

**Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого
Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций**

На правах рукописи

Ложков Алексей Александрович

Изучение роли интерферонов лямбда в патогенезе вируса гриппа А у мышей

Направление подготовки 03.06.01 Физика и астрономия

Код и наименование

Направленность 03.06.01_12 Биофизика

Код и наименование

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

об основных результатах научно-квалификационной работы (диссертации)

Автор работы: Ложков Алексей
Александрович

Научный руководитель:
доцент, доктор биологических наук,
Васин Андрей Владимирович

Санкт Петербург – 2021

Научно-квалификационная работа выполнена в Высшей инженерной-физической школе Института физики, нанотехнологий и телекоммуникаций федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», а также на базе лаборатории разработки молекулярных диагностических систем, отдела молекулярной биологии вирусов ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Директор ВШ/Зав.каф. :

Журихина Валентина Владимировна,
доктор физико-математических наук,
профессор, Высшая инженерно-
физическая школа

Научный руководитель:

Васин Андрей Владимирович,
доктор биологических наук, профессор,
и.о. директора Высшей школы
биомедицинских систем и
биотехнологий

Рецензент:

Цыбалова Людмила Марковна,
доктор медицинских наук,
ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.
Смородинцева» Минздрава России,
зав. лабораторией гриппозных вакцин

С научным докладом можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» и на сайте Электронной библиотеки СПбПУ по адресу: <http://elib.spbstu.ru>

Общая характеристика работы

Актуальность работы

В ответ на вирусную инфекцию происходит активация компонентов врожденного иммунного ответа [1]. Интерфероны (Interferons, IFN) играют важнейшую роль в иммунном ответе, подавляя распространение вирусной инфекции на ранних стадиях заболевания, и формируют первую линию защиты против вирусных инфекций у млекопитающих [2, 3, 4]. Если противовирусные свойства IFN 1-го типа широко изучены [5], то об особенностях IFN 3-го типа (IFN- λ) известно значительно меньше [6, 7].

В организме человека обнаружено четыре подтипа IFN- λ : IFN- λ 1 (IL-29), IFN- λ 2 (IL-28A), IFN- λ 3 (IL-28B) и IFN- λ 4. Данные белки являются продуктами генов *IFNL1-4*. Среди IFN- λ 1-3 наблюдается высокая консервативность аминокислотной последовательности [7,8], тогда как IFN- λ 4 значительно отличается от остальных IFN 3-го типа [6]. Экспрессия IFN- λ 4 обусловлена наличием полиморфизма ss469415590 (ТТ/ΔG) в гене *IFNL4* и, следовательно, ограничена только частью популяции, являющейся носителем данного аллельного варианта [9, 10]. Действие IFN- λ на клетку осуществляется за счет связывания с гетеродимерным рецептором IFNLR, состоящим из субъединиц IFN λ R1 и IL10R2. Связывание IFN- λ с рецептором приводит к димеризации субъединиц рецептора, и активации JAK/STAT-зависимых сигнальных путей: активации тирозинкиназ JAK1 и Tyk2, фосфорилированию субъединиц рецептора, рекрутированию и последующему фосфорилированию белков STAT1 и STAT2, а также в меньшей степени STAT3-STAT5, формированию транскрипционного комплекса ISGF3. Комплекс ISGF3 образуется также и в ответ на действие IFN 1-го типа. Следовательно, функции IFN- λ значительно перекрываются с функциями IFN 1-го типа и вызывают экспрессию аналогичных *ISGs* (*Interferon stimulated genes*), к продуктам которых относятся проявляющие выраженную противовирусную активность белки MxA, OAS, PKR, IFITM [3,5,6,7]. Помимо активации JAK/STAT сигнальных каскадов, IFN- λ активируют и MAPK сигнальные пути, включающие киназы Erk, Jnk и p38 [7].

Селективность действия IFN 3-го типа обусловлена особенностями экспрессии субъединиц его рецептора. Субъединица IL10R2, помимо IFNLR, входит в состав рецепторных комплексов для IL-10, IL-22 и IL-26 и экспрессируется в клетках различных тканей [8]. Тканевый профиль экспрессии субъединицы IFN λ R1 ограничен, в основном, эпителиальными клетками кератиноцитами, дифференцированными дендритными клетками и гепатоцитами. В моноцитах и В-клетках обнаружен низкий уровень экспрессии IFN λ R1, в силу чего они крайне слабо отвечают на действие IFN- λ . Следовательно, действие IFN- λ главным образом направлено на слизистые дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта [6,7]. Такая тканевая специфичность коррелирует с противовирусной активностью IFN- λ , которая проявляется преимущественно по отношению к вирусам с повышенным тропизмом к клеткам эпителиальных тканей [11]. К таким вирусам относятся, в частности, вирус гриппа А (Influenza A virus, IAV), вирус гриппа В (Influenza B virus, IBV), респираторно-синцитиальный вирус (RSV), аденовирус (AdV).

Кинетика экспрессии генов *IFNL* в ответ на стимуляцию лигандами PRR изучена не полностью. Так, на клетках РВМС и фибробластах показано, что пик экспрессии гена *IFNL3* наблюдается через 24 часа после заражения цитомегаловирусом, в то время как для *IFNL1* – через 6 часов после заражения [6]. При стимуляции клеток poly(I-C) дцРНК (агонист TLR-3, локализованных как на клеточной поверхности, так и в эндосомах [12]) отмечен более ранний пик экспрессии *IFNL* [6].

