [18]. Показано, что используемые в настоящей работе TiO_2 -наночастицы малотоксичны, и при их воздействии на клетки MDCK не превышает уровень естественной гибели клеток [19].

Для доставки фрагментов DNA в клетки с помощью TiO_2 -наночастиц мы предложили использовать нековалентную фиксацию олигонуклеотидов на наночастицах и разработали несколько способов получения нанокompозитов на основе TiO_2 -наночастиц, содержащих DNA-фрагменты [20]. В том числе был предложен метод получения нанокompозитов $\text{TiO}_2 \bullet \text{PL} \bullet \text{DNA}$, где фрагменты DNA были электростатически фиксированы на наночастицах, покрытых полилизиним. С использованием метода конфокальной лазерной сканирующей микроскопии было показано, что полученные нанокompозиты проникают в клетки

без привлечения специальных трансфекционных агентов или физических методов воздействия [20]. Далее необходимо было ответить на ключевой вопрос – способны ли олигонуклеотиды, будучи доставленными в клетки, взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами-мишенями как антисенс-реагенты.

Целью настоящей работы является исследование способности DNA-фрагментов, электростатически фиксированных на наночастицах $\text{TiO}_2 \bullet \text{PL}$ и доставленных в клетки составе нанокompозитов вида $\text{TiO}_2 \bullet \text{PL} \bullet \text{DNA}$, эффективно и специфично взаимодействовать с внутриклеточными нуклеиновыми кислотами-мишенями. Исследование выполнено на примере подавления вируса гриппа А человека (H3N2) в инфицированных клетках MDCK.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор DNA-фрагментов для воздействия на геном вируса гриппа А

Геном вируса гриппа А содержит 8 одноцепочечных RNA-сегментов отрицательной полярности (vRNA). После заражения клеток вирусом гриппа вирусные vRNA транскрибируются в mRNA и реплицируются в комплементарные cRNA положительной полярности (рис. 1) [21].

В качестве мишени мы выбрали сегмент 5, кодирующий нуклеопротеин (NP), который играет ключевую роль в инкорпорации вирусного генома в клеточные ядра инфицированного организма и, тем самым, способствует дальнейшей репликации и сборке вирусных частиц [22]. Необходимо отметить, что такой выбор мишени подкреплен литературными данными. В работе [23] была исследована противовирусная активность двадцати siRNA, адресованных к шести сегментам вирусного генома (PB1, PB2, PA, NP, M и NS). Одна из исследованных siRNA, комплементарная консервативному участку гена NP, показала наибольшую противовирусную активность. Среди морфолиновых аналогов олигонуклеотидов (содержащих морфолиновое кольцо вместо дезоксирибозы) наиболее эффективным был фрагмент, направленный на 3'-некодирующий участок сегмента 5 vRNA [24].

В качестве DNA-фрагментов были выбраны олигонуклеотид $\text{DNA}(v3')$ (табл. 1), комплементарный 3'-некодирующей области сегмента 5 исходной цепи vRNA, и олигонуклеотид $\text{DNA}(c5')$, комплементарный $\text{DNA}(v3')$ и, соответственно, 5'-некодирующей области cRNA и mRNA. Локализация выбранных DNA-фрагментов на сегменте 5 вирусного генома представлена на рис. 1. В качестве контрольного фрагмента использовали олигонуклеотид $\text{DNA}(r)$ со случайной последовательностью. Последовательности исследованных

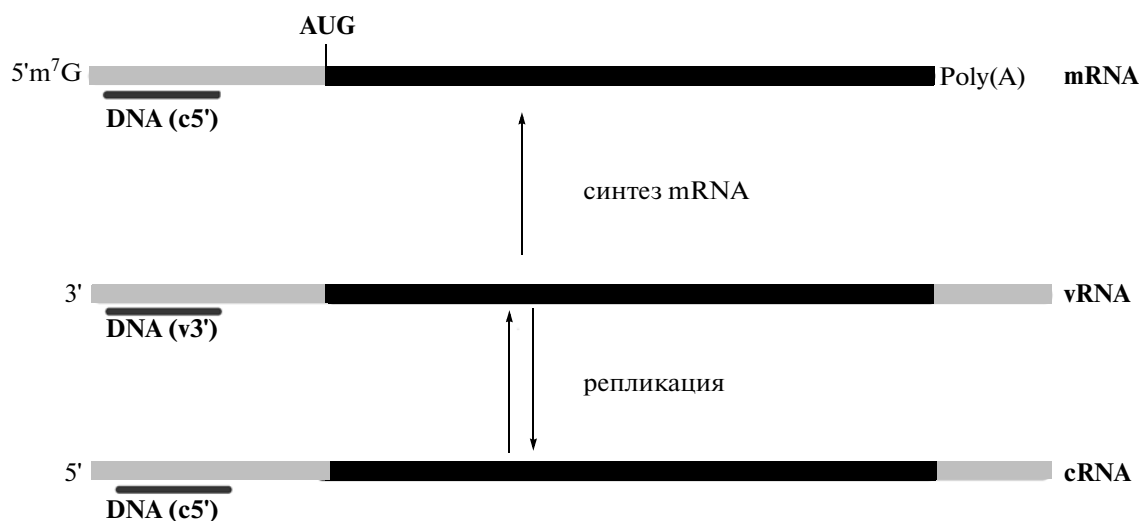


Рис. 1. Локализации исследуемых DNA-фрагментов на сегменте 5 вирусного генома. AUG – инициирующий кодон для трансляции гена NP.

в данной работе олигонуклеотидов приведены в табл. 1.

Используя ранее описанный способ получения $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{DNA}$ -наноконпозитов [20], DNA-фрагменты иммобилизовали на $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL}$ -наночастицах за счет электростатического взаимодействия между положительно заряженными аминогруппами полилизина в составе $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL}$ и отрицательно заряженными фосфатными группами сахаро-фосфатного остова DNA-фрагментов (рис. 2). Таким образом, были получены и исследованы наноконпозиты $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{DNA}(\text{v}3')$, $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{DNA}(\text{c}5')$ и $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{DNA}(\text{r})$.

Противовирусная активность нанобиоконпозитов $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{DNA}$

Вначале мы оценили влияние TiO_2 -наночастиц и $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{DNA}$ -наноконпозита на выживаемость клеток MDCK в отсутствие вируса. Концентрация образцов TiO_2 и $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{DNA}$, приводящая к 50% гибели клеток (TC_{50}), составляет более 1500 мкг/мл (табл. 2).

В дальнейших экспериментах была использована нетоксическая концентрация наночастиц и наноконпозитов (5 мкг/мл), что при емкости наноконпозита по DNA-фрагментам, равной 20 или

40 нмоль/мг, соответствует концентрации DNA-фрагментов 0.1 или 0.2 мкМ.

Противовирусную активность наноконпозитов $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{DNA}(\text{c}5')$, $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{DNA}(\text{v}3')$ и $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{DNA}(\text{r})$, содержащих выбранные фрагменты, сравнивали, проводя эксперименты по лечебной схеме, т.е. клетки сначала заражали вирусом, а затем инкубировали с наноконпозитами. Результаты исследований противовирусного действия рассматриваемых нанобиоконпозитов и соответствующих контрольных образцов приведены в табл. 3 и на рис. 3.

Наночастицы, не несущие DNA-фрагмент, очень слабо подавляли размножение вируса, независимо от присутствия или отсутствия остатка полилизина (табл. 3, рис. 3, образцы 1 и 2). Не связанный с наночастицами фрагмент DNA(v3') (образец 3) и наноконпозит $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{DNA}(\text{r})$, несущий олигонуклеотид со случайной последовательностью (образец 4), проявили весьма слабую активность (подавление в 1.3 и 3.4 раза соответственно). Фрагмент DNA(c5') в составе нанобиоконпозита $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{DNA}(\text{c}5')$ был более эффективен и подавлял репродукцию вируса на порядок. Намного более активным оказался наноконпозит $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{DNA}(\text{v}3')$ (подавление репродукции вируса на 99.8 и 99.9% или в ~400 и

Таблица 1. DNA-фрагменты, направленные на сегмент 5 вируса гриппа А, используемые в данной работе

Последовательность DNA, 5' → 3'	Обозначение	Комплементарен:
GATTATCTACCCTGCTTTTGCr	DNA(c5')	5'-некодирующей области cRNA или mRNA
GCAAAAGCAGGGTAGATAATCr	DNA(v3')	Соответствующей 3'-области vRNA
GATCAACTCCATATGCCATGr	DNA(r)	Случайная последовательность

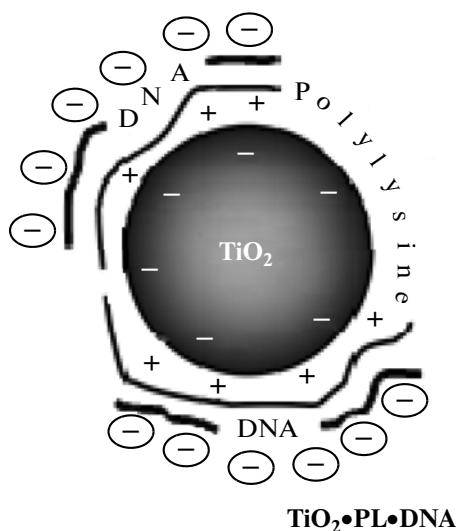


Рис. 2. Схематическое изображение наноконструктов $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{DNA}$, которые образованы путем электростатического связывания олигонуклеотидов с полилизинем, предварительно иммобилизованном на наночастицах.

1000 раз при концентрации $\text{DNA}(\nu 3')$ в составе нанобиокомпозита 0.1 и 0.2 мкМ соответственно (образцы 6 и 7). Из полученных результатов следует, что олигонуклеотид, направленный на исходную νPHK , оказался намного более эффективным по сравнению с комплементарным ему фрагментом, направленным на соответствующий участок 5'-некодирующей области mRNA (или cRNA).

Полученные результаты позволили оценить индекс селективности нанобиокомпозита $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{DNA}(\nu 3')$ (SI – отношение 50%-ной цитотоксической концентрации (TC_{50}) к 50%-ной эффективной концентрации (IC_{50})). В наших экспериментах рабочая концентрация нанобиокомпозита (5 мкг/мл) приводила к подавлению репликации вируса на 99.8%. Следовательно, концентрация,

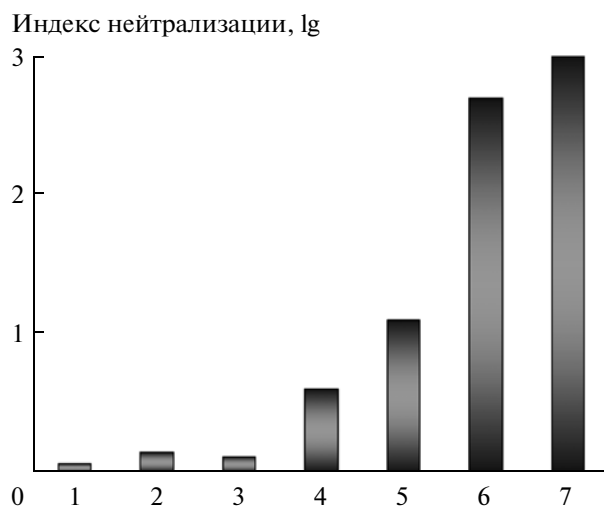


Рис. 3. Противовирусная активность образцов, представленная как индекс нейтрализации ($\text{NI} = \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}_{\text{контроль}} - \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}_{\text{образец}}$). Состав образцов (ось абсцисс) и концентрацию наночастиц и нанобиокомпозитов см. в табл. 3.

при которой происходит 50%-ное ингибирование вируса (IC_{50}), должна быть существенно меньше. Для нанобиокомпозита $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{DNA}(\nu 3')$ значение $\text{TC}_{50} > 1500$ мкг/мл. Таким образом, индекс селективности созданного нанобиокомпозита может быть оценен как значительно превышающий значение 300 ($\text{SI} = (1500 \text{ мкг/мл} : \text{IC}_{50}) \geq 1500 : 5 = 300$).

Следует отметить, что фрагмент $\text{DNA}(\nu 3')$, ковалентно связанный с полилизинем в составе нанобиокомпозита $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{DNA}(\nu 3')$, проявлял более высокую противовирусную активность (подавление вируса – 99.99%) (табл. 3, образец 8) [25]. Большая эффективность наноконструкта $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{DNA}(\nu 3')$ по сравнению с $\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{DNA}(\nu 3')$ объясняется, по всей вероятности, тем, что в первом случае полилизинный линкер, присоединенный ковалентно к 3'-концу

Таблица 2. Токсичность образцов TiO_2 -наночастиц и наноконструкта на их основе*

Концентрация образцов, мг/мл	Количество живых клеток, млн		Количество живых клеток, %	
	$\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{DNA}$	TiO_2	$\text{TiO}_2 \cdot \text{PL} \cdot \text{DNA}$	TiO_2
0.2	1.95	95	2.01	98
0.4	1.91	93	2.01	98
0.6	1.85	90	1.95	95
0.8	1.64	80	1.74	85
1.0	1.44	70	1.50	73
1.5	1.05	52	1.11	54
2.0	0.72	35	0.76	37

* Определена по окрашиванию клеток трипановым синим.

Таблица 3. Противовирусная активность исследуемых образцов по отношению к вирусу гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2)^a

Номер образца	Образец (DNA, мкМ)	Титр вируса		Подавление		NI, lg
		TCID ₅₀ /мл	lgTCID ₅₀ /мл	%	в ~n раз	
	контроль вируса	1220168	6.1	–	–	–
1	TiO ₂	982675	6.0	19	1.2	0.06
2	TiO ₂ -PL	809654	5.9	34	1.5	0.14
3	DNA(v3')	959950	6.0	21	1.3	0.11
4	TiO ₂ •PL•DNA(r) (0.1)	357586	5.6	71	3.4	0.6
5	TiO ₂ •PL•DNA(c5') (0.1)	98066	5.0	92	12	1.1
6	TiO ₂ •PL•DNA(v3') (0.1)	2803	3.4	99.8	435	2.7
7	TiO ₂ •PL•DNA(v3') (0.2)	1220	3.1	~99.9	1000	3
8 ^b	TiO ₂ •PL-DNA(v3') (0.1)			99.99	8000	3.9

^a Концентрация наночастиц и нанобиокмполитов: 5 мкг/мл по наночастицам и 0.1 или 0.2 мкМ по DNA-фрагменту. NI – индекс нейтрализации, рассчитанный как разность десятичных логарифмов титра вируса в клетках в отсутствие нанобиокмполитов (контроль) и титра вируса в клетках, обработанных нанобиокмполитами ($\lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}_{\text{контроль}} - \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}_{\text{образец}}$). Эксперименты проводили в культуре клеток MDCK по лечебной схеме при множественности инфицирования 0.1 TCID₅₀/кл.

^b Нанокмполит TiO₂•PL-DNA(v3') с ковалентной связью между PL и DNA-фрагментом детально исследован в работе [25].

олигонуклеотида, более эффективно защищает его от действия внутриклеточных нуклеаз. Вследствие этого фрагмент PL-DNA(v3') более стабилен в клетках по сравнению с немодифицированным олигонуклеотидом DNA(v3'). Несмотря на несколько меньшую противовирусную активность, нанокмполиты TiO₂•PL•DNA(v3') в некоторых случаях могут быть предпочтительнее, поскольку способ их получения проще, чем нанокмполитов типа TiO₂•PL-DNA, т.к. не требует предварительного получения конъюгатов PL-DNA. Кроме того, на наночастицах TiO₂•PL можно иммобилизовать олигонуклеотиды, несущие различные функциональные группы, или протяженные DNA-фрагменты, например, плазмиды.

Как следует из полученных данных, нанокмполиты вида TiO₂•PL•DNA, содержащие DNA-фрагменты, электростатически связанные с TiO₂•PL-наночастицами, проявили высокую противовирусную эффективность и селективность. Наряду с нанокмполитами вида TiO₂•PL-DNA с ковалентной связью между полилизинном и DNA-фрагментом [25] их можно рассматривать как высокоэффективные и селективные агенты для воздействия на нуклеиновые кислоты внутри клеток. Предложенные нанокмполиты могут быть использованы в качестве инструмента исследования процессов, протекающих с участием нуклеиновых кислот в клетках, а также как трамплин для создания лекарственных препаратов, направленных против инфекционных, наследственных и других заболеваний, так или иначе ассоциированных с нуклеиновыми кислотами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: поли-L-лизин гидробромид (PL, MW 15000–30000), среду PMI-1640 и антибиотики (БиоЛот, Россия), трипсин (Sigma, США); эмбриональную телячью сыворотку (Gibco, США); L-глутамин, буфер PBS, эритроциты петуха, клетки MDCK, вирус гриппа A Aichi/2/68 (H3N2) (ФБУН Вектор, Россия); олигонуклеотиды, синтезированные амидофосфитным методом на DNA-синтезаторе ASM-800 (Биоссет, Россия) с использованием синтонов (Glen Research, США). TiO₂-наночастицы в кристаллической форме (анатаз) были синтезированы, как описано в [26]. Трипсин (1 мкг/мл) и пенициллин-стрептомицин (100 Ед./мл) (Sigma-Aldrich, США) хранили при –80°C.

Вирус выращивали в аллантоисной полости 10-дневных эмбрионов куриных яиц (ФБУН Вектор, Россия) при 37°C. Аликвоты аллантоисной жидкости собирали в течение 48 ч после инокуляции вируса и хранили при –80°C.

Концентрацию олигонуклеотидов определяли спектрофотометрически, используя молярные коэффициенты поглощения при 260 нм для моно- и динуклеотидов [27]. Оптическое поглощение олигонуклеотидов измеряли на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Shimadzu, Япония).

Синтез нанокмполитов TiO₂•PL и TiO₂•PL•DNA проводили как описано в предыдущей работе [20], смешивая нанокмполит TiO₂•PL (0.1 мг по TiO₂-наночастицам) с соответствующим олигонуклеотидом (10^{–4} М). Для получения нанокмполита TiO₂•PL•DNA с емкостью

по олигонуклеотиду 20 или 40 нмоль/мг использовали частицы $\text{TiO}_2 \bullet \text{PL}$, содержащие полилизин в количестве 2 или 4 мкмоль/мг соответственно, чтобы обеспечить необходимый 5-кратный избыток аминокрупп полилизина к фосфатным группам олигонуклеотида. Эффективность иммобилизации определяли по отношению $(A_0 - A_s)/A_0$, где A_0 и A_s – значения оптического поглощения добавленного и несвязавшегося (в супернатанте) олигонуклеотида соответственно. Выход ~100%.

Влияние нанокompозита $\text{TiO}_2 \bullet \text{PL} \bullet \text{DNA}$ на выживаемость клеток MDCK. Клетки MDCK в логарифмической фазе роста (100000 клеток/мл) рассеивали в 96-луночные планшеты в питательной среде RPMI-1640 (100 мкл/лунка) и инкубировали при 37°C и 5% CO_2 . Через 2 дня после образования сплошного монослоя клетки промывали питательной средой без сыворотки (3×200 мкл). Образец $\text{TiO}_2 \bullet \text{PL} \bullet \text{DNA}(\text{v}3')$ разбавляли средой RPMI-1640 medium до нужной концентрации (10–2500 мкг/мл) и инкубировали с клетками MDCK при 37°C и 5% CO_2 в течение 2 сут. Деструктивные изменения в клетках оценивали с помощью инвертированного микроскопа. Клетки MDCK без образцов нанокompозита служили в качестве контроля (100%). Клетки окрашивали трипановым синим [28], и число живых клеток считали в камере Горяева. В табл. 2 приведена зависимость степени выживаемости клеток от концентрации нанокompозита.

Противовирусная активность нанокompозитов. Вирус A/Aichi/2/68 вносили в среде RPMI-1640, содержащей 2 мкг/мл трипсина, в культуру клеток MDCK при множественности инфицирования 0.1 TCID₅₀/кл в объеме 100 мкл/лунку (множественность инфицирования – количество вирусных частиц на одну клетку в единицах TCID₅₀; TCID₅₀ – тканевая цитопатическая доза вируса, при которой погибает 50% клеток). В контроле вносили среду RPMI-1640, содержащую 2 мкг/мл трипсина, в объеме 100 мкл/лунку. Через 1 ч адсорбции при комн. температуре вирусосодержащую жидкость удаляли, клеточный монослой промывали средой RPMI-1640 без трипсина, затем вносили исследуемый препарат в среде RPMI-1640 без трипсина в концентрации 5 мкг/мл в объеме 100 мкл/лунку. Через 4 ч инкубации при комн. температуре среду с препаратами удаляли, клетки промывали средой RPMI-1640 без трипсина и вносили среду RPMI-1640 с трипсином в объеме 100 мкл/лунку. Планшеты помещали в CO_2 -инкубатор при температуре 37°C и 100% влажности. Через 48 ч инкубации десятикратные разведения (с 10^{-1} до 10^{-8}) культуральной вирусосодержащей жидкости из каждой лунки вносили на клетки MDCK, инкубировали в течение 48 ч и затем определяли титр вируса.

Наличие вируса определяли визуально под микроскопом по цитопатическому действию и в реакции гемагглютинации с 1% эритроцитами петуха. Титр вируса определяли в единицах TCID₅₀/мл или lgTCID₅₀/мл. Противовирусную активность выражали в виде lgTCID₅₀/мл или с помощью логарифма индекса нейтрализации (NI), определенного как разность логарифмов титра вируса в клетках в отсутствие нанобиокompозитов (контроль) и титра вируса в клетках, обработанных нанобиокompозитами (lgTCID₅₀/мл контроль – lgTCID₅₀/мл образец). Результаты приведены в табл. 3 и на рис. 3.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана Интеграционным грантом СО РАН № 61, грантом РФФИ № 11-04-01408-а и программой ФЦП ГК № 16.512.11.2267.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lemb R.* // Genetics of Influenza Viruses. / Eds. Palese P., Kingsbury. D.W. N.Y.; Wien: Springer-Verlag, 1983.
2. *Bouvier N.M., Palese P.* // Vaccine. 2008. V. 26. Suppl. 4. D49–D53.
3. *Toovey S., Rayner C., Prinssen E., Chu T., Donner B., Thakrar B., Dutkowski R., Hoffmann G., Breidenbach A., Lindemann L., Carey E., Boak L., Gieschke R., Sacks S., Solsky J., Small I., Reddy D.* // Drug Saf. 2008. V. 31. P. 1097–1114.
4. *Margus H., Padari K., Pooga M.* // Mol. Ther. 2012. V. 20. P. 525–533.
5. *Nimesh S., Gupta N., Chandra R.* // J. Biomed. Nanotechnol. 2011. V. 7. P. 504–520.
6. *Troiber C., Wagner E.* // Bioconjug Chem. 2011. V. 22. P. 1737–1752.
7. *Loh X.J., Lee T.C.* // Recent Pat DNA Gene Seq. 2012. V. 6. P. 108–114.
8. *Murakami T., Tsuchida K.* // Mini Rev. Med. Chem. 2008. V. 8. P. 175–183.
9. *Kim T.H., Kim M., Eltohamy M., Yun Y.R., Jang J.H., Kim H.W.* // J. Biomed. Mater. Res. A. 2013. V. 101. P. 1651–1660.
10. *Kovtun A., Neumann S., Neumeier M., Urch H., Heumann R., Gepp M.M., Wallat K., Koeller M., Zimmermann H., Epple M.* // J. Phys. Chem. B. 2013. V. 117. P. 1550–1555.
11. *Levina A., Ismagilov Z., Repkova M., Shatskaya N., Shikina N., Tusikov F., Zarytova V.* // J. Nanosci. Nanotech. 2012. V. 12. P. 1812–1820.
12. *Зарытова В.Ф., Зиновьев В.В., Исмагилов З.Р., Левина А.С., Репкова М.Н., Шикина Н.В., Евдокимов А.А., Беланов Е.Ф., Балахнин С.М., Серова О.А., Байбородин С.И., Малыгин Э.Г., Загребельный С.Н.* // Российские нанотехнол. 2009. Т. 4. С. 115–118.
13. *Suzuki H., Toyooka T., Ibuki Y.* // Environ. Sci. Technol. 2007. V. 41. P. 3018–3024.

14. Thurn K.T., Arora H., Paunesku T., Wu A., Brown E.M., Doty C., Kremer J., Woloschak G. // *Nanomedicine*. 2011. V. 7. P. 123–130.
15. Ha W., Wang Y., Zheng Y. // *Advanced Materials Research*. 2009. V. 79–82. P. 389–392.
16. Jeng H.A., Swanson J. // *Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 2006. V. 41. P. 2699–2711.
17. Heinlaan M., Ivask A., Blinova I., Dubourguier H.C., Kahru A. // *Chemosphere*. 2008. V. 71. P. 1308–1336.
18. Liu H., Ma L., Zhao J., Liu J., Yan J., Ruan J., Hong F. // *Biol. Trace Elem. Res.* 2009. V. 129. P. 170–180.
19. Ismagilov Z.R., Shikina N.V., Bessudnova E.V., Korneev D.V., Ishchenko A.V., Chesalov Yu.A., Vladimirov A.V., Ryabchikova E.I. // *Chem. Eng. Trans.* 2012. V. 27. P. 241–246.
20. Левина А.С., Исмагилов З.Р., Репкова М.Н., Шикина Н.В., Байбородин С.И., Шацкая Н.В., Загребельный С.Н., Зарытова В.Ф. // *Биоорг. химия*. 2013. Т. 39. С. 87–98. [Levina A.S., Ismagilov Z.R., Repkova M.N., Shikina N.V., Baiborodin S.I., Shatskaya N.V., Zagrebelyi S.N., Zarytova V.F. // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2013. V. 39. P. 77–86].
21. Lamb R.A., Krug R.M. // *Fundamental Virology* / Eds. Knipe D.M., Howely P.M., Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001. P. 725–770.
22. Portela A., Digard P. // *J. Gen. Virol.* 2002. V. 83. P. 723–734.
23. Ge Q., Pастey M., Kobasa D., Puthavathana P., Lupfer C., Bestwick R.K., Iversen P.L., Chen J., Stein D.A. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006. V. 50. P. 3724–3733.
24. Ge Q., McManus M.T., Nguyen T., Shen C.H., Sharp P.A., Eisen H.N., Chen J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. P. 2718–2723.
25. Levina A.S., Repkova M.N., Ismagilov Z.R., Shikina N.V., Malygin E.G., Mazurkova N.A., Zinov'ev V.V., Evdokimov A.A., Baiborodin S.I., Zarytova V.F. // *Sci. Rep.* 2012. V. 2. P. 756. doi: 10.1038/srep00756. Epub 2012, Oct. 22.
26. Ismagilov Z.R., Shikina N.V., Mazurkova N.A., Tsikoza L.T., Tuzikov F.V., Ushakov V.A., Ishchenko A.V., Rudina N.A., Korneev D.V., Ryabchikova E.I. // *Sci. World. J.* 2012; 2012:498345. doi: 10.1100/2012/498345. Epub 2012, May 1.
27. Richards E.G. // *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology: Nucleic Acids.* / Ed. Fasman G.D., Cleveland, OH: CRC Press, 1975. P. 589.
28. Osano E., Kishi J., Takahashi Y. // *Toxicol. In Vitro*. 2003. V. 17. P. 41–47.

Efficient Inhibition of Human Influenza A Virus by Oligonucleotides Electrostatically Fixed on Polylysine-Containing TiO₂ Nanoparticles

A. S. Levina*, M. N. Repkova*, Z. R. Ismagilov**, N. V. Shikina**,
N. A. Mazurkova***, V. F. Zarytova*,#

#Phone: +7 (383) 363-51-24, e-mail: zarytova@niboch.nsc.ru

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, pr. Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

**Institute of Catalysis, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

***FBRI State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk oblast, Russia

Antiviral activity of **TiO₂•PL•DNA** nanobiocomposites was studied on the MDCK cell culture infected with influenza A virus (subtype H3N2). DNA fragments in the nanocomposites are electrostatically bound to titanium dioxide nanoparticles pre-covered with polylysine. It was shown that **TiO₂•PL•DNA(v3')** nanocomposite bearing the **DNA(v3')** fragment targeted to the 3'-end of the noncoding region of segment 5 of viral RNA specifically inhibited the virus reproduction with the efficiency of 99.8 and 99.9% (or by factors of ~400 and 1000) at a low concentration of **DNA(v3')** in nanocomposite (0.1 and 0.2 μM, respectively). The **TiO₂•PL•DNA(r)** nanocomposite containing oligonucleotide noncomplementary to viral RNA or the oligonucleotide unbound to the nanoparticles show very low antiviral activity (inhibition by factors of ~3.5 and 1.3, respectively).

Keywords: nanoparticles, nanocomposites, DNA fragments, site-specific action, influenza A virus