

УДК 578.7

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-544-559>

Научная статья | Scientific article



Эффективность применения индуктора интерферонов против вируса Чикунгунья *in vitro*

Е.В. Отрашевская^{1,✉}, К.В. Каа², Т.Г. Самарцева¹, А.С. Оксанич¹, Г.М. Игнатьев¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Малый Казенный пер., д. 5а, Москва, 105064, Российская Федерация

² Федеральное государственное автономное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), поселение Московский, поселок Института полиомиелита, вл. 8, к. 1, Москва, 108819, Российская Федерация

✉ Отрашевская Елена Викторовна; e.v.otrashevskaja@mail.ru

Резюме

Актуальность. Препараты для специфического лечения и профилактики лихорадки Чикунгунья, ее осложнений и последствий в настоящее время отсутствуют, в связи с этим особую актуальность приобретают вопросы разработки терапевтических и профилактических препаратов против вируса Чикунгунья (ЧИКВ), в том числе препаратов индукторов интерферонов.

Цель. Изучение эффективности профилактического применения препарата индуктора интерферонов против вируса Чикунгунья в модели *in vitro*.

Материалы и методы. Использовали штамм ЧИКВ Nika2021, две линии клеток — Vero и A549, а также препарат индуктора интерферонов (РНК двуспиральной натриевой соль) в двух дозировках (250 и 500 мкг/мл) и двух режимах применения (за 4 ч до заражения и одновременно с ним). Определяли титр вируса по его цитопатическому действию; содержание РНК ЧИКВ — методом ОТ-ПЦР-РВ и оценивали по показателю порогового числа циклов ПЦР; концентрацию продуцируемых клетками цитокинов — методом ИФА. В динамике анализировали активность ЧИКВ и содержание РНК ЧИКВ, а также продукцию цитокинов клетками (ИФН-α, -γ, ИЛ-6 и ФНО-α). Полученные данные обрабатывали при помощи пакетов программ Microsoft Office Excel 2016 и StatTech.

Результаты. Препарат в дозах 250 и 500 мкг/мл стимулировал продукцию в большей степени ИФН-α и в меньшей степени ИФН-γ; в большей степени — в линии клеток A549, в меньшей — в линии клеток Vero. Динамика содержания РНК ЧИКВ соответствовала динамике его титра в клетке. В целом содержание РНК ЧИКВ в линии клеток Vero было значительно выше, чем в линии клеток A549 ($p < 0,002$ при дозировке препарата 250 мкг/мл, $p < 0,0005$ при дозировке 500 мкг/мл). Препарат применяли в двух режимах: профилактическом — за 4 ч до заражения клеток вирусом; экстренно профилактическом — одновременно с инфицированием. Содержание РНК ЧИКВ в режиме профилактического применения препарата относительно контрольного опыта (инфицирование без препарата) было значительно ниже в обеих дозах в обеих линиях клеток ($p < 0,002$ для Vero, $p < 0,0003$ для A549), в режиме экстренной профилактики — $p < 0,05$ и $p < 0,003$ соответственно. Выявлена и статистически подтверждена эффективность применения препарата индуктора интерферонов против ЧИКВ, показано преимущество линии клеток A549 для изучения противовирусной активности *in vitro*. В обеих линиях интактных клеток отмечена продукция ИЛ-6 и ФНО-α.

Выводы. Обнаружен положительный противовирусный эффект от применения препарата индуктора интерферонов против ЧИКВ *in vitro*, при этом степень эффективности зависела от линии клеток. Показана необходимость тщательного отбора клеточной линии в зависи-

мости от целей исследования, а также изучения продукции цитокинов клетками в моно-
слое до стимуляции вирусами и (или) препаратами.

Ключевые слова: вирус Чикунгунья; индуктор интерферонов; ИФН; ИЛ-6; ФНО- α ; цитокины; Vero; A549; РНК
двуспиральной натриевая соль; профилактические препараты

Для цитирования: Отрашевская Е.В., Каа К.В., Самарцева Т.Г., Оксанич А.С., Игнатьев Г.М. Эффективность
применения индуктора интерферонов против вируса Чикунгунья *in vitro*. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(4):544–559. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-544-559>

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 22-14-00184 «Разработка диагностических, профилактиче-
ских и терапевтических стратегий в отношении инфекции, вызванной вирусом Чикунгунья».

Конфликт интересов. Г.М. Игнатьев — член редколлегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» (с 2008 г.). Осталь-
ные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Efficacy of interferon inducers against Chikungunya virus *in vitro*

Elena V. Otrashevskaja¹✉, Konstantin V. Kaa², Tatiana G. Samartseva¹,
Aleksy S. Oksanich¹, George M. Ignatyev¹

¹ I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 5A, Maly Kazenny Ln., Moscow 105064,
Russian Federation

² Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological
Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), 8/1 Village of the Institute of
Poliomyelitis, Moskovsky settlement, Moscow 108819, Russian Federation

✉ Elena V. Otrashevskaja; e.v.otrashevskaja@mail.ru

Abstract

Scientific relevance. To date, no specific antivirals have been approved to treat and prevent Chikungunya fever, its complications, and sequelae. Therefore, the development of therapeutic and preventive medicinal products against Chikungunya virus (CHIKV), including interferon inducers, is gaining relevance.

Aim. The authors aimed to study the effectiveness of prophylactic administration of an interferon inducer against CHIKV in an *in vitro* model.

Materials and methods. The study used two cell lines (Vero and A549), a CHIKV strain (Nika2021), and an interferon-inducing medicinal product (double-stranded RNA sodium salt) at two doses (250 $\mu\text{g/mL}$ and 500 $\mu\text{g/mL}$) administered at two schedules: Prevention (4 h prior to the virus challenge) and Emergency Prevention (at the time of the virus challenge). The authors determined the CHIKV titre by its cytopathogenic effect, the CHIKV RNA content by the cycle threshold value in real-time reverse-transcription polymerase chain reaction, and the concentration of cytokines using the enzyme immunoassay method. The study monitored the changes in CHIKV biological activity, CHIKV RNA levels, and the production of interferon-alpha (IFN- α), interferon-gamma (IFN- γ), interleukin-6 (IL-6), and tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) in cells over time. The statistical analysis of the resulting data used Microsoft Office Excel 2016 and StatTech.

Results. The medicinal product at doses of 250 $\mu\text{g/mL}$ and 500 $\mu\text{g/mL}$ stimulated the production of both IFN- α and IFN- γ (IFN- α to a greater extent than IFN- γ) in both cell lines (in A549 to a greater extent than in Vero). The changes in CHIKV RNA levels with time corresponded to those of the virus titre. In general, CHIKV RNA levels in Vero cells were significantly higher than those in A549 cells ($p < 0.002$ at 250 $\mu\text{g/mL}$ and $p < 0.0005$ at 500 $\mu\text{g/mL}$). The CHIKV RNA content after preventive interferon inducer administration was significantly lower than that in the control experiment (challenge without administration of the medicinal product) for both doses and both cell lines ($p < 0.002$ for Vero cells; $p < 0.0003$ for A549 cells). The CHIKV RNA con-

tent after interferon inducer administration as emergency prevention was significantly lower than that in the control experiment ($p < 0.05$ for Vero cells; $p < 0.003$ for A549 cells). The study demonstrated the efficacy of the interferon inducer against CHIKV and a higher applicability of the A549 cell line to studying antiviral activity *in vitro*. The authors observed the production of IL-6 and TNF- α by intact cells of both lines.

Conclusions. According to the results, the studied interferon inducer has a positive antiviral effect against CHIKV *in vitro*, with the antiviral effect degree depending on the cell line used. This experimental study demonstrated the need to carefully select the cell line for a study in accordance with its objectives and to evaluate the production of cytokines by a monolayer of cells before stimulation with viruses and/or medicinal products.

Keywords: Chikungunya virus; interferon inducer; IFN- α ; IFN- γ ; IL-6; TNF- α ; cytokines; Vero; A549; double-stranded RNA sodium salt; preventive medicines

For citation: Otrasevskaja E.V., Kaa K.V., Samartseva T.G., Oksanich A.S., Ignatyev G.M. Efficacy of interferon inducers against Chikungunya virus *in vitro*. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(4):544–559. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-544-559>

Funding. This study was supported by the Russian Science Foundation under grant No. 22-14-00184 *Development of diagnosis, prevention, and treatment approaches to Chikungunya infection*.

Disclosure. G.M. Ignatyev has been a member of the Editorial Board of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2008. The other authors declare having no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

Вирус Чикунгунья (ЧИКВ), представитель рода *Alphavirus* из семейства *Togaviridae*, – это оболочечный вирус с одноцепочечной РНК положительной полярности; размер генома приблизительно составляет 11,8 тыс. нуклеотидов. В клетках насекомых альфа-вирусы могут персистентно реплицироваться, в то время как размножение в клетках млекопитающих оказывает цитопатический эффект, в результате которого происходит драматическое отключение экспрессии генов хозяина, что, в свою очередь, приводит к супрессии врожденного иммунитета [1]. Патогенные альфа-вирусы могут напрямую противодействовать антивирусной активности клеток, подавляя врожденный (неспецифический) иммунитет или препятствуя формированию адаптивного (специфического) иммунитета [2]. Вирусемия в острую фазу заболевания сопровождается у пациентов лимфопенией, моноцитопенией, нейтрофилией, активацией Т-клеточного ответа и выраженной продукцией провоспалительных цитокинов, в том числе интерферонов (ИФН) – ИФН- α и ИФН- γ [3]. Ключевые клетки для репродукции ЧИКВ – фибробласты, моноциты, макрофаги и эндотелиальные клетки.

Лихорадка Чикунгунья представляет собой острое инфекционное заболевание, которое распространяется комарами. У пациентов, инфицированных ЧИКВ, часто развиваются полиартралгии и артриты с отеком суставов и выраженным болевым синдромом. Полиартралгии могут сохраняться достаточно долгое время

после исчезновения других симптомов, вовлекая в процесс разные суставы, иногда приводя к деструктивным артропатиям. Хронизация патологического процесса при ЧИКВ-инфекции характеризуется выраженными персистирующими или рецидивирующими болями в мелких суставах конечностей по типу ревматоидного артрита и коленях от нескольких месяцев до ряда лет, что значительно влияет на качество жизни и нередко приводит к длительной утрате трудоспособности [4–6]. Нередко при тяжелом течении заболевания наблюдается неврологическая манифестация ЧИКВ-инфекции, вплоть до энцефалита, энцефалопатии или развития синдрома Гийена – Барре [7].

В последние десятилетия заболевание, вызываемое ЧИКВ, стало глобальной проблемой для здравоохранения в более чем 100 странах Европы, Азии, Африки, Северной и Южной Америки, Карибского региона, Океании. Отмечено, что, как и все арбовирусы, ЧИКВ в эндемичных регионах вызывает спорадические вспышки. Однако, попадая в иммунологически наивную популяцию, вирус способен инициировать серьезную эпидемию [8]. Способность ЧИКВ к внезапному появлению и быстрому распространению на территории новых регионов требует проведения непрерывного и усиленного эпидемиологического мониторинга, а также постоянной готовности органов здравоохранения к вспышкам лихорадки Чикунгунья. Эффективные противовирусные, а также специфические профилактические препараты против ЧИКВ в настоящее время отсутствуют.

За полвека после разработки V.R. Harrison и соавт. [9] первой вакцины для профилактики лихорадки Чикунгунья ни один препарат так и не появился на рынке. Данный факт свидетельствует о том, что путь этот по разным причинам непростой.

Наиболее адекватная лабораторная модель для экспериментального изучения заболевания, вызываемого ЧИКВ, а также терапевтических и профилактических препаратов — низшие приматы. Их основное преимущество перед другими лабораторными животными: они — естественные хозяева вируса в природе, и патогенез заболевания у них имеет в общих чертах такую же клиническую картину, как у человека (лихорадка, сыпь, вирусемия, продукция ИФН) [10]. Для изучения противовирусных препаратов, в том числе вакцин для профилактики лихорадки Чикунгунья, широко используют инбредных мышей линии C57BL/6. Чем моложе мыши, тем чувствительнее они к ЧИКВ. Летальное инфицирование ЧИКВ моделируется на сосунках мышей C57BL/6, а также на мышках, дефектных по рецептору ИФН- α/β [11–13]. Для скринингового изучения противовирусных соединений и препаратов различного происхождения проводятся, ранее доклинических исследований на животных, эксперименты *in vitro* с использованием разных клеточных линий. Преимущества таких исследований: достаточно быстрое тестирование противовирусной активности того или иного препарата, оценка цитотоксического эффекта используемого соединения и др.

В опубликованном в 2021 г. обзоре V. Battisti и соавт. [14] приведены результаты исследований *in vitro* около 100 противовирусных соединений, действующих или непосредственно на ЧИКВ, или на клетки хозяина. В многочисленных работах использовались штаммы разных генотипов ЧИКВ, разные клеточные линии и методы оценки. Большинство исследователей применяли клеточную линию Vero для тестирования соединений прямого противовирусного действия. Однако для соединений, влияющих на факторы противовирусной защиты клеток хозяина, данная клеточная линия почти не использовалась [14]. Некоторые препараты и соединения на линии клеток Vero проявили парадоксальный эффект, демонстрируя положительный результат *in vivo* и при этом отсутствие или негативный эффект *in vitro*, и наоборот. Данный феномен объясняется тем, что клетки Vero не продуцируют ИФН I типа, который крайне важен для контроля и предотвращения ЧИКВ-инфекции. Впервые генетический дефект данной клеточной линии в продукции ИФН был отмечен в конце 1980-х

годов [15]. Позже проводился структурный анализ генома клеток Vero, а также сравнительные исследования полногеномной структуры разных сублиний Vero [16, 17]. Были обнаружены факторы, такие как крупная делеция (≈ 9 Mbp) и потеря гомозиготности 12-й хромосомы, характерные для четырех сублиний клеток Vero: JCRB0111, CCL-81, 76 и E6. Выявленные факторы привели к «потере» кластера генов ИФН I типа, а также гена ингибитора циклин-зависимой киназы (CDKN2), что, в свою очередь, может частично объяснить высокую чувствительность линии Vero к различным вирусам.

Критическая роль клеточного иммунитета, и прежде всего ИФН I типа, для контроля и предотвращения ЧИКВ инфекции была показана ранее [2, 3, 5, 18, 19]. Так, ИФН- α лимитирует репликацию и диссеминацию ЧИКВ, в то время как ИФН- β ограничивает воспалительную реакцию и таким образом препятствует развитию патологического процесса [20]. Известно, что ЧИКВ, подобно всем альфа-вирусам, способен обходить и (или) противодействовать ИФН- α/β -ответу клеток хозяина [2, 11, 18, 19, 21]. Эти факторы влияли на выбор модулирующих иммунный ответ препаратов в качестве терапевтических средств против ЧИКВ. В большинстве исследований, как *in vivo*, так и *in vitro*, при использовании препаратов ИФН противовирусный эффект отмечался только при их профилактическом применении, т.е. при экзогенном внесении до момента инфицирования [11, 19, 22–26]. Интересные исследования проводились с применением препарата индуктора интерферонов — тилорона, который известен в России с 1970-х годов. В кратком сообщении [27] имеется информация о положительном результате использования индуктора ИФН для подавления репликации ЧИКВ *in vitro* при профилактической обработке клеток линии Vero.

С учетом отсутствия специфических препаратов для лечения лихорадки Чикунгунья в настоящей работе был исследован появившийся на отечественном рынке препарат индуктора интерферонов Радамин®Виро против ЧИКВ в модели *in vitro* с использованием двух клеточных линий — Vero и A549. Клеточная линия Vero (эпителиальные клетки почки африканской зеленой мартишки), дефектная по ИФН, а значит, высокочувствительная к разным вирусам, широко используется для экспериментальных задач, в частности для изучения ЧИКВ, размножение которого сопровождается выраженным цитопатическим эффектом. Клетки линии A549 (клетки карциномы легкого человека) поддерживают устойчивую кинетику размножения ЧИКВ,

идеально подходят для изучения эффекта противовирусных препаратов.

Цель работы — изучение эффективности профилактического применения препарата индуктора интерферонов против вируса Чикунгунья в модели *in vitro*.

В ходе экспериментов дополнительно проводили оценку влияния используемых клеток (линии Vero и A549) на репродукцию ЧИКВ, а также на результаты применения препарата индуктора интерферонов (РНК двуспиральной натриевая соль) и цитокиновый баланс.

Материалы и методы

Материалы

Препарат индуктора интерферонов. В соответствии с инструкцией препарат (Радамин® Виро, АО «Биохимик») представляет собой натриевую соль двуспиральной рибонуклеиновой кислоты *Saccharomyces cerevisiae*. Препарат разводили поддерживающей средой DMEM (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Россия) до концентраций 500 и 250 мкг/мл.

Клеточные линии Vero и A549. Линия клеток Vero получена из банка посевных клеток ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН». В работе использовали линию клеток Vero 145-го пассажа. Линия клеток A549 получена из банка клеток ООО «БиолоТ» (Россия). В паспорте данной линии отмечено, что клетки экспрессируют рецепторы к ИФН. В качестве среды поддержки для обеих линий клеток использовали среду DMEM (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Россия) с эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) (Gibco, США): 5% — для клеток линии Vero, 10% — для A549. Обе клеточные линии культивировали при 37 °C с 5% содержанием CO₂ в термостате.

Вирус ЧИКВ. В экспериментах использовали штамм Nika2021. Нуклеотидная последовательность штамма Nika2021 представлена в GenBank (№ OQ320495.1¹). Выделение и пассирование штамма проводили так же, как описано ранее [28]. В экспериментах доза заражения ЧИКВ была равной 0,0001 MOI (multiplicity of infection — количество инфекционных доз вируса в расчете на одну клетку), что соответствовало показателю тканевой цитопатической дозы, вызывающей гибель 50% клеток, равному 100 ТЦД₅₀/100 мкл.

Методы

Определение титра вируса Чикунгунья. На линии клеток Vero в 96-луночных культуральных планшетах определяли, как описано ранее

[28], титр ЧИКВ. Посев клеток в концентрации 3×10⁴ клеток/200 мкл проводили за 48 ч до начала титрования. Готовили десятикратные разведения вируса от 10⁻¹ до 10⁻⁹ в питательной среде DMEM. На одно разведение использовали 8 лунок; в каждую вносили по 25 мкл каждого разведения вируса и добавляли 175 мкл поддерживающей питательной среды с 2% ЭТС. В контрольные лунки с клетками вносили по 200 мкл питательной среды с 2% ЭТС. Планшеты инкубировали при 37 °C в условиях термостата с 5% содержанием CO₂. Результат титрования учитывали на 5-е сутки по выраженному цитопатическому действию и рассчитывали показатель ТЦД₅₀, значение титра вируса выражали в lg ТЦД₅₀/мл.

Определение содержания РНК ЧИКВ. Проводили методами обратной транскрипции (ОТ) и полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ), как было описано ранее [28]; ПЦР-РВ — с использованием оригинальных праймеров и зонда [28]. Амплификация велась на приборе «ДТпрайм» (ООО «НПО «ДНК-Технология», Россия) по следующей программе: при 95 °C в течение 90 с, далее 40 циклов: при 95 °C — 15 с, при 55 °C — 40 с. Содержание РНК ЧИКВ оценивали по показателю порогового числа циклов ПЦР (C_t), при котором флуоресценция превышает пороговое значение. Расчет пороговых циклов проводили с использованием программного обеспечения к амплификатору «ДТпрайм».

Определение концентраций цитокинов — интерферонов α и γ, интерлейкина 6 и фактора некроза опухоли α. Проводили определение содержания цитокинов в образцах с использованием наборов реагентов (АО «Вектор-Бест», Россия) для иммуноферментного определения концентрации следующих цитокинов:

- ИФН-α — Альфа-Интерферон-ИФА-БЕСТ (кат. номер А-8758);
- ИФН-γ — Гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ (кат. номер А-8752);
- ИЛ-6 — Интерлейкин-6-ИФА-БЕСТ (кат. номер А-8768);
- ФНО-α — Альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ (кат. номер А-8756).

Реакцию иммуноферментного определения концентрации цитокинов и учет результатов проводили согласно инструкции производителя в трех повторях.

Дизайн исследования

Для оценки эффективности препарата индуктора интерферонов против ЧИКВ в модели

¹ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/2523173327>

in vitro были проведены (табл. 1): анализ значений титра ЧИКВ, оценка содержания РНК ЧИКВ, определение концентрации ряда цитокинов после заражения монослоя клеток Vero и A549. Параллельно с предыдущими этапами работы проводились контрольные исследования продукции цитокинов после внесения препарата в монослой интактных клеток обеих линий; исследования продукции цитокинов, титра ЧИКВ и содержания РНК ЧИКВ после заражения монослоя клеток обеих линий.

Во всех экспериментах засекали 24-луночные планшеты клетками в концентрации 3×10^4 клеток/200 мкл. После формирования клеточного монослоя и удаления из всех лунок культуральной жидкости проводилась основная часть опыта: в меньшую часть лунок вносили поддерживающую среду DMEM, в остальные — либо ЧИКВ, либо препарат — в зависимости от эксперимента. В конце каждого опыта проводили контроль целостности монослоя клеток под микроскопом — через 4, 24, 48, 72 и 96 ч. В эти же сроки отбирали образцы культуральной жидкости для определения целевых показателей эксперимента.

Контрольный опыт «Клетки». Исследовали продукцию цитокинов интактными клетками Vero и A549. После удаления культуральной жидкости из всех 24 лунок со сформировавшимся клеточным монослоем в каждую лунку вносили среду поддержки DMEM — данный момент принимали за начало отсчета времени во всех экспериментах.

Контрольный опыт «Препарат». Исследовали продукцию цитокинов клетками Vero и A549 после обработки каждой линии препаратом в двух разных дозировках (250 и 500 мкг/мл). После общего этапа подготовки к опытам в 20 лунок планшета добавляли только препарат, а в оставшиеся 4 лунки — только среду поддержки для контроля состояния клеток. В указанные сроки отбирали образцы культуральной жидкости для определения концентрации изучаемых цитокинов.

Контрольный опыт «Виррус». Исследовали динамику репликации ЧИКВ и продукции цитокинов при заражении клеток Vero и A549. После общего этапа подготовки к опытам в 20 лунок планшета добавляли ЧИКВ в дозе 100 ТЦД₅₀/100 мкл (0,0001 MOI на клетку),

Таблица 1. Краткая характеристика экспериментов по оценке эффективности препарата индуктора интерферонов против вируса Чикунгунья *in vitro*

Table 1. Overview of *in vitro* experiments to evaluate the interferon inducer efficacy against CHIKV

Эксперимент <i>Experiment</i>	Линия клеток <i>Cell line</i>	ЧИКВ <i>CHIKV</i>	Доза, режим введения препарата <i>Dose, administration schedule</i>	Показатели <i>Parameters</i>
Основные: <i>Main:</i>				
«Профилактика» <i>Prevention</i>	Vero, A549	Штамм Nika2021 <i>Nika2021 strain</i>	250 мкг/мл, 500 мкг/мл; за 4 часа до заражения <i>250 µg/mL, 500 µg/mL; 4 hours before infection</i>	1. ИФН-α, -γ, ИЛ-6, ФНО-α 2. Титр ЧИКВ 3. Содержание РНК ЧИКВ <i>1. IFN-α, IFN-γ, IL-6, TNF-α 2. CHIKV titre 3. CHIKV RNA content</i>
«Экстренная профилактика» <i>Emergency Prevention</i>	Vero, A549	Штамм Nika2021 <i>Nika2021 strain</i>	250 мкг/мл, 500 мкг/мл; одновременно с заражением <i>250 µg/mL, 500 µg/mL; simultaneously with infection</i>	1. ИФН-α, -γ, ИЛ-6, ФНО-α 2. Титр ЧИКВ 3. Содержание РНК ЧИКВ <i>1. IFN-α, IFN-γ, IL-6, TNF-α 2. CHIKV titre 3. CHIKV RNA content</i>
Контрольные: <i>Control:</i>				
«Клетки» <i>Cells</i>	Vero, A549	Нет <i>No</i>	Нет <i>No</i>	ИФН-α, -γ, ИЛ-6, ФНО-α <i>IFN-α, IFN-γ, IL-6, TNF-α</i>
«Препарат» <i>Medicinal Product</i>	Vero, A549	Нет <i>No</i>	250 мкг/мл, 500 мкг/мл <i>250 µg/mL, 500 µg/mL</i>	ИФН-α, -γ, ИЛ-6, ФНО-α <i>IFN-α, IFN-γ, IL-6, TNF-α</i>
«Виррус» <i>Virus</i>	Vero, A549	Штамм Nika2021 <i>Nika2021 strain</i>	Нет <i>No</i>	1. ИФН-α, ИФН-γ, ИЛ-6, ФНО-α 2. Титр ЧИКВ 3. Содержание РНК ЧИКВ <i>1. IFN-α, IFN-γ, IL-6, TNF-α 2. CHIKV titre 3. CHIKV RNA content</i>

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. ЧИКВ — вирус Чикунгунья; препарат — РНК двуспиральной натриевой соль; ИФН-α — интерферон α; ИФН-γ — интерферон γ; ИЛ-6 — интерлейкин-6; ФНО-α — фактор некроза опухоли α.

Note. CHIKV, Chikungunya virus; medicinal product, double-stranded RNA sodium salt; IFN-α, interferon-alpha; IFN-γ, interferon-gamma; IL-6, interleukin-6; TNF-α, tumour necrosis factor-alpha.

а в оставшиеся 4 лунки — только среду поддержки для контроля состояния клеток без вируса. В указанные сроки отбирали образцы вирусосодержащей культуральной жидкости, в которой определяли содержание РНК ЧИКВ методом ОТ-ПЦР-РВ, концентрацию изучаемых цитокинов, а также в клетках Vero — значения титра вируса.

Основной эксперимент «Профилактика».

Исследовали влияние препарата на репликацию ЧИКВ в клетках Vero и A549 при «профилактическом» введении препарата (за 4 ч до заражения ЧИКВ). После общего этапа подготовки к опытам в 16 лунок планшета № 1 добавляли препарат в концентрации 250 мкг/мл, а в 8 лунок — среду поддержки: 4 лунки — для контроля клеток, 4 — для контроля вируса. Параллельно в 16 лунок планшета № 2 добавляли препарат в концентрации 500 мкг/мл, а в 8 лунок — среду поддержки (4 лунки — для контроля клеток, 4 — для контроля вируса). Через 4 ч во все лунки, кроме четырех лунок для контроля клеток, добавляли ЧИКВ в дозе 100 ТЦД₅₀/100мкл (0,0001 MOI на клетку). В указанные сроки отбирали образцы вирусосодержащей культуральной жидкости, в которой определяли содержание РНК ЧИКВ методом ОТ-ПЦР-РВ, концентрацию изучаемых цитокинов, а также в клетках Vero — значения титра вируса.

Основной эксперимент «Экстренная профилактика». Исследовали влияние препарата на репликацию ЧИКВ в клетках линий Vero и A549 при одновременном внесении препарата и вируса. После общего этапа подготовки к опытам в 16 лунок планшета № 1 добавляли препарат в концентрации 250 мкг/мл, а в 16 лунок планшета № 2 — в концентрации 500 мкг/мл. В 8 лунок каждого планшета добавляли среду поддержки (4 лунки — для контроля клеток, 4 — для контроля вируса). Одновременно с внесением препарата во все лунки планшетов № 1 и 2 (кроме лунок для контроля клеток) вносили ЧИКВ в дозе 100 ТЦД₅₀/100 мкл (0,0001 MOI на клетку). В указанные сроки отбирали образцы вирусосодержащей культуральной жидкости, в которой определяли содержание РНК методом ОТ-ПЦР-РВ, концентрацию изучаемых цитокинов, а также в клетках Vero — значения титра вируса.

Применение препарата в режиме «Лечение» (после заражения) не проводили, так как, по данным литературы, применение препаратов ИФН, как синтетических, так и натуральных, *in vitro* и *in vivo* после инфицирования ЧИКВ значимого эффекта не приносило [9, 22–26].

Статистический анализ. Полученные данные обрабатывали с использованием стандартного

пакета программ Microsoft Office Excel 2016, а также пакета программ StatTech². Значения титров ЧИКВ представлены в виде среднего геометрического значения и стандартного отклонения от среднего значения. Концентрация цитокинов и РНК ЧИКВ в методе ОТ-ПЦР-РВ представлена как среднее арифметическое значение и стандартное отклонение. При малой выборке в группе ($n \leq 3$) достоверность различий сравниваемых величин оценивали с помощью непарного *t*-критерия Стьюдента. Сравнения проводили между максимальными значениями соответствующих показателей; для метода ОТ-ПЦР-РВ — между минимальными значениями. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Корреляцию между показателями оценивали с помощью коэффициента Пирсона (*r*).

Результаты и обсуждение

Сравнение динамики репликации вируса Чикунгунья в линиях клеток Vero и A549

Сравнение проводили на основе полученных данных — значений биологического титра вируса (выраженное в lg ТЦД₅₀/мл) и содержания РНК ЧИКВ (выраженное через C_t).

В контрольном опыте «Клетки» клеточный монослой линий Vero и A549 в динамике и в конечной точке (через 96 ч) не имел признаков цитопатического поражения.

На рисунке 1 представлена динамика активности ЧИКВ, определяемой по значению титров вируса, в клетках обеих линий в контрольном опыте «Вирус», а также в основных экспериментах.

В целом, репликация ЧИКВ в линии клеток Vero через 48 ч превосходила таковую в линии клеток A549 во всех экспериментах ($p < 0,05$), а через 96 ч разница в значениях титров ЧИКВ между линиями клеток стала еще более выраженной ($p < 0,002$). При использовании препарата в обеих дозах в режиме «Профилактика» значение титра ЧИКВ через 48 ч было ниже в обеих линиях клеток относительно контроля, и эта разница сохранялась до конца эксперимента, хотя и менее выражено ($p < 0,05$ для линии Vero, $p < 0,02$ для линии A549).

Применение препарата в обеих дозах (250 и 500 мкг/мл) в режиме «Экстренная профилактика» приводило к достоверной разнице в значениях титра ЧИКВ в обеих линиях клеток через 48 ч относительно контроля ($p < 0,05$ для линии Vero, $p < 0,02$ для линии A549). Однако уже к 72-му часу разница между контролем

² <https://stattech.ru>

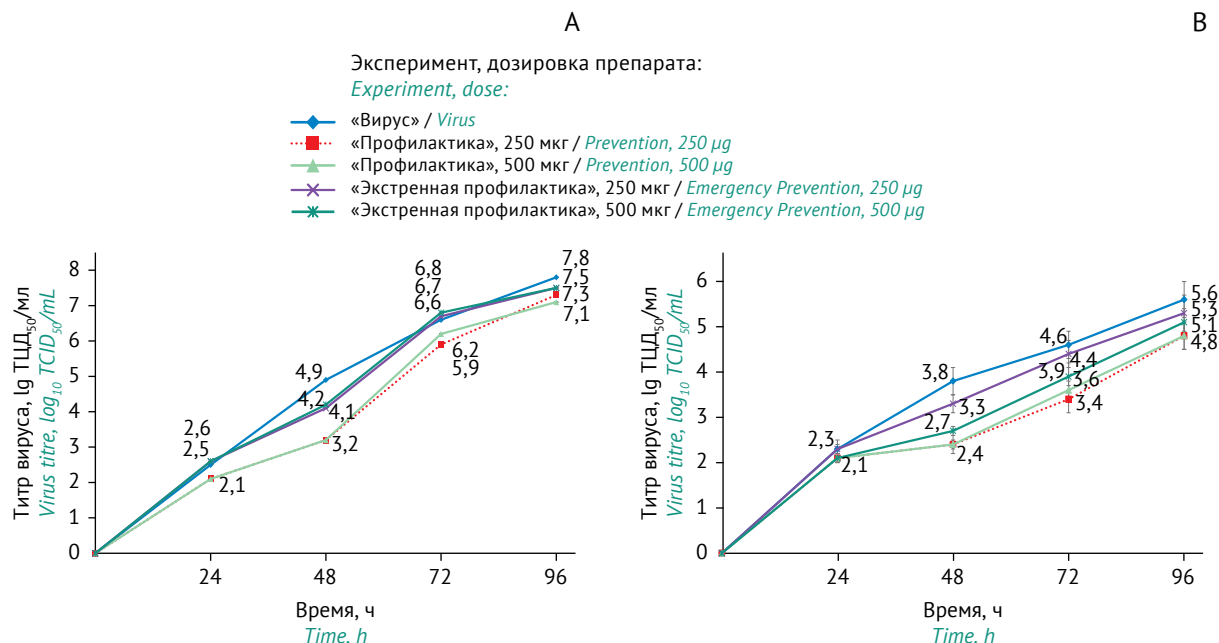


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Динамика активности ЧИКВ в линиях клеток Vero (А) и А549 (В), определяемая методом титрования. Данные представлены в виде lg TCID₅₀/мл как $M \pm m$.

Fig. 1. Time course of CHIKV activity in Vero (A) and A549 (B) cell lines, tested by titration. Data are presented as log₁₀ TCID₅₀/mL ($M \pm m$).

и основным экспериментом в линии клеток Vero исчезала, а через 96 ч разница в значениях титров ЧИКВ между контролем и основным экспериментом была недостоверна и в линии клеток A549 ($p > 0,05$). При сравнении титра ЧИКВ в клетках при использовании препарата в одном и том же режиме, но в разных дозах, статистическая разница отсутствовала ($p > 0,05$).

На рисунке 2 представлена динамика количества РНК ЧИКВ в линиях клеток Vero и A549, определяемого методом ОТ-ПЦР-РВ по показателю порогового цикла флуоресценции (C_t) в указанные часы наблюдения.

Содержание вирусной РНК в динамике во всех экспериментах по данным ОТ-ПЦР-РВ коррелировало со значениями титра вируса, коэффициент корреляции r для линий клеток Vero и A549: $-0,98$ и $-0,96$ соответственно. Динамика содержания РНК ЧИКВ соответствовала динамике значений титра вируса в клетках. В целом, содержание РНК ЧИКВ в линии клеток Vero было значительно выше, чем в линии клеток A549 ($p < 0,002$ при дозировке препарата 250 мкг/мл, $p < 0,0005$ при дозировке препарата 500 мкг/мл), во всех экспериментах. Через 96 ч в обеих линиях клеток в эксперименте «Профилактика» содержание РНК ЧИКВ было значительно ниже относительно контрольного опыта «Виррус» ($p < 0,002$ для линии Vero, $p < 0,0003$ для линии A549).

При применении препарата в режиме «Экстренная профилактика» содержание РНК ЧИКВ через 96 ч было статистически ниже относительно значений в контрольном опыте «Виррус» ($p < 0,05$ для линии Vero, $p < 0,003$ для линии A549), хоть и менее значимо, чем в режиме «Профилактика». Статистическая разница между результатами применения препарата в двух режимах в одной и той же линии клеток была недостоверна ($p > 0,05$). При сравнении значений титра ЧИКВ в клетках после применения препарата в одном и том же режиме, но в разных дозах, статистическая разница отсутствовала ($p > 0,05$).

Следует отметить, что содержание РНК ЧИКВ (по результатам ОТ-ПЦР-РВ) оказалось более наглядным показателем и позволило статистически подтвердить положительное влияние препарата. Данный феномен не был выявлен при определении титра ЧИКВ в культуре клеток. Учитывая тесную корреляцию между результатами двух методов, можно оценить метод ОТ-ПЦР-РВ как более чувствительный.

Сравнение динамики продукции цитокинов в клеточных линиях Vero и A549

На рисунках 3–6 представлена динамика продукции изученных цитокинов в обеих линиях клеток. В целом, препарат стимулировал продукцию ИФН (рис. 3–4): в большем количестве — ИФН- α , в меньшем — ИФН- γ ; в большей степени

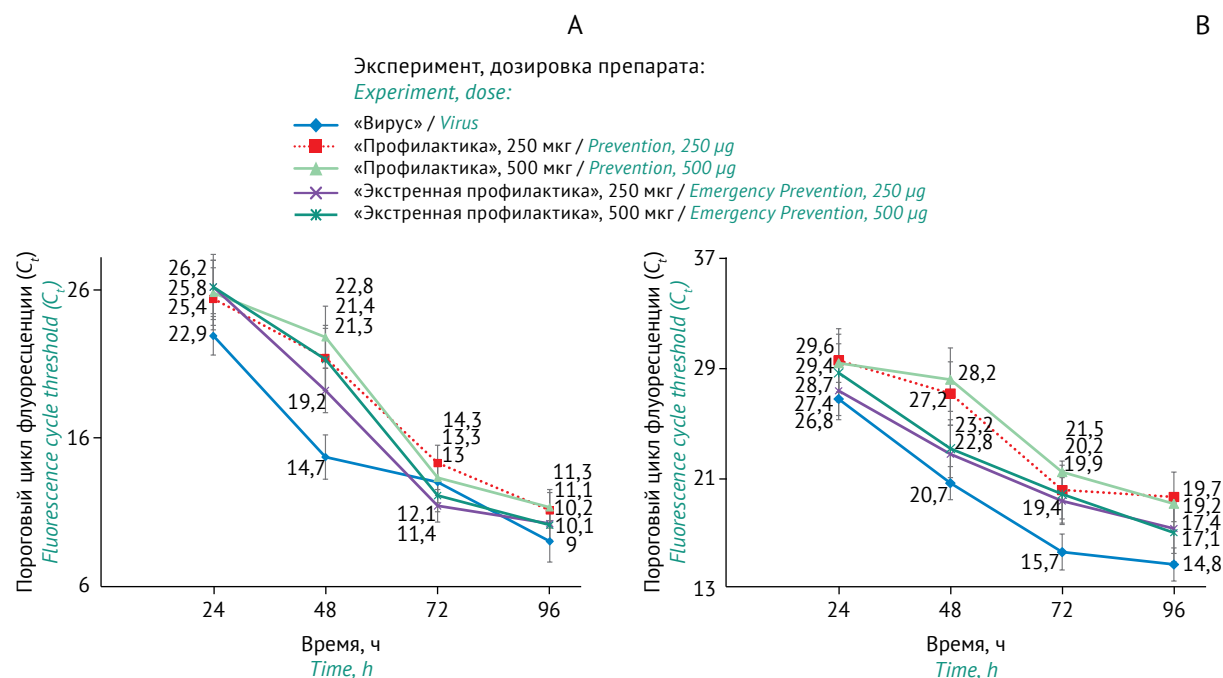


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Динамика содержания РНК ЧИКВ в линиях клеток Vero (А) и А549 (В), определяемой методом ОТ-ПЦР-РВ по показателю порогового цикла флуоресценции (C_t). Данные представлены в виде $M \pm m$.

Fig. 2. Time course of CHIKV RNA levels in Vero (A) and A549 (B) cell lines, tested by real-time RT-PCR using the fluorescence cycle threshold (C_t). Data are presented as $M \pm m$.

при дозе 500 мкг/мл, в меньшей — при дозе 250 мкг/мл; в большем количестве — в линии клеток A549, в меньшем — в линии Vero.

Прямой корреляции между активностью ЧИКВ и содержанием РНК ЧИКВ с продукцией ИФН, как α , так и γ , не выявлено.

Продукция интерферона- γ . На рисунке 3 отражена динамика продукции ИФН- γ в линии клеток A549. В линии клеток Vero в контроле «Виррус» и в обоих основных экспериментах ИФН- γ не определялся на всем протяжении наблюдения, а в контроле «Препарат» были зарегистрированы минимальные концентрации данного цитокина при дозировках 250 и 500 мкг/мл ($1,8 \pm 0,2$ и $1,6 \pm 0,2$ пг/мл соответственно) лишь однократно в точке «48 ч» ($p > 0,05$). В обоих контрольных экспериментах «Клетки» ИФН- γ не определялся на всем протяжении наблюдения.

В контрольных опытах в линии клеток A549 наблюдения за содержанием ИФН- γ показали следующее: «Виррус» — цитокин обнаружен однократно через 48 ч после заражения (рис. 3); «Препарат» — выявлен в максимальных концентрациях уже через 24 ч, его содержание было достоверно выше при дозировке препарата 500 мкг/мл ($p < 0,005$), чем при 250 мкг/мл.

В основных экспериментах в линии клеток A549 наличие ИФН- γ отмечено через 4 ч.

Максимальный уровень ИФН- γ при введении препарата в дозе 250 мкг/мл в обоих режимах (за 4 ч до заражения и одновременно с ним) практически не отличался от такового в контроле «Виррус» ($p > 0,05$). Однако при введении препарата в дозе 500 мкг/мл максимальный уровень ИФН- γ в линии клеток A549 при обоих режимах применения оказался достоверно выше, чем в контроле «Виррус» ($p < 0,01$). При режиме «Экстренная профилактика» через 96 ч ИФН- γ практически не определялся в линии клеток A549. На концентрацию ИФН- γ доза препарата оказывала более сильное влияние, чем режим.

Продукция интерферона- α . В контрольных опытах «Препарат» максимальные значения ИФН- α отмечены в обеих линиях клеток через 4 ч, статистически продукция цитокина в линии клеток A549 была выше ($p < 0,002$ для обеих доз препарата) относительно линии клеток Vero. В динамике продукция ИФН- α значительно снижалась, однако оставалась выше уровня, пройденного в точке «2 ч» ($p < 0,005$ для обеих линий клеток). В основных экспериментах концентрация ИФН- α в максимальных значениях в линии клеток Vero (рис. 4 А) была статистически ниже, чем в контрольном опыте «Препарат» ($p < 0,003$ для режима «Профилактика» и $p < 0,001$ для режима «Экстренная профилактика»). Концентрации

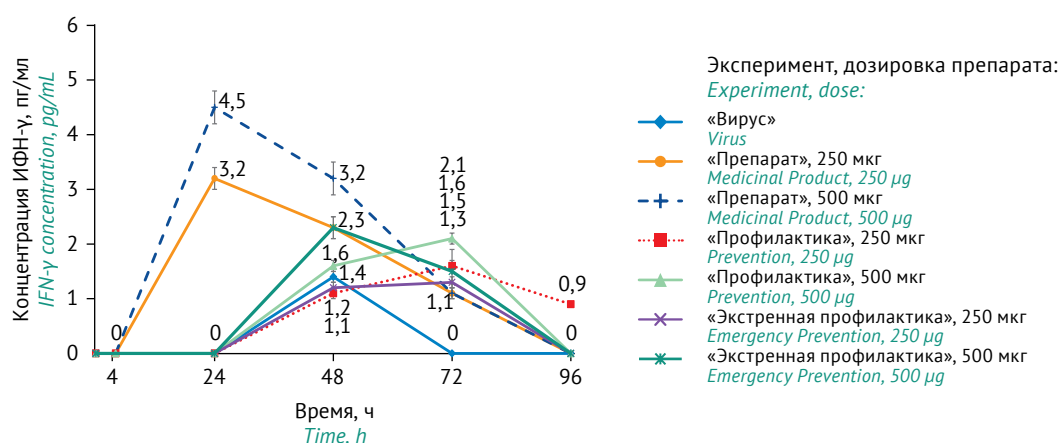


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Динамика продукции ИФН-γ в линии клеток A549, определяемого методом иммуноферментного анализа. Данные представлены как $M \pm m$.

Fig. 3. Time course of IFN-γ production by A549 cells, tested by enzyme immunoassay. Data are presented as $M \pm m$.

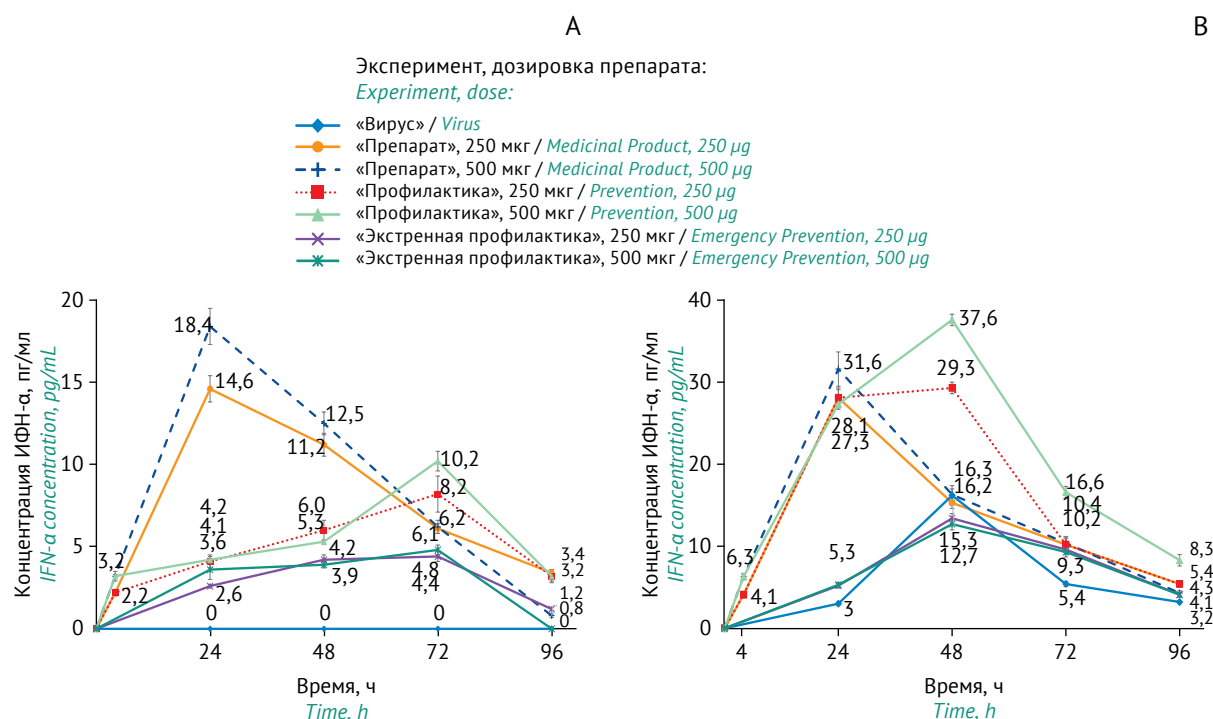


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 4. Динамика продукции ИФН-α в линиях клеток Vero (A) и A549 (B), определяемого методом иммуноферментного анализа. Данные представлены в виде $M \pm m$. Продукция ИФН-α отсутствовала на всем протяжении наблюдения: в контрольных опытах «Клетки» (в линиях Vero и A549) и «Вирус» (в линии Vero).

Fig. 4. Time course of IFN-α production by Vero (A) and A549 (B) cells, tested by enzyme immunoassay. Data are presented as $M \pm m$. No IFN-α production was observed in the Cells control experiments (both Vero and A549 cell lines) and in the Virus control experiment (Vero cell line).

ИФН-α в линии клеток Vero были статистически ниже относительно соответствующих концентраций в линии клеток A549 ($p < 0,001$ для обоих режимов применения препарата). Продукция ИФН-α в линии клеток A549 только при режиме

«Экстренная профилактика» была ниже, чем в контроле «Препарат» ($p < 0,001$), но неожиданно также ниже, чем в контроле «Вирус» ($p < 0,005$). В исследовании «Профилактика» продукция ИФН-α существенно превосходила таковую