Показано, что IFN 1-го типа и IFN- λ независимо друг от друга способны индуцировать экспрессию противовирусных ISGs [4,13,14]. При отсутствии обоих механизмов противовирусной защиты наблюдается потеря способности к индукции ISGs, что указывает на отсутствие дополнительных механизмов, обеспечивающих активацию данных генов [13,14]. Однако, способность IFN- λ вызывать активацию более узкой группы генов в сравнительно небольшой группе клеток-мишеней, экспрессирующих IFNLR, позволяет считать данный тип интерферонов перспективным терапевтическим агентом, который может вызывать более направленные противовирусные и иммунный ответы чем интерфероны 1-го типа [4,11].

Несмотря на десятилетия активного изучения и существенные успехи вакцинопрофилактики, высокая заболеваемость вирусом гриппа остается существенной проблемой здравоохранения. Во всем мире ежегодные сезонные эпидемии являются причиной гибели до полумиллиона человек [1]. В силу высокой частоты мутаций в геноме вируса гриппа на данный момент не представляется возможным создать универсальную вакцину, которая обеспечила бы надежную защиту против всех возможных штаммов. Использование противовирусных препаратов сопряжено с риском возникновения резистентных штаммов [15]. Одним из перспективных подходов является стимуляция компонентов врожденного иммунного ответа организма, путем введения экзогенного IFN- λ [1].

Цель и задачи исследования

Целью работы является оценка противовирусной активности рекомбинантного человеческого IFN- $\lambda 1$ по отношению к респираторным вирусам человека *in vitro* и *in vivo*.

Для достижения заявленной цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Определить динамику экспрессии *IFNL* в ответ на заражение клеток A549 вирусом гриппа А, вирусом гриппа В, респираторно-синцитиальным вирусом и аденовирусом 5-го типа;
- 2) Оценить уровень IFN- λ , секретируемого клетками A549 в ответ на заражение респираторными вирусами;
- 3) Определить динамику экспрессии *MxA* в ответ на заражение респираторными вирусами;
- 4) Оценить биологическую и противовирусную активность рекомбинантного IFN- $\lambda 1$ *in vitro*;
- 5) Оценить уровень секреции мышинных IFN- λ в ответ на летальную гриппозную инфекцию на самках мышей линии Balb/c;
- 6) Оценить противовирусную активность рекомбинантного человеческого IFN- $\lambda 1$ и мышинового IFN- $\lambda 3$ *in vivo*.

Научная новизна

В работе впервые было проведено непосредственное сравнение противовирусной активности человеческого IFN- $\lambda 1$ и мышинового IFN- $\lambda 3$ на мышах линии Balb/c. Само по себе использование IFN- λ в качестве потенциального терапевтического препарата не является новой идеей, однако в большинстве исследований применяли мышинные IFN- λ [4,11,13,14]. Информация о кросс-видовом противовирусном действии человеческих IFN- λ на организм мыши встречается крайне редко. В целом считается, что IFN- α обладают выраженной видовой специфичностью, однако в работе было показано протективное действие человеческого IFN- $\alpha 2b$ при летальной гриппозной инфекции на мышах линии Balb/c. Новизна исследования заключается не только в

комбинации выбранных препаратов, но и в оценке влияния экзогенных IFN на продукцию эндогенного IFN-λ и цитокинов второй волны. Кроме того, в впервые был определен профиль экспрессии *IFNL* в ответ на заражение аденовирусом 5-го типа на клетках A549.

Теоретическая и практическая значимость работы

Исследование компонентов врожденного иммунного ответа является одним из актуальных направлений современной молекулярной вирусологии. Перспективным подходом неспецифической профилактики и лечения респираторных вирусных инфекций является применение IFN-λ, что требует детального изучения его роли, как важного провоспалительного медиатора в патогенезе гриппозной инфекции. В ходе работы проводилась оценка противовирусной активности рекомбинантных IFN-λ1 человека и IFN-λ3 мыши. Оба препарата IFN (первый показал противовирусную активность *in vitro* на клетках A549; второй – на мышьях линии Balb/c) можно рассматривать в качестве потенциальных терапевтических средств не только против вирусов гриппа А, но и по отношению к широкому спектру других РНК-содержащих вирусов. Задача поиска новых терапевтических противовирусных средств является актуальной.

Апробация работы и публикации

По результатам, представленным в работе, было опубликовано 5 печатных работ, две из них в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных WoS и Scopus, три – в сборниках тезисов всероссийских и международных конференций.

Основные положения, выносимые на защиту

- 1) Введение мышинового IFN-λ3 по профилактической схеме позволяет снизить смертность при летальной гриппозной инфекции, снизить вирусную нагрузку на третьи сутки после заражения.
- 2) Рекомбинантный IFN-λ1 человека проявляет противовирусную активность на линии клеток A549 по отношению к штаммам IAV A/California/07/09 (H1N1pdm09) и A/California/04/2009, он не способен защитить мышьях линии Balb/c от летальной гриппозной инфекции.
- 3) Преимуществом мышинового IFN-λ3 по сравнению с препаратом сравнения, IFN-α2b, является более быстрое выздоровление подопытных животных. Восстановление массы тела при лечении IFN-λ3 наблюдалось начиная с 6-ых суток после заражения, в то время как при лечении IFN-α2b мышьях начинали набирать вес только через 12 дней после заражения.

1 Материалы и методы

1.1 Вирусы

В работе были использованы штаммы вирусов, находящихся в коллекции ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. Для заражения клеток использовали следующие штаммы вируса гриппа: A/California/07/09 (H1N1pdm09); A/Texas/50/12 (H3N2); B/Phuket/3073/13. Также был использован респираторно-синцитиальный вирус (штамм A2) и аденовирус 5-го типа. Штаммы вирусов гриппа накапливали на куриных эмбрионах. После накопления штамма проводили очистку методом центрифугирования в градиенте сахарозы. Титр вируса определяли с помощью титрования на клетках MDCK.

1.2 Заражение клеток

Клетки A549 засеивали в 12 луночные планшеты в количестве 10^5 клеток/лунку в среде F12K+10%FBS+1% GlutaMax. Через сутки клетки отмывали DPBS от компонентов питательной среды, клетки заражали в дозе 1 MOI в объеме 500 мкл питательной среды F12K+1% GlutaMax. Заражение штаммом В/Phuket/3073/13 производилось в дозе 0,2 MOI в том же объеме. Длительность контакта вирусных частиц с клетками составила 1 час, заражение проводилось без трипсина. По истечении часа инкубации в CO₂-инкубаторе (37°C, 5% CO₂) вирусные суспензии удаляли, лунки планшета отмывали DPBS и в лунки планшета вносили питательную среду F12K+1% GlutaMax. Инкубация проводилась в CO₂-инкубаторе (37 °C, 5% CO₂) в течении 4, 8 или 24 часов. После завершения периода инкубации супернатанты отбирали, лунки планшета промывали и проводили выделение РНК.

1.3 Выделение РНК

Выделение РНК из клеток A549 производилось с помощью TRIzol (Invitrogen, США), согласно инструкциям производителя. Концентрацию выделенной РНК измеряли с использованием спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, США).

1.4 Обратная транскрипция

Обратная транскрипция осуществлялась с помощью обратной транскриптазы М- MLV (Promega, США). Смесь 2 µg тотальной РНК и 1 µg oligo(dT)16 праймеров (ДНК- синтез, Россия) доводили MQ-водой до объема 12 µl. Смесь инкубировали при 70 °C в течении 5 минут, затем охлаждали на льду и добавляли следующий микст (5 µl MMLV 5x Reaction Buffer (Promega), 1,5 µl 5 mM dNTPs (Promega), 1 µl М-MLV RT (Promega), 5,5 µl MQ-вода). Синтез кДНК проводили при 42 °C в течении часа. Затем инактивировали М- MLV обратную транскриптазу путем нагревания (65 °C, 5 минут). Полученную кДНК хранили при -20 °C.

1.5 Реал-тайм ПЦР

Мультиплекс для оценки экспрессии *IFNL1*, *IFNL2/3* имел конечный объем 20 µl и содержал: 10 µl буферного раствора БиоМастер HS-qPCR (2x) (БиоЛабМикс, Россия), 2 µl кДНК, по 0,5 µl каждого из праймеров и зонда, 9,5 MQ-воды. Таким образом, на одну реакцию уходило по 5 пкмоль праймеров и зондов. Амплификацию проводили при следующих условиях: активация при 95 °C в течении 5 минут; 40 циклов двухстадийной амплификации: 95 °C в течении 10 секунд, 64 °C в течении 30 секунд. Детекцию флуоресцентного сигнала проводили при 64 °C.

Для оценки экспрессии вирусных генов были использованы следующие коммерческие наборы: CDC Influenza A/B Typing Kit (# FluIVD03-1) (Centers for Disease Control and Prevention, USA), Real-time RT-PCR Assay for RSV (Centers for Disease Control and Prevention, USA).

1.6 Подбор праймеров и зондов

Последовательности мРНК для *IFNL1*, *IFNL2/3*, *IFNL1R1*, *IL10R2* были взяты из базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Праймеры подбирали таким образом, чтобы они связывались с разными интронами интересующей мРНК. Праймеры и зонды, содержащие флуоресцентную метку на 5'-конце и гаситель на 3'-конце, были синтезированы фирмой (Евроген, Россия). В **таблице 1** представлены используемые в работе праймеры и зонды.

Таблица 1 – Праймеры и зонды

Ген	Позиция	Последовательность, 5'-3'
<i>IFNL1</i>	qH_IFNL1_F192	GTCACCTCAAGCTGAAAAACTGGA
<i>IFNL1</i>	qH_IFNL1_R580	GGTCCCATCGGCCACATATT
<i>IFNL1</i>	qH_IFNL1_O277	(FAM)-TTCTCCAGGTGAGGGAGCGCC-(BHQ1)
<i>IFNL2-3</i>	qH_IFNL2/3_F347	GAGGGCCAAAGATGCCTTAGAA
<i>IFNL2-3</i>	qH_IFNL2/3_R518	AGTGTCAGCGGTGGCCT
<i>IFNL2-3</i>	qH_IFNL2/3_O453	(HEX)-GCAGCTGCAGGTGAGGGAGC-(BHQ1)
<i>MxA</i>	qH_MxA_F2345	GAGACAATCGTGAAACAGCAAATCA
<i>MxA</i>	qH_MxA_R2449	TATCGAAACTCTGTGAAAGCAAGC
<i>MxA</i>	qH_MxA_O2373	(HEX)-CACTGGAAGAGCCGGCTGGGATATG-(BHQ1)
<i>GAPDH</i>	qH_GAPDH_F23	CAGTCAGCCGCATCTTCTTTTTCGCTCG
<i>GAPDH</i>	qH_GAPDH_R152	CAGAGTTAAAAGCAGCCCTGGTGACCAG
<i>GAPDH</i>	qH_GAPDH_78	(FAM)-TGGGGAAGGTGAAGGTCCGAGTCAACGG ATTTGGTC-(BHQ1)

1.7 ИФА

Для оценки уровня человеческого IFN- λ использовали коммерческий набор Human IL-29/IL-28B (IFN-lambda 1/3) DuoSet ELISA (DY1598B, R&D Systems, USA). Для оценки уровня мышинового IFN- λ использовали коммерческий набор Mouse IL-28A/B DuoSet ELISA (DY1589B, R&D Systems, USA). Для оценки уровня мышинных интерлейкинов были использованы следующие захватывающие антитела: Purified rat anti Mouse IL-2 (BD Pharmingen, 554424, USA), Purified rat anti Mouse IL-4 (BD Pharmingen, 554434, USA), Purified anti Mouse IL-10 (BD Pharmingen, 559063, USA), Purified rat anti Mouse IFN- γ (BD Pharmingen, 551309, USA). Используемые детектирующие антитела: Biotin rat anti Mouse IL-2 (BD Pharmingen, 554426, USA), Biotin rat anti Mouse IL-4 (BD Pharmingen, 554390, USA), Biotin rat anti Mouse IL-10 (BD Pharmingen, 554465, USA), Biotin anti Mouse IFN- γ (BD Pharmingen, 551506, USA). Вирусная нагрузка была померена при помощи антител, производимых ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, как описанов работе [16].

1.8 Инфицирование лабораторных животных

Для работы были использованы двухмесячные самки линии Balb/c. За сутки до заражения мышам интраназально, под легкой эфирной анестезией, вводили препараты человеческого IFN- λ 1, мышинового IFN- λ 3 и препарата сравнения, человеческого IFN- α 2b. Концентрация всех трех препаратов составляла 167 мкг/мл. Таким образом, каждое животное получало по 5 мкг препарата, что соответствовало дозе 250 мкг/кг живого веса. Заражение проводилось интраназально под легкой эфирной анестезией. Объем заражения составлял 30 мкл, содержащий IAV в известной дозе. Для определения вирусной нагрузки была проведена гомогенизация легких мышей с помощью прибора Tissue Lyser II (Qiagen) в растворе DPBS (Биолот) с добавлением 1%-го антибиотика-антимикотика (Gibco). Осветленная центрифугированием 10%-ная легочная суспензия использовалась для определения наличия инфекционного вируса методом титрования в культуре клеток MDCK. Определение вирусной нагрузки проводили методом ИФА. Также, в гомогенате легких проводили измерение мышинных цитокинов.

1.9 Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных была произведена с помощью программы Microsoft

Excel. Программа GraphPad Prism была использована для оценки достоверности различий и создания графического оформления.

2 Результаты и обсуждение

2.1 Определение вирусной нагрузки в клетках A549

На первом этапе исследования была проведена вирус-специфическая оценка профиля экспрессии *IFNL* в ответ на заражение различными респираторными вирусами гриппа A/California/07/09 (H1N1pdm09), A/Texas/50/12 (H3N2) и B/Phuket/3073/13, респираторно-синцициальным вирусом (штамм A2) и аденовирусом 5-го типа (штамм Adenoid 75). Для оценки эффективности репликации изучаемых вирусов в клетках A549 были определены вирусная нагрузка в супернатантах клеточных культур и уровень экспрессии вирусного генома. В качестве стандартов использовали очищенные вирусные суспензии, в которых по методу Лоури была измерена концентрация тотального белка. Оценка вирусной нагрузки (**рисунок 1a**) показала, что все вирусы были способны продуктивно размножаться в выбранном клеточной культуре. Оценка динамики репликации вирусного генома (**рисунок 1b**) показала, что все выбранные вирусы способны эффективно реплицироваться в клетках A549.

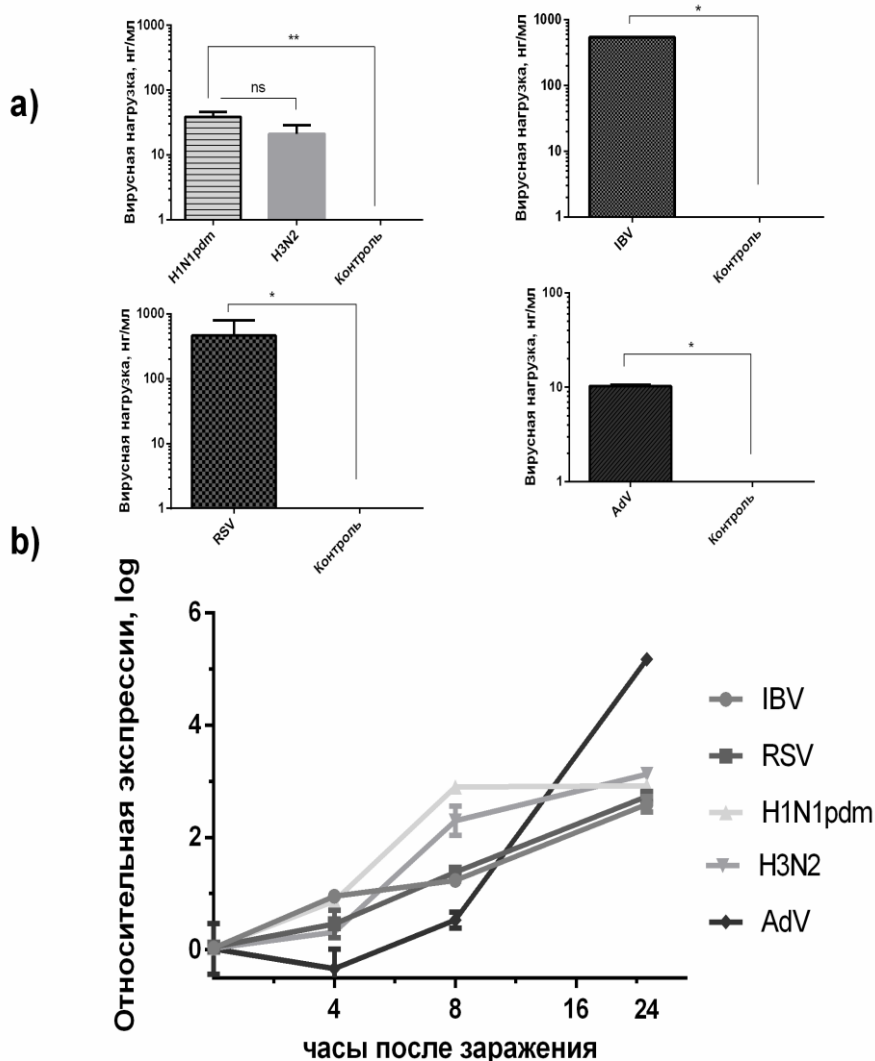


Рисунок 1. а) Вирусная нагрузка в супернатантах клеточных культур через 24 часа после

заражения. В качестве стандартов использованы очищенные вирусные суспензии, в которых по методу Лоури определена концентрация тотального белка. Группы: H1N1pdm – IAV (штамм A/California/07/09 (H1N1pdm09)); H3N2 – IAV (штамм A/Texas/50/12 (H3N2)); IBV (штамм B/Phuket/3073/13); RSV (штамм A2); Контроль – незараженные клетки A549; * – $P < 0,05$ по сравнению с контролем (критерий Манна-Уитни). б) Оценка экспрессии вирусного генома через 4, 8 и 24 часа после заражения клеток A549 данными вирусами.

2.2 Оценка динамики экспрессии *IFNL* на уровне транскрипции

Оценку уровня экспрессии генов *IFNL1* и *IFNL2/3* в инфицированных клетках A-549 проводили через 4, 8 и 24 часа после заражения. Изменение экспрессии генов *IFNL* носило вирусоспецифический характер. Если в точке 4 часа после заражения IAV уровень экспрессии *IFNL1* был незначительно повышен по сравнению с контролем, то в последующих временных точках наблюдалось монотонное возрастание уровня экспрессии данного гена (**рисунок 2**). В случае штамма A/California/07/09pdm через сутки после заражения экспрессия *IFNL1* возросла более чем в 1000 раз. В свою очередь, в ответ на заражение штаммом A/Texas/50/12 (H3N2) уровень экспрессии *IFNL1* был также повышен примерно в 500 раз через сутки после заражения. Кинетика экспрессии *IFNL1* в ответ на заражение IBV имела принципиально другой характер. Уже через 4 часа после заражения наблюдалось увеличение уровня *IFNL1* более чем в 1000 раз по сравнению с контролем. В дальнейшем, уровень *IFNL1* не возрастал. RSV индуцировал схожий профиль экспрессии *IFNL1* с тем, что наблюдался для IAV. В случае RSV отмечено умеренное возрастание уровня экспрессии *IFNL1* в течение первых 8 часов после заражения и резкий скачок в более чем 100 раз в период между 8 и 24 часами после заражения. Через сутки после заражения именно для RSV отмечен наиболее высокий уровень мРНК *IFNL1*.

Самый высокий уровень экспрессии генов *IFNL2/3* был отмечен при заражении клеток RSV (**рисунок 3**). Уровень мРНК *IFNL2/3* был повышен более чем на 4 порядка по сравнению с интактными клетками. Как и в случае *IFNL1*, уже через 4 часа после заражения вирусом B/Phuket/3073/13 экспрессия *IFNL2/3* была существенно повышена, однако пик экспрессии *IFNL2/3* приходился на временную точку 8 часов после заражения. IAV индуцировал умеренное увеличение экспрессии *IFNL2/3*. Вирусы гриппа А подтипов H1N1 и H3N2 демонстрировали сходную кинетику экспрессии *IFNL2/3*, однако во всех временных точках вирус подтипа H3N2 индуцировал несколько более высокий уровень экспрессии данных генов (отличия особенно заметны через 4 и 8 часов после заражения).

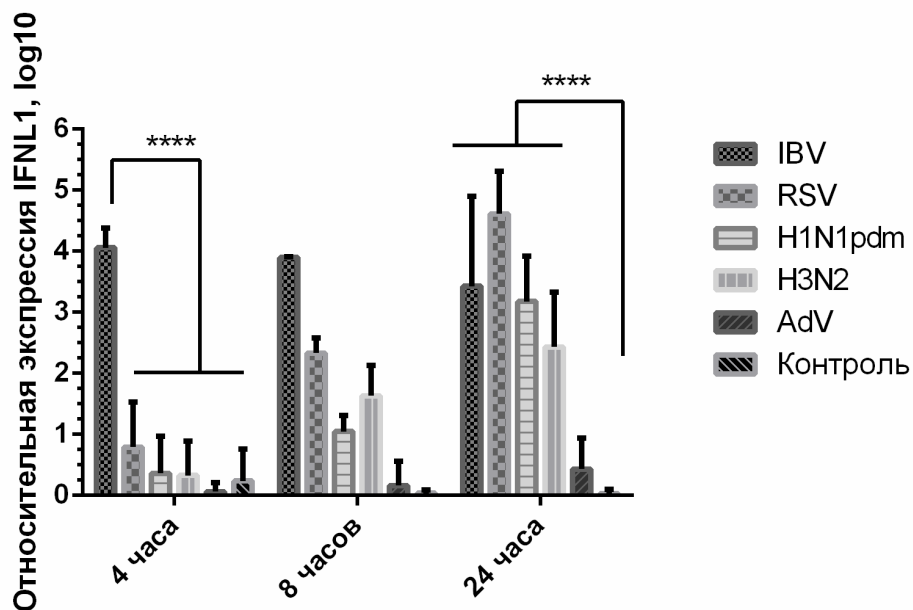


Рисунок 2. Изменение уровня экспрессии *IFNL1* при заражении респираторными вирусами через 4, 8, 24 часа после заражения. По оси ОУ отложена относительная экспрессия гена, за единицу взят минимальный уровень экспрессии *IFNL1* интактными клетками. Группы: H1N1pdm – IAV (штамм A/California/07/09 (H1N1pdm09)); H3N2 – IAV (штамм A/Texas/50/12 (H3N2)); IBV (штамм B/Phuket/3073/13); RSV (штамм A2); Контроль – незараженные клетки A549; **** – $P < 0,001$ по сравнению с контролем в данной временной точке, использован статистический критерий 2-way ANOVA и критерий Tukey для множественных сравнений.

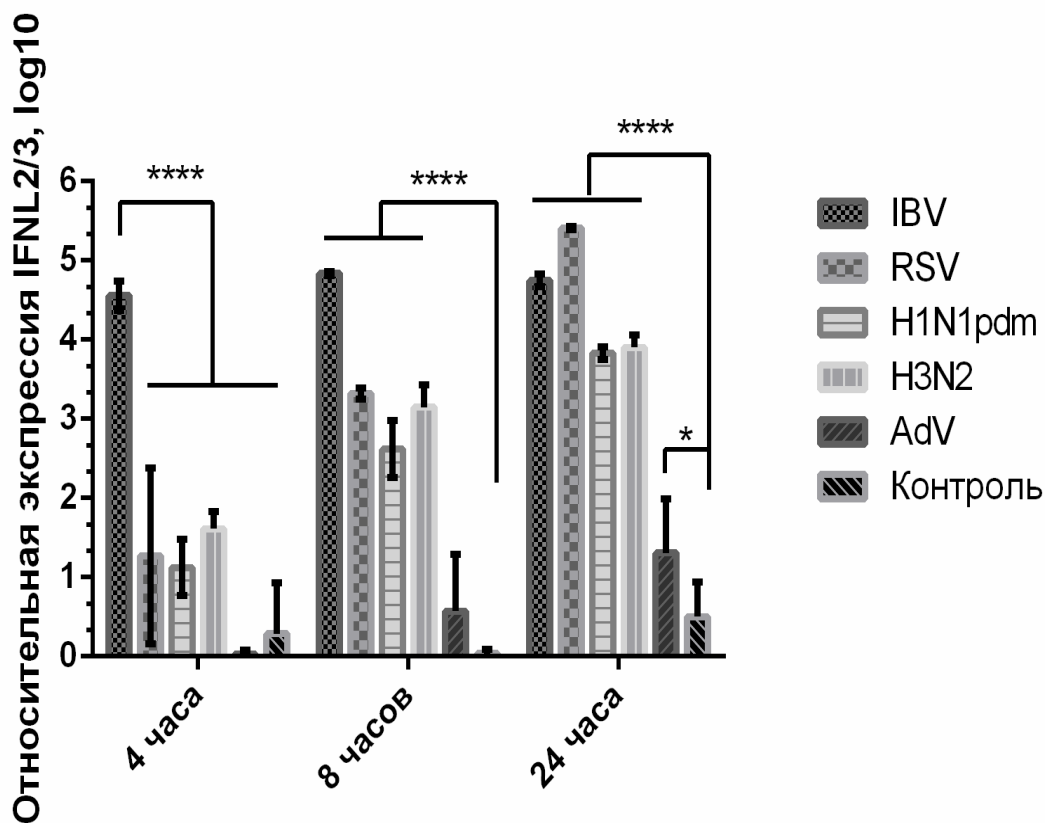


Рисунок 3. Изменение уровня экспрессии *IFNL2/3* при заражении респираторными вирусами через 4, 8, 24 часа после заражения. По оси ОУ отложена относительная экспрессия гена, за единицу взят минимальный уровень экспрессии *IFNL2/3* интактными клетками. Группы: H1N1pdm – IAV (штамм A/California/07/09 (H1N1pdm09)); H3N2 – IAV (штамм A/Texas/50/12 (H3N2)); IBV (штамм B/Phuket/3073/13); RSV (штамм A2); Контроль – незараженные клетки A549; * – $P < 0,05$; **** – $P < 0,001$ по сравнению с контролем в данной временной точке, использован статистический критерий 2-way ANOVA и критерий Tukey для множественных сравнений.

2.3 Определение уровня внеклеточного IFN-λ *in vitro*

Помимо оценки экспрессии генов *IFNL1* и *IFNL2/3* на уровне транскрипции, было определено количество секретируемого IFN-λ в супернатантах клеточных культур с использованием набора DuoSet ELISA (DY1598B, R&D Systems, США). Было выявлено, что достоверное увеличение уровня IFN-λ наблюдается только при заражении клеток A-549 IBV и RSV (рисунок 4). В свою очередь, изменения уровня IFN-λ при заражении IAV выявлено не было. Эти данные, в целом, коррелируют с оценкой экспрессии *IFNL*. Таким образом, нами показано, что на уровне белка и мРНК присутствовали различные профили IFN-λ, что может быть связано с присущей каждому вирусу индивидуальной способностью подавлять врожденный иммунный ответ. В случае инфицирования клеток обоими подтипами ВГА достоверного повышения уровня IFN-λ выявлено не было.

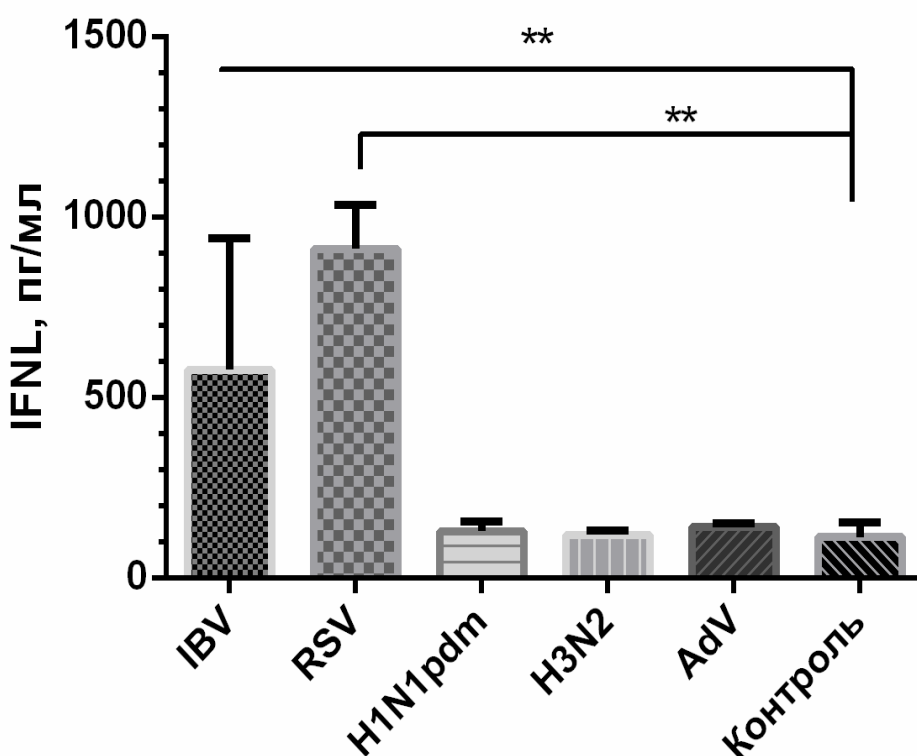


Рисунок 4. Изменение уровня IFN-λ в супернатантах клеток A549 через 24 часа после заражения респираторными вирусами. По оси ОУ отложена концентрация IFN-λ в пг/мл. Группы: H1N1pdm – IAV (штамм A/California/07/09 (H1N1pdm09)); H3N2 – IAV (штамм A/Texas/50/12 (H3N2)); IBV (штамм B/Phuket/3073/13); RSV (штамм A2); Контроль – незараженные клетки A549; ** – $P < 0,01$ по сравнению с контролем, использованы статистические критерии Краскела-Уоллиса и критерий

Данна для множественных сравнений.

2.4 Оценка динамики экспрессии MxA

Как известно, IFN 1-го и 3-го типов индуцируют экспрессию *ISGs*. Одним из ключевых противовирусных *ISGs* является ген *MxA*. Белки семейства Mx относятся к ГТФ-связывающим белкам и проявляют противовирусную активность в отношении широкого спектра РНК-содержащих вирусов. Предположительно, они распознают нуклеокапсид-подобные структуры и ограничивают их распространение в клетке, снижая таким образом уровень вирусной репликации [5]. Следовательно, можно ожидать, что повышение уровня IFN-λ приведет к индукции экспрессии данного канонического противовирусного гена.

Оценка кинетики экспрессии *MxA* через 4, 8 и 24 часа после заражения показала тесную связь экспрессии *MxA* и *IFNL*. Через 4 часа после заражения IBV было отмечено достоверное возрастание экспрессии *MxA* примерно на два порядка, в остальных случаях различия не были достоверными (рисунок 5). Через 8 часов после заражения обнаружено повышение в случае IBV, H3N2, RSV (не менее чем на порядок). В случае заражения пандемическим штаммом A/California/07/09pdm (H1N1pdm09) индукция *MxA* была не столь значительной, но уровень экспрессии достоверно отличался от контроля.

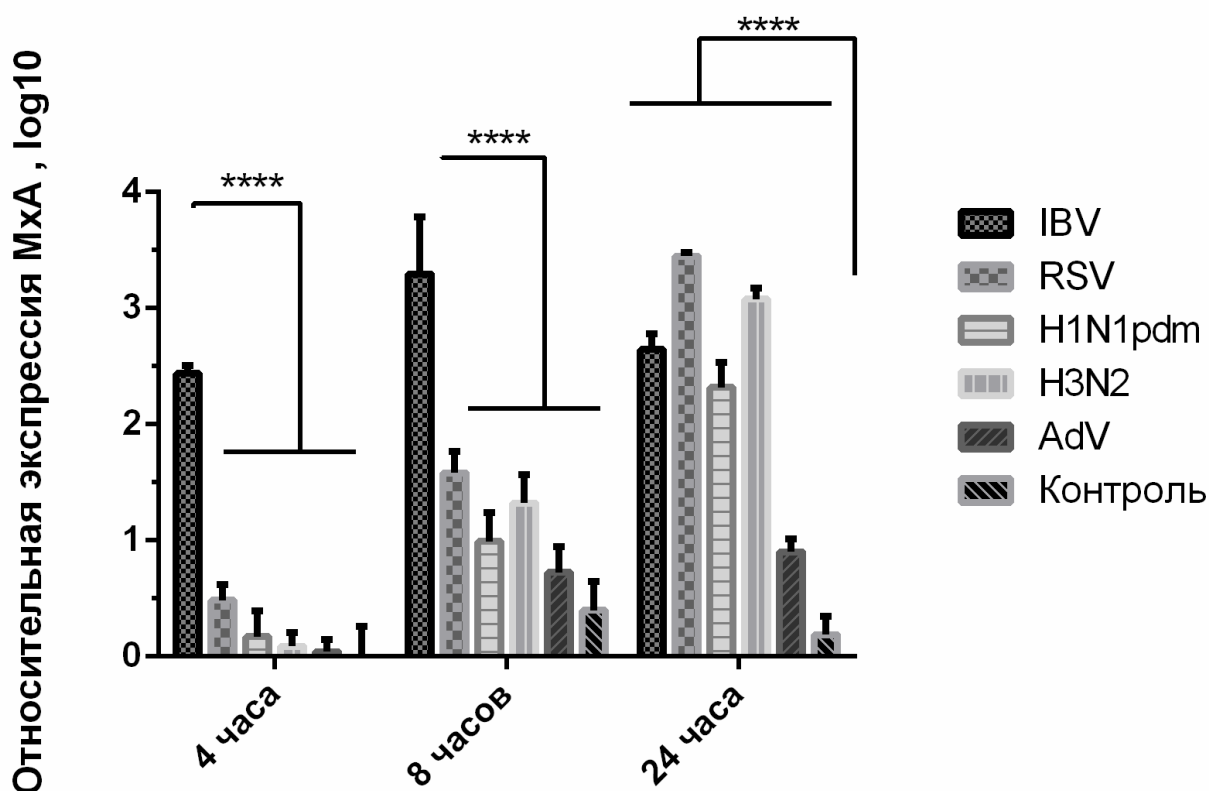


Рисунок 5. Изменение уровня экспрессии *MxA* при заражении респираторными вирусами через 4, 8, 24 часа после заражения. По оси ОУ отложена относительная экспрессия гена, за единицу взят минимальный уровень экспрессии *MxA* интактными клетками. Группы: H1N1pdm – IAV (штамм A/California/07/09 (H1N1pdm09)); H3N2 – IAV (штамм A/Texas/50/12 (H3N2)); IBV (штамм B/Phuket/3073/13); RSV (штамм A2); Контроль – незараженные клетки A549; **** – $P < 0,001$ по сравнению с контролем в данной временной точке, использован критерий 2-way ANOVA и критерий Tukey для множественных сравнений.

Через сутки после заражения был отмечен существенный прирост экспрессии *MxA* при заражении RSV. Данная динамика напоминала картину, характерную для изменения экспрессии *IFNL2/3*. Следовательно, можно заключить, что рост экспрессии *IFNL2/3* в значительной степени синхронизирован с приростом уровня мРНК *MxA*. В случае IBV, так же как при анализе экспрессии *IFNL2/3*, наблюдалось некоторое снижение количества мРНК *MxA*, и, следовательно, для IBV пик экспрессии *MxA* приходился на вторую временную точку (8 часов после заражения). Динамика экспрессии *MxA* при заражении IAV в целом напоминала картину, наблюдаемую при заражении клеток A549 RSV, и через сутки после заражения отмечена значительная экспрессия *MxA*.

Была обнаружена корреляция между экспрессией *MxA* и экспрессией *IFNL1* и *IFNL2/3* в случае заражения клеток IAV (таблица 2). В данном случае коэффициент корреляции между экспрессией *MxA* и *IFNL2/3* был не ниже 0,9 и превышал значения коэффициента корреляции между *MxA* и *IFNL1*, что является подтверждением тесной связи экспрессии *IFNL2/3* и данного антивирусного ISG. Хотя заражение IBV приводит к резкому накоплению мРНК и *MxA*, и *IFNL*, достоверной корреляции между данными генами выявлено не было.

Таблица 2 – Корреляция между экспрессией *MxA* и *IFNL1*, *IFNL2/3*, *IFNLRI* в случае заражения клеток различными респираторными вирусами.

Virus	H1			H3			IBV		
<i>MxA</i>	<i>IFNL1</i>	<i>IFNL2/3</i>	<i>IFNLRI</i>	<i>IFNL1</i>	<i>IFNL2/3</i>	<i>IFNLRI</i>	<i>IFNL1</i>	<i>IFNL2/3</i>	<i>IFNLRI</i>
r	0,7619	0,9167	0,4333	0,8201	0,9667	0,6167	0,3599	0,0576	0,0831
P (two-tailed)	0,0368	0,0013	0,2499	0,0096	0,0002	0,0857	0,0096	0,0002	0,0857
P value summary	**	***	ns	**	***	ns	ns	ns	ns

Virus	RSV			AdV			Cntr		
<i>MxA</i>	<i>IFNL1</i>	<i>IFNL2/3</i>	<i>IFNLRI</i>	<i>IFNL1</i>	<i>IFNL2/3</i>	<i>IFNLRI</i>	<i>IFNL1</i>	<i>IFNL2/3</i>	<i>IFNLRI</i>
r	0,8833	0,9333	0,4833	0,6212	0,156	0,4091	0,3453	-0,0406	0,1602
P (two-tailed)	0,0031	0,0007	0,1938	0,0467	0,6495	0,2141	0,1604	0,8728	0,5254
P value summary	**	***	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns

Коэффициент *r* определяет наличие Spearman nonparametric correlation; * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$; *** - $P < 0,001$.

Таким образом, было выяснено что, что на уровне белка и мРНК присутствовали различные профили IFNs, что, на наш взгляд, может быть связано с присущей каждому вирусу индивидуальной способностью подавлять врожденный иммунный ответ. Так, (A)H1N1pdm09 подавлял продукцию IFN- λ на уровне белка, тем самым модулируя силу врождённого иммунного ответа. В силу этого на следующем этапе работы было исследовано, насколько внесение экзогенного IFN- $\lambda 1$ способно активировать факторы специфической противовирусной защиты.

2.5 Анализ полученного рекомбинантного IFN- $\lambda 1$

В ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России было осуществлено клонирование рекомбинантного белка IFN- $\lambda 1$ человека в *Escherichia coli*. Нарботанный IFN- $\lambda 1$ был выделен из телец включения и очищен. Рефолдинг белка проводился в PBS, содержащим 0,1% Твин-20. На первом этапе работы требовалось доказать наличие целевого белка в

полученном после рефолдинга образце. Образец был подвергнут электрофорезу в полиакриламидном геле (SDS-PAGE), затем гель окрасили Coomassie Brilliant Blue G-250 (**рисунок 6**). На дорожках, куда был внесен лизат клеток, присутствует белковая смесь, которая формирует сложную мозаичную картину. Наиболее широкий бэнд соответствует белку с массой между 20 и 25 кДа. На крайнюю правую дорожку был внесен очищенный образец («Целевой белок»).

На дорожках, куда был внесен полученный после рефолдинга образец, присутствовал единственный бэнд на молекулярную массу около 25 кДа. Молекулярная масса IFN- λ 1 составляет 21,4 кДа, однако при электрофорезе в восстанавