

8. Ahola T., Kaariainen L. Reaction in alphavirus mRNA capping: formation of a covalent complex of nonstructural protein nsP1 with 7-methyl-GMP // Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 1995. Jan 17. № 92(2). P. 507-511.

9. Kurkela S., Manni T., Myllynen J. et al. Clinical and laboratory manifestations of Sindbis virus infection: prospective study: Finland, 2002-2003 // J. Infect. Dis. 2005. Vol. 191. № 11. P. 1820-1829.

10. Лундстрём Й.О., Пфеффер М. Филогеографическая структура и эволюционная история вируса Синдбиса // Трансмиссивные и зоонозные болезни. 2010.

### МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МАРКЕРОВ ИНДУЦИРОВАННОГО В ЭКСПЕРИМЕНТЕ ВОСПАЛЕНИЯ

Рашимова А.Д., Дегтева Н.М.,  
Мустафаева Г.М., Сириус В.В.

ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный  
медицинский университет», Волгоград,  
e-mail: nastasiarashimova@gmail.com

Воспалительная реакция наступает в течение нескольких минут в ответ на флогогенные агенты и может длиться до нескольких дней, пока патологическое состояние не будет устранено и ткань не восстановится. Этот процесс известен как острая воспалительная реакция, которая контролируется и самоограничивается посредством активации противовоспалительных механизмов для поддержания тканевого гомеостаза.

Если течение воспаления после острого периода приобретает затяжной характер, воспаление становится хроническим. Это состояние длится от нескольких дней до нескольких лет и может быть локальным, ограниченным местом острой реакции, или системным.

Воспалительный процесс включает в себя:

**Индукторы воспаления**, флогогенные агенты, которые запускают воспалительную реакцию;

**Сенсоры**, такие как макрофаги, тучные клетки и дендритные клетки, которые стимулируют выработку химических медиаторов в ответ на индукторы;

**Медиаторы**, среди которых цитокины – являются межклеточными мессенджерами, которые в первую очередь действуют локально на ткани-мишени с очень быстрым ответом;

**Ткани-мишени**, где медиаторы вызывают воспалительную реакцию до нейтрализации флогогенных факторов.

Медиаторы воспаления включают цитокины, гетерогенную группу полипептидов, белков и гликопротеинов, которые опосредуют клеточную сигнализацию и коммуникацию между клетками иммунной системы, а также между иммунными клетками и другими тканями и органами. В ответ на флогогенные агенты подмножество цитокинов, называемых провоспалительными цитокинами, секретируется различными типами клеток, например, активированными моноцитами/макрофагами, Т-хелперными клетками, и тучными клетками, чтобы вызвать воспаление

и активировать врожденные иммунные клетки в очаге воспаления.

При секреции в небольших количествах провоспалительные цитокины действуют локально. При секреции в гораздо больших количествах может произойти “перетекание” цитокинов из воспаленной ткани в систему кровообращения. Как следствие, уровни циркулирующих цитокинов, которые в физиологических условиях находятся в пиколярном диапазоне, увеличиваются в 1000 раз во время воспалительной реакции [1,2].

### Маркеры воспаления

IL-6 является ключевым цитокином при определении острого системного воспаления различного генеза, однако при развитии хронического системного воспаления он в большинстве случаев, доминируя над IL-10, заметно уступает по чувствительности или примерно соответствует TNF-α и IL-8.

IL-10 при остром системном воспалении наряду с IL-6 является ключевым цитокиновым показателем, характеризует противовоспалительное звено системной воспалительной реакции (СВР), его высокие концентрации (> 25 пг/мл) являются критерием тяжести процесса.

К показателям СВР «первого плана» при хроническом системном воспалении из исследованных цитокинов следует отнести TNF-α и IL-8. Эти цитокины у большинства пациентов с патологиями наряду с IL-6 вносят наибольший вклад в формирование интегральных показателей СВР. При остром же варианте системного воспаления ответ со стороны TNF-α даже при критических для жизни состояниях сравнительно невелик. В несколько меньшей степени эта закономерность характерна для IL-8.

В целом по чувствительности для диагностики СВР как при острых, так и при хронических патологиях IL-1β существенно уступает другим исследуемым провоспалительным цитокинам – IL-6, IL-8, TNF-α [3].

### Моделирование СФА индуцированного воспаления

Морские свинки считаются более подходящими моделями для изучения различных воспалительных и инфекционных заболеваний человека, чем мыши и крысы. В экспериментальной части используют самок беспородных морских свинок массой 200-250 г (возраст 3-4 недели). Для создания экспериментальных групп животных раствор полного адьюванта Фрейнда (СФА) в количестве 50, 100 или 200 мл вводят под кожу в заднюю лапу в районе стопы. Морским свинкам контрольной группы вводят 200 мкл натрий-фосфатного буфера (PBS). Через 1 день после инъекции СФА, а затем каждые 3-4 дня измеряют ширину дистальной части плюсны обеих задних лап. Измерения ширины дистального района плюсны обеих задних лап показали,

что размер задней конечности, в которую вводили CFA, увеличивается в результате развития воспалительной реакции. Реакция в виде отека проявлялась в первый день после инъекции. При этом в группе «200 мкл» отек был сильнее и охватывал почти всю лапу [4, 5].

#### Метод определения маркеров воспаления

Антитела являются наиболее широко используемым элементом биоопределения в биосенсорике. Тем не менее, были предприняты меры по поиску альтернативных связующих, чтобы преодолеть основные ограничения, связанные с использованием антител. Они могут быть подразделены на аптамеры ДНК/РНК и пептидные аптамеры. Первые представляют собой синтетические олигонуклеотиды, специально полученные и отобранные *in vitro*.

Пептидные аптамеры основаны на относительно небольших, структурно устойчивых белках в качестве каркаса с соединительными петлями. Эти сконструированные каркасы обладают высокой аффинностью и специфичностью, низкой стоимостью производства и небольшим размером, что также придает им длительный срок службы. Более того, высокий контроль за их последовательностью и легкий синтез позволяют разрабатывать специальные модификации, такие как вставка линкера или функциональной группы, которые позволили бы осуществлять контролируемую иммобилизацию на поверхности. Для обнаружения цитокинов без меток использовались оба варианта элементов для биоопределения.

Иммуноферментный анализ (ИФА) – это количественный биохимический метод, который основан на взаимодействии антитело-антиген и колориметрической реакции для определения специфичности анализируемого вещества. Этот анализ остается технологией “золотого стандарта” для обнаружения и количественного определения цитокинов с очень высокой чувствительностью в диапазон концентраций ниже пг/мл для цитокинов, таких как IL-6 (LOD 0,09 пг/мл).

Технология, основанная на проточной цитометрии (например, Luminex) использует лазерный луч и флуоресцентно меченые антитела, проходящие по камере для обнаружения биомаркеров и клеток.

Этот метод появился, чтобы преодолеть ограничение обнаружения одной молекулы, и широко используется в исследованиях с аналогичной чувствительностью, как и ИФА, обнаружение в диапазоне концентраций ниже пг/мл (LOD 0,2 пг/мл для IL-6).

Оба коммерческих метода высокочувствительны и селективны, но они имеют некоторые ограничения: оба требуют много времени, весь процесс занимает 3-8 ч; требуются относительно большие объемы образцов (50-100 мкл на образец для ИФА, а для Luminex требуется только

25-50 мкл для нескольких образцов), но для обоих необходимо специализированное оборудование и персонал, а также флуоресцентная маркировка для обнаружения [4].

Оптические биосенсоры цитокинов, которые основаны на локализованном поверхностном плазмонном резонансе (LSPR), который имеет место, когда электроны зоны проводимости объектов нанометрового размера участвуют в коллективных колебаниях.

Поскольку цитокины являются относительно маленькими белками, нанофотонные биосенсоры доказали свою высокую эффективность в их обнаружении, позволяя обнаруживать множество цитокинов на микрочипе, функционализированном различными антителами, и интегрировать модули культивирования клеток для достижения анализа в режиме реального времени. Другие недавние примеры наноструктурирования включают интеграцию оптических и электрических компонентов.

Это относится к биосенсору IL-1 $\beta$  состоящему из нанопластического блока, интегрированного с микроэлектродами и микрофлюидами, разработанными Song et al.

Электроды, присутствующие в датчике, создают электроосмотический эффект в электролите: электродинамическое перемешивание повышает производительность датчика как с точки зрения времени отклика (5-15 мин), так и с точки зрения высокой чувствительности (1 пг/мл) определения цитокинов в разбавленной сыворотке крови человека.

Цитокины не являются электрохимически активными: следовательно, их можно непосредственно количественно определить с помощью электрохимических средств путем мониторинга изменения реакции окислительно-восстановительного зонда в растворе (обычно пары ферри/ферроцианид калия) при связывании мишени с рабочим электродом, модифицированным специфическим связующим. Электрохимическая импедансная спектроскопия (EIS) на сегодняшний день является наиболее широко используемым электрохимическим методом для обнаружения цитокинов и хемокинов: биосенсоры на основе EIS были продемонстрированы для IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , и TGF- $\beta$  [6].

#### Вывод

Биосенсоры электрохимического определения биомаркеров воспаления действуют на несколько порядков, охватывая клинически значимый диапазон цитокинов, и демонстрируют низкие пределы обнаружения. Наиболее примечательно, что помимо валидации в буферных тестовых растворах, в большинстве представленных выше работ сообщалось об электрохимическом обнаружении биомаркеров воспаления в более сложных растворах, таких как искусственный пот или даже в реальных

биологических образцах, таких как слюна, слезы и сыворотка.

#### Список литературы

1. Срослова Г.А., Срослов М.С., Стрыгин А.В., Букатин М.В., Толкачев Б.Е., Морковин Е.И., Колобродова Н.А., Стрыгина А.О., Кузнецова О.Ю., Доценко А.М. и др. Адаптация клеточных элементов, участвующих в регуляции гемостаза, к действию цитокинов (обзор) // Журнал медико-биологических исследований. 2020. Т. 8. № 2. С. 194-203.
2. Литвицкий П.Ф. Вопросы современной педиатрии // Воспаление. 2006. № 5(3). URL: [https://vsp.spr-journal.ru/journal/view/736?locale=ru\\_RU](https://vsp.spr-journal.ru/journal/view/736?locale=ru_RU) (дата обращения: 02.12.2022).
3. Гусев Е.Ю., Черешнев В.А., Журавлева Ю.А., Соломатина Л.В., Зубова Т.Э. Варианты развития хронического системного воспаления // Медицинская иммунология. 2009. №2-3. С. 131-140.
4. Дьяченко И.А., Паликов В.А., Паликова Ю.А., Андреев Я.А., Мурашев А.Н. Новые модели изучения воспалительной активности // Биомедицина. 2015. № 3. С. 27-32.
5. Таранов О.С., Якубицкий С.Н., Непомнящих Т.С., Нестеров А.Е., Щелкунов С.Н. Индуцированный адьювантом артрит у морских свинок // Acta Naturae (русскоязычная версия). 2016. № 4(31). С. 119-126.
6. Burtscher B., Manco Urbina P.A., Diacci C., Borghi S., Pinti M., Cossarizza A., Salvarani C., Berggren M., Biscarini F., Simon D.T., Bortolotti C.A. Sensing Inflammation Biomarkers with Electrolyte-Gated Organic Electronic Transistors // Adv Healthc Mater. 2021. № 10(20). URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34423579/> (дата обращения: 19.12.2022).

#### МЕТОДИКА ДЕТЕКЦИИ ВИРУСА ЛИХОРАДКИ ЗАПАДНОГО НИЛА И ОЧИСТКА ЕГО АНТИГЕНА.

Ржевская А.Э., Чеботарева С.В., Краузе Ю.Г., Жильцова П.В.

ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет», Волгоград,  
e-mail: rzhevskaya\_01@bk.ru

Лихорадка Западного Нила (ЛЗН) это арбовирусное инфекционное заболевание, которое вызывается *Flavius* семейства *Flaviviridae*. Вирус ЛЗН состоит из одноцепочечной РНК. Данное заболевание является трансмиссивным, вирус циркулирует по энзоотическому циклу, то есть передается позвоночным хозяевам инфицированным переносчиком-комаром в процессе кровопускания. *Mosquitoes Culex* служат основными переносчиками вирусной передачи, в то время как другие виды комаров, подобные *Aedes*, также могут служить переносчиками [3].

Вирусный менингоэнцефалит был проявлением инфекции, которая привлекла ученых для проведения исследований вируса западного Нила в связи с регистрацией 2964 случаев заболеваний в 35 субъектах Российской Федерации начиная с 1999 по 2020 год. Этап выделения антигена вируса Западного Нила (ВЗН) необходим для его дальнейшего исследования. Одним из методов очищения выделенного антигена ВЗН является гель-хроматография. Антитела IgM и IgG являются ключевыми маркерами для выявления заболевания, что показывает необходимость проведения иммуноферментного анализа при лабораторной диагностике [1].

#### Характеристика возбудителя ЛНЗ

*Лихорадка Западного Нила* – это острое инфекционное вирусное заболевание с преимущественно трансмиссивным заражением человека, то есть через укус кровососущих насекомых или особей типа членистоногих [3].

В структуру вируса входит одноцепочечный геном РНК положительного смысла, который связан с капсидом, с образованием нуклеокапсида, имеющего икосаэдрическую симметрию. Сам нуклеокапсид окружен липидным слоем со встроенными белками, образующий оболочку, что является осложняющим фактором для его детекции и очистки. На оболочке находятся гликопротеиды, которые необходимы вирусу для прикрепления к клетке-хозяина [2].

#### Лабораторная диагностика ВЗН и метод очистки его антигена

Исходя из МУК 4.2.3009-12 по «Порядку организации и проведения лабораторной диагностики лихорадки Западного Нила в лабораториях территориального, регионального и федерального уровней» для установления диагноза необходимо провести три этапа исследования:

1. Для детекции РНК вируса Западного Нила необходимо проводить молекулярно-генетического исследования с помощью ОТ-ПЦР, где образцами являются цельная кровь, сыворотка или плазма крови, лейкоцитарная фракция крови и спинно-мозговая жидкость.

2. Иммуноферментный анализ (ИФА) на антитела класса М (IgM) и G (IgG) после забора парных сывороток крови или спинномозговая жидкость (СМЖ) больного/ реконвалесцента натощак из локтевой вены.

3. Вирусологический анализ проводится для дальнейшего изучения ВЗН, где биоматериалами являются консервированная кровь, ступки крови и секционный материал. В качестве секционного материала служат головной мозг, почки, печень.

Обнаружение фрагмента РНК вируса Западного Нила при ОТ-ПЦР, выявление положительных результатов парных сывороток на иммуноглобулины классов М и G после ИФА подтверждает наличие инфекции Лихорадки Западного Нила [4].

Однако существуют трудности в постановке диагноза, которые возникают из-за неоднозначности результатов после проведения исследований, вследствие неправильного подбора тест-системы. Исключение неточностей в результатах лабораторных диагностик достигается посредством выбора наиболее специфичных тест – систем, что в свою очередь происходит благодаря подбору определенного антигена, который будет присутствовать в основе данной тест – системы. Для выделения высоко иммуногенного антигена необходимо очистить искомым антиген высокоэффективным методом. Одним из таких методов очистки является гель – хроматография.