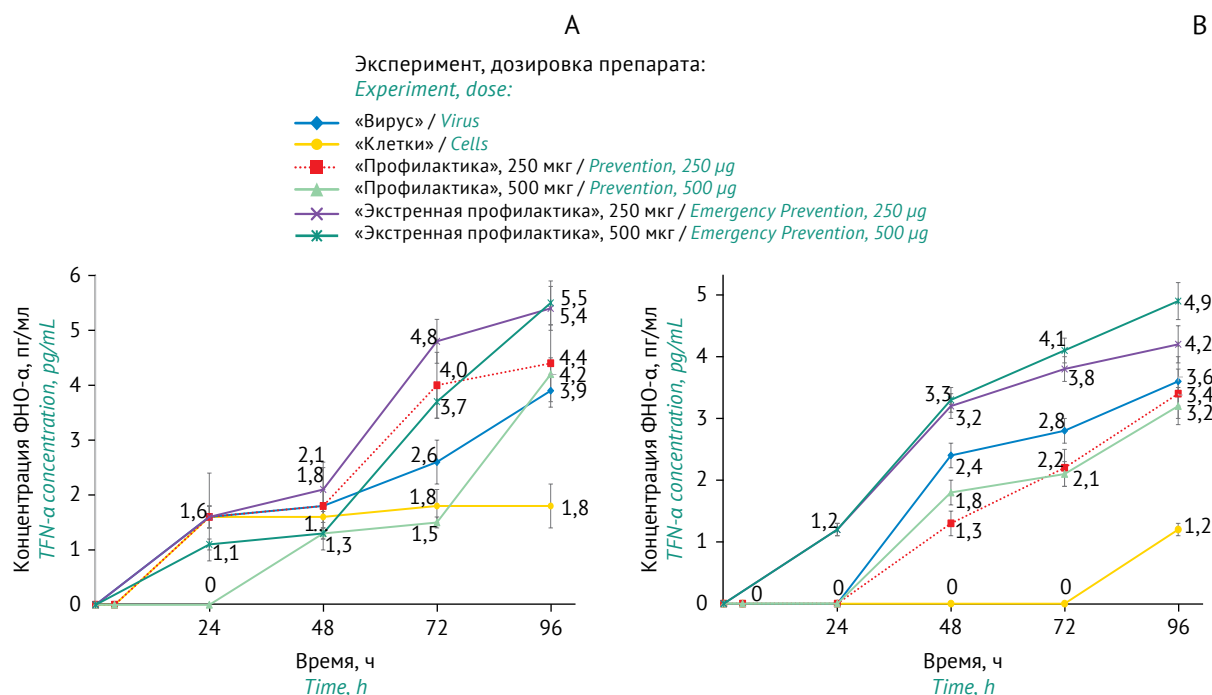


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 5. Динамика продукции ФНО-α в линиях клеток Vero (А) и А549 (В), определяемого методом иммуноферментного анализа. Данные представлены в виде $M \pm m$. В контрольном опыте «Препарат» в обеих линиях клеток ФНО-α определялся только в точке «96 ч» в тех же концентрациях, что и в контрольном опыте «Клетки» ($p > 0,05$).

Fig. 5. Time course of TNF-α production by Vero (A) and A549 (B) cells, tested by enzyme immunoassay. Data are presented as $M \pm m$. TNF-α was observed in both cell lines in the Medicinal Product control experiments only at the time point of 96 h at the same concentrations as in the Cells control experiment ($p > 0,05$).

в контрольных опытах «Виррус» ($p < 0,001$) и была близка к значениям, полученным в контрольном исследовании «Препарат» для соответствующих доз. Влияние на продукцию ИФН-α режима применения и доз препарата при его профилактическом введении было очевидным, что продемонстрировано на рис. 4 для обеих линий клеток.

Производство фактора некроза опухоли α. Максимальные значения концентрации ФНО-α зафиксированы в конце периода наблюдения во всех экспериментах для обеих линий клеток. В контрольном опыте «Клетки» в линии А549 продукция ФНО-α была обнаружена только в точке «9 ч» в отличие от линии клеток Vero, в которых продукция была отмечена уже через 24 ч (рис. 5). При сравнении значений концентраций ФНО-α в контрольном исследовании «Виррус» статистически достоверного различия между данными показателями для линий А549 и Vero не выявлено. Однако был отмечен более высокий уровень продукции этого цитокина в линии клеток Vero относительно такового в линии А549 в основных экспериментах ($p < 0,002$ при дозировке препарата 250 мкг/мл, $p < 0,0005$ при дозировке препарата 500 мкг/мл). Продукция ФНО-α в линии клеток Vero в основных экспериментах оказалась

выше, чем в контрольном исследовании «Виррус» (рис. 5 А), но статистически разница была достоверна только в эксперименте «Экстренная профилактика» ($p < 0,05$).

Аналогичная динамика продукции ФНО-α наблюдалась в линии клеток А549, но только для режима применения препарата «Экстренная профилактика» ($p < 0,01$), а вот для режима «Профилактика» отмечалась тенденция к снижению продукции ФНО-α относительно контроля «Виррус», но разница была статистически значима только в случае введения дозы препарата 500 мкг/мл ($p < 0,05$). Выявлена сильная прямая корреляция между содержанием ФНО-α и титром ЧИКВ в клетках (r от 0,95 до 0,83), а также сильная обратная корреляция с содержанием РНК ЧИКВ (r от -0,97 до -0,81) в обеих линиях клеток во всех экспериментах с заражением ЧИКВ.

Производство интерлейкина-6. В контрольном исследовании «Клетки» концентрация ИЛ-6 была статистически выше ($p < 0,002$) в клетках Vero на всем протяжении эксперимента, с максимальными значениями через 96 ч ($p < 0,005$) (рис. 6). В контрольном опыте «Препарат» (по сравнению с контрольным опытом «Клетки») продукция

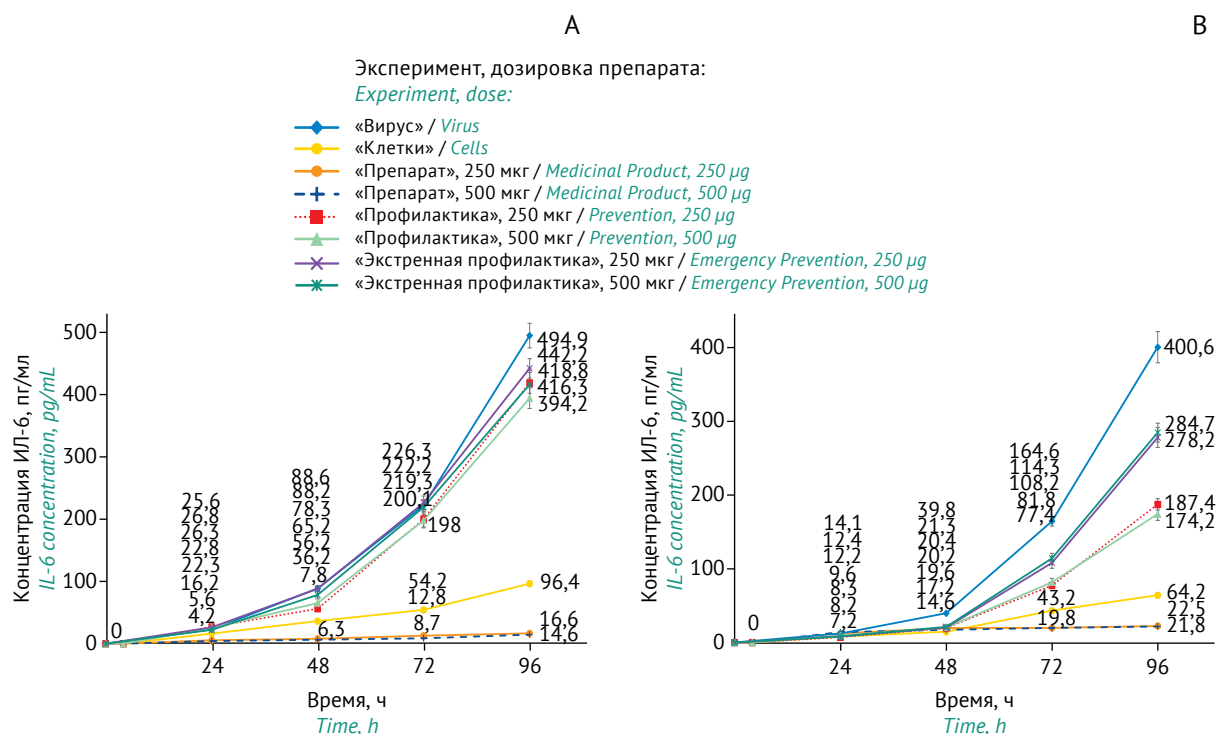


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 6. Динамика продукции ИЛ-6 в линиях клеток Vero (А) и А549 (В), определяемого методом иммуноферментного анализа. Данные представлены в виде $M \pm m$.

Fig. 6. Time course of IL-6 production by Vero (A) and A549 (B) cells, tested by enzyme immunoassay. Data are presented as $M \pm m$.

ИЛ-6 достоверно снизилась ($p < 0,0005$) в обеих линиях клеток и в случае обеих доз препарата. Так, в клетках Vero продукция ИЛ-6 снизилась в 6 раз, а в клетках А549 – в 3 раза.

Продукция ИЛ-6 в основных экспериментах была статистически ниже, чем в контрольном исследовании «Виррус», как в линии Vero, так и в линии А549 ($p < 0,01$ и $p < 0,001$ соответственно). Значительнее всего продукция ИЛ-6 была снижена по сравнению с показателем контрольного опыта «Виррус» в эксперименте «Профилактика» при введении дозы препарата 500 мкг/мл в линии клеток и Vero, и А549 ($p < 0,003$ и $p < 0,0003$ соответственно). Была выявлена сильная прямая корреляция между значениями содержания ИЛ-6 и титра ЧИКВ в клетках (r от 0,92 до 0,83), а также сильная обратная корреляция с содержанием РНК ЧИКВ (r от $-0,97$ до $-0,85$) в обеих линиях клеток во всех экспериментах с заражением ЧИКВ.

Обсуждение

Выраженный тропизм вируса к разным клеткам и тканям определяет достаточно широкий спектр клинических симптомов ЧИКВ-инфекции у человека. Тропизм ЧИКВ к разным линиям клеток проявляется в виде устойчивой репликации

вируса *in vitro*. Широко и традиционно используемые для доклинических исследований клетки линии Vero не продуцируют ИФН I типа за счет потери кластера генов ИФН I типа [16, 17] и являются дефектными по продукции ИФН α -1/13, α -2, α -4, α -6, α -8, α -14, α -17, α -21, β -1 и ω -1 [16]. Данный феномен позволяет использовать линию клеток Vero для наработки вирусов, а также для изучения *in vitro* прямого противовирусного действия тех или иных препаратов, в нашем исследовании – против ЧИКВ. Однако ранее E.J. Franco и соавт. показали, что чувствительность ЧИКВ к противовирусным препаратам *in vitro* меняется в широких пределах в зависимости от использованной клеточной линии [24]. Обнаруженная особенность подчеркивает необходимость более тщательного выбора линии клеток в зависимости от цели исследования, что особенно важно в доклинических исследованиях противовирусных препаратов. В настоящем исследовании в контрольных опытах была продемонстрирована дефектность клеток линии Vero (по продукции ИФН), которая в значительной степени повлияла на активность ЧИКВ – она ожидаемо оказалась существенно выше в данной клеточной линии. К тому же влияние препарата Радамин®Виро на продукцию ИФН- γ

было выявлено и статистически подтверждено только в линии клеток A549.

При помощи метода ОТ-ПЦР-РВ разница в эффектах применения препарата в разных режимах была подтверждена статистически. Можно сделать вывод, что клеточная линия A549 обладает объективным преимуществом (относительно линии Vero) для изучения влияния препарата индуктора ИФН на противовирусные факторы клеток при заражении ЧИКВ. Следует подчеркнуть, что, по данным мониторинга титра ЧИКВ в клетках, преимущество режима «Профилактика» не было убедительным по сравнению с экстренной профилактикой. Представляется оправданным применение двух методов контроля активности вируса при изучении эффективности противовирусных препаратов *in vitro*.

В настоящем исследовании и некоторых других работах [23, 24, 26] отмечается определенный эффект применения экзогенного ИФН против ЧИКВ-инфекции *in vitro* в линии клеток Vero. Однако эффект был кратковременным и отмечался исключительно при внесении больших, сверхтерапевтических доз препаратов [23, 24, 26]. Клетки линии Vero обладают рецепторами к ИФН и, следовательно, могут реагировать на экзогенное внесение ИФН [16]. Можно предположить, что если в опытах использовать не дефектную по ИФН линию клеток, например A549, то возможно обнаружить эффект и от обычных, терапевтических доз ИФН. Так, E.J. Franco и соавт. показали, что ИФН-α в дозе 10 МЕ/мл и более значительно снижал репликацию ЧИКВ в клетках A549, что не наблюдалось в клетках Vero [24].

Исследуемый препарат индуктора ИФН Радамин®Виро — по сути аналог препарата Ридостин (ООО «Диафарм», Россия) и так же представляет собой натриевую соль двуспиральной рибонуклеиновой кислоты (дсРНК), выделенную из *S. cerevisiae*. Механизм индукции ИФН дсРНК природного происхождения или синтетическими полинуклеотидами в целом совпадает с процессами, происходящими при индукции ИФН вирусами. Изначально происходит связывание индуктора ИФН на рецепторах чувствительных к данному индуктору клеток, далее инициируется проникновение индуктора внутрь клетки, в результате начинается экспрессия интерферон-стимулированных генов (ИСГ), их транскрипция, синтез мРНК-ИФН, трансляция и собственно продукция ИФН [29]. Таким образом, при введении в организм дсРНК стимулирует образование эндогенных ИФН-α, ИФН-β и ИФН-γ, важнейших цитокинов иммунного

ответа, которые индуцируют дифференцировку миелоидных клеток, стимулируют фагоцитоз нейтрофилов и макрофагов, активируют натуральные киллеры, усиливают Т-хелперный ответ Th1-типа и таким образом запускают врожденный и адаптивный иммунный ответ. Влияние ридостина как препарата индуктора ИФН на транскрипцию генов семейства ИФН в фибробластах и лимфоцитах человека было изучено ранее с помощью количественной ПЦР-РВ, что проявилось в увеличении транскрипции генов ИФН-β, олигоаденилатсинтетазы и дсРНК-зависимой протеинкиназы [30].

В наших экспериментах Радамин®Виро оказал выраженное стимулирующее действие на продукцию ИФН-α и более слабое воздействие на продукцию ИФН-γ, что, прежде всего, было подтверждено результатами контрольных экспериментов в интактных клетках. Опосредованное противовирусное действие препарата было подтверждено двумя методами в основных экспериментах. Данное воздействие было временным при однократном применении препарата. Влияние препарата было подтверждено в контрольном эксперименте только в линии клеток A549.

Предполагается, что действие препарата индуктора ИФН не ограничивается только индукцией ИФН, но может также предотвратить и (или) восстановить вызываемые вирусами нарушения в цитокиновой сети [31]. Вероятно, в настоящей работе впервые экспериментально исследовалось влияние Радамина®Виро на продукцию *in vitro*, кроме ИФН, таких цитокинов как ФНО-α и ИЛ-6. Продукция цитокинов в процессе жизнедеятельности клеток в состоянии монослоя была подтверждена в наших экспериментах продукцией ИЛ-6 и ФНО-α. Более того, концентрации данных цитокинов отличались между линиями клеток. Данный феномен следует принимать во внимание при исследовании *in vitro* цитокинового баланса в клетках под воздействием вирусов или тех или иных препаратов. Более того, спектр изучения исходной продукции цитокинов, который, безусловно, будет зависеть от используемой линии, должен быть достаточно широким. После однократного введения препарата продукция ФНО-α была подавлена на некоторое время, а продукция ИЛ-6 была значительно снижена до конца эксперимента в обеих линиях клеток относительно таковой в контрольных опытах «Вирус». Данный феномен можно расценить как смещение баланса в цитокиновой сети в сторону продукции ИФН при стимулирующем влиянии индуктора ИФН на ИСГ.

Как и все альфа-вирусы, ЧИКВ в клетках млекопитающих в основном вызывает драматическое отключение экспрессии генов хозяина, что приводит к супрессии врожденного иммунитета [1]. Ранее было показано, что, как только ЧИКВ начинает размножаться, его резистентность к экзогенному применению ИФН I и II типов препятствует их эффективности [2, 11]. После инфицирования ЧИКВ применение препаратов ИФН, как синтетических, так и натуральных, *in vitro* или на лабораторных животных значимого эффекта не приносило [11, 22–26]. Исследования С. Schilte и соавт. показали, что прямой противовирусный эффект ИФН I типа при ЧИКВ-инфицировании реализуется через индукцию одного или нескольких ИСГ [18]. На сегодняшний день насчитывается более 300 ИСГ. Известно, что ИФН-λ, как и ИФН-α/β, индуцируют практически одни и те же группы ИСГ [32].

М. Plotnikova и соавт. [26] проведены интересные исследования, в которых изучалась противовирусная активность рекомбинантного ИФН-λ. Подавление репликации ЧИКВ было продемонстрировано только при превентивном применении больших доз рекомбинантного человеческого ИФН-λ, также была отмечена определенная «провокация» репликации ЧИКВ в случае применения рекомбинантного ИФН-λ сразу после заражения линии клеток Vero [26]. Можно предположить конкуренцию и (или) антагонизм между ЧИКВ и препаратами индукторов ИФН (или ИФН) в борьбе за те или иные ИСГ. Исходя из этого предположения можно объяснить меньший эффект от введения препарата в режиме «Экстренная профилактика» (одновременно с заражением) в нашем исследовании, а также практически отсутствие эффекта при применении препаратов ИФН и индукторов ИФН в качестве терапевтического средства [11, 22–26].

Ранее были опубликованы краткие результаты экспериментов *in vitro*, в которых еще один препарат индукторов ИФН – тилорон продемонстрировал эффективность в профилактическом режиме применения против ЧИКВ [27]. В настоящих исследованиях применение

препарата в режиме «Профилактика» (до заражения) имело выраженное преимущество, однако и в режиме «Экстренная профилактика» препарат позволял сдерживать репликацию ЧИКВ и влиять на баланс цитокинов. Следует подчеркнуть, что в наших исследованиях Радамин®Виро применяли однократно.

Учитывая положительные результаты проведенных исследований и демонстративное преимущество линии клеток A549, далее планируется продолжить изучение эффективности препарата в линии клеток A549 с двукратным применением и в комбинации режимов «Профилактика – Лечение» и «Экстренная профилактика – Лечение» с целью поддержания продукции ИФН в течение всего периода инфицирования ЧИКВ. Также можно исследовать эффективность препарата в режиме «Лечение» на линии клеток A549 и расширить спектр изучаемых цитокинов.

Заключение

В результате экспериментальной работы обнаружен положительный противовирусный эффект превентивного применения препарата индуктора ИФН против вируса Чикунгунья *in vitro*, который был получен не только за счет стимулирования продукции цитокинов, прежде всего ИФН, но и за счет опосредованного влияния на уровень содержания ФНО-α и ИЛ-6.

Полученные данные свидетельствуют о преимуществе использования линии клеток A549 (относительно традиционно применяемой линии клеток Vero) для изучения противовирусного влияния препарата индуктора ИФН.

Продукция некоторых видов цитокинов в процессе жизнедеятельности клеток в моно-слое, выявленная в нашем эксперименте, обусловливает необходимость изучения исходной картины цитокинового баланса в разных линиях клеток *in vitro*.

Дальнейшие исследования подбора оптимальной схемы применения индуктора ИФН против вируса Чикунгунья планируется проводить с использованием линии клеток A549 и расширением спектра изучаемых цитокинов.

Литература/References

1. Kuhn RJ. *Togaviridae: the viruses and their replication*. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, eds. *Fields Virology*. Vol. 1. 5th ed. Wolters Kluwer, Lippincott-Williams & Wilkins; 2007. P. 1001–2.
2. Fros JJ, Pijlman GP. Alphavirus infection: host cell shut-off and inhibition of antiviral responses. *Viruses*. 2016;8(6):166. <https://doi.org/10.3390/v8060166>
3. Wauquier N, Becquart P, Nkoghe D, Padilla C, Ndjoyi-Mbiguino A, Leroy EM. The acute phase of Chikungunya virus infection in humans is associated with strong innate immunity and T CD8 cell activation. *J Infect Dis*. 2011;204(1):115–23. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq006>
4. Davenport BJ, Bullock C, McCarthy MK, Hawman DW, Murphy KM, Kedl RM, et al. Chikungunya virus evades antiviral CD8T cell responses to establish

- persistent infection in joint-associated tissues. *J Virol.* 2020;16(94):e02036-19.
<https://doi.org/10.1128/JVI.02036-19>
5. Schilte C, Staikovsky F, Couderc T, Madec Yo, Carpentier F, Kassab S, et al. Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(3):e2137.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002137>
 6. Marimoutou C, Ferraro J, Javelle E, Deparis X, Simon F. Chikungunya infection: self-reported rheumatic morbidity and impaired quality of life persist 6 years later. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21(7):688–93.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.02.024>
 7. Burt J F, Chen W, Miner JJ, Lenschow DJ, Merits A, Schnettler E, et al. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(4):e107–17.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30385-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30385-1)
 8. Devaux CA. Emerging and re-emerging viruses: a global challenge illustrated by Chikungunya virus outbreaks. *World J Virol.* 2012;1(1):11–22.
<https://doi.org/10.5501/wjv.v1.i1.11>
 9. Harrison VR, Eckels KH, Bartelloni PJ, Hampton C. Production and evaluation of a formalin-killed Chikungunya vaccine. *J Immunol.* 1971;107(3):643–7.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.107.3.643>
 10. Broeckel R, Haese N, Messaoudi I, Streblow DN. Nonhuman primate models of Chikungunya virus infection and disease (CHIKV NHP Model). *Pathogens.* 2015;4(3):662–81.
<https://doi.org/10.3390/pathogens4030662>
 11. Gardner CL, Burke CW, Higgs ST, Klimstra WB, Ryman KD. Interferon-alpha/beta deficiency greatly exacerbates arthritogenic disease in mice infected with wild-type Chikungunya virus but not with the cell culture-adapted live-attenuated 181/25 vaccine candidate. *Virology.* 2012;425(2):103–12.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.12.020>
 12. Couderc T, Chrétien F, Schilte C, Disson O, Brigitte M, Guivel-Benhassine F, et al. A mouse model for Chikungunya: young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. *PLoS Pathog.* 2008;4(2):e29.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040029>
 13. Ziegler SA, Lu L, da Rosa AP, Xiao SY, Tesh RB. An animal model for studying the pathogenesis of Chikungunya virus infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;79(1):133–9.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2008.79.133>
 14. Battisti V, Urban E, Langer T. Antivirals against the Chikungunya virus. *Viruses.* 2021;13(7):1307.
<https://doi.org/10.3390/v13071307>
 15. Emeny JM, Morgan MJ. Regulation of the interferon system: evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production. *J Gen Virol.* 1979;43(1):247–52.
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-43-1-247>
 16. Osada N, Kohara A, Yamaji T, Hirayama N, Kasai F, Sekizuka T, et al. The genome landscape of the African green monkey kidney-derived Vero cell line. *DNA Res.* 2014;21(6):673–83.
<https://doi.org/10.1093/dnares/dsu029>
 17. Konishi K, Yamaji T, Sakuma C, Kasai F, Endo T, Kohara A, et al. Whole-genome sequencing of Vero E6 (Vero C1008) and comparative analysis of four Vero cell sublines. *Front Genet.* 2022;13:801382.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2022.801382>
 18. Schilte C, Couderc T, Chretien F, Sourisseau M, Gangneux N, Guivel-Benhassine F, et al. Type I IFN controls Chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells. *J Exp Med.* 2010;207(2):429–42.
<https://doi.org/10.1084/jem.20090851>
 19. White LK, Sali T, Alvarado D, Gatti E, Pierre P, Streblow D, Defilippis VR. Chikungunya virus induces IPS-1-dependent innate immune activation and protein kinase R-independent translational shutoff. *J Virol.* 2011;85(1):606–20.
<https://doi.org/10.1128/JVI.00767-10>
 20. Cook LE, Locke MC, Young AR, Monte K, Hedberg ML, Shimak RM, et al. Distinct roles of interferon alpha and beta in controlling Chikungunya virus replication and modulating neutrophil-mediated inflammation. *J Virol.* 2019;94(1):e00841-19.
<https://doi.org/10.1128/JVI.00841-19>
 21. Chirathaworn C, Chansaenroj J, Poovorawan Y. Cytokines and chemokines in Chikungunya virus infection: protection or induction of pathology. *Pathogens.* 2020;9(6):415.
<https://doi.org/10.3390/pathogens9060415>
 22. Fros JJ, Liu WJ, Prow NA, Geertsema C, Ligtenberg M, Vanlandingham DL, et al. Chikungunya virus nonstructural protein 2 inhibits type I/II interferon-stimulated JAK-STAT signaling. *J Virol.* 2010;84(20):10877–87.
<https://doi.org/10.1128/JVI.00949-10>
 23. Gallegos KM, Drusano GL, Argenio DZ, Brown AN. Chikungunya virus: *in vitro* response to combination therapy with ribavirin and interferon alfa 2a. *J Infect Dis.* 2016;214(8):1192–7.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiw358>
 24. Franco EJ, Rodriguez JL, Pomeroy JJ, Hanrahan KC, Brown AN. The effectiveness of antiviral agents with broad-spectrum activity against chikungunya virus varies between host cell lines. *Antivir Chem Chemother.* 2018;26:2040206618807580.
<https://doi.org/10.1177/2040206618807580>
 25. Grabarz F, Lopes APY, Barbosa FF, Barazzzone GC, Santos JC, Botosso VF, et al. Strategies for the production of soluble interferon-alpha *Consensus* and potential application in arboviruses and SARS-CoV-2. *Life (Basel).* 2021;11(6):460.
<https://doi.org/10.3390/life11060460>
 26. Plotnikova M, Lozhkov A, Romanovskaya-Romanko E, Baranovskaya I, Sergeeva M, Kaa K, et al. IFN-λ1 Displays various levels of antiviral activity *in vitro* in a select panel of RNA viruses. *Viruses.* 2021;13(8):1602.
<https://doi.org/10.3390/v13081602>
 27. Ekens S, Madrid PB, Tilorone, a broad-spectrum antiviral for emerging viruses. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020;64(5):e00440-20.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00440-20>
 28. Игнатьев ГМ, Каа КВ, Оксанич АС, Антонова ЛП, Самарцева ТГ, Мефед КМ и др. Индикация и идентификация вирусов денге и Чикунгунья в комарах

- рода *Aedes* spp., отловленных в Центральной Америке. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020;97(3):227–32.
- Ignatyev GM, Kaa KV, Oksanich AS, Antonova LP, Samartseva TG, Mefed KM, et al. Indication and identification of Dengue and Chikungunya viruses in *Aedes* spp. mosquitoes captured in Central America. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2020;97(3):227–32 (In Russ.).
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-3-4>
29. Gantier MP, Williams BR. The response of mammalian cells to double-stranded RNA. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2007;18(5–6):363–71.
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2007.06.016>
30. Sokolova TM, Shuvalov AN, Telkov MV, Kolyadzhnaya LV, Ershov FI. Ridostin induces transcription of a wide spectrum of interferon genes in human cells. *Bull Exp Biol Med*. 2013;156(2):213–6.
<https://doi.org/10.1007/s10517-013-2313-z>
31. Полосков ВВ, Ершов ФИ. Активаторы синтеза эндогенных интерферонов (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(1):188–92.
- Poloskov VV, Ershov FI. Activation of synthesis of endogenous interferon (review). *Drug Development & Registration*. 2017;(1):188–92 (In Russ.).
EDN: [YKPHKX](https://doi.org/10.1007/s10517-013-2313-z)
32. Schoggins JW. Interferon-stimulated genes: what do they all do? *Annu Rev Virol*. 2019;6(1):567–84.
<https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015756>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Е.В. Отрашевская** – анализ и интерпретация результатов исследований, статистическая обработка данных, написание и оформление текста; **К.В. Каа** – участие в экспериментальных исследованиях, интерпретация результатов исследований, работа с графическим материалом; **Т.Г. Самарцева** – участие в экспериментальных исследованиях; **А.С. Оксанич** – разработка дизайна, концепции и проведение молекулярно-биологических исследований, критический анализ текста рукописи; **Г.М. Игнатьев** – разработка дизайна исследований; руководство и непосредственное участие в выполнении исследования; утверждение окончательной версии статьи для публикации; ответственность за все аспекты работы, подлежащее изучению и решению вопросов, связанных с достоверностью данных или целостностью всех частей статьи.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **E.V. Otrachevskaja** analysed and interpreted the study results, conducted statistical data analysis, drafted and formatted the manuscript. **K.V. Kaa** conducted experiments, interpreted the study results, and designed the graphical material. **T.G. Samartseva** conducted experiments. **A.S. Oksanich** designed and conceptualised the study, conducted molecular and biological experiments, critically analysed the manuscript. **G.M. Ignatyev** designed the study, supervised and conducted experiments, approved the final version of the manuscript for publication, agreed to be accountable for all aspects of the work and to ensure appropriate investigation and resolution of the issues related to the reliability of data or the integrity of all parts of the work.

Об авторах / Authors

Отрашевская Елена Викторовна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2491-4072>
e.v.otrashevskaja@mail.ru

Каа Константин Владимирович

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8446-1853>
kaa_23@mail.ru

Самарцева Татьяна Геннадьевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3264-6722>

Оксанич Алексей Сергеевич, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8600-7347>
oksanich@yahoo.com

Игнатьев Георгий Михайлович, д-р мед. наук, проф.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>
marburgman@mail.ru

Elena V. Otrachevskaja

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2491-4072>
e.v.otrashevskaja@mail.ru

Konstantin V. Kaa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8446-1853>
kaa_23@mail.ru

Tatiana G. Samartseva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3264-6722>

Aleksey S. Oksanich, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8600-7347>
oksanich@yahoo.com

George M. Ignatyev, Dr. Sci. (Med.), Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>
marburgman@mail.ru

Поступила 11.07.2023

После доработки 20.11.2023

Принята к публикации 24.11.2023

Received 11 July 2023

Revised 20 November 2023

Accepted 24 November 2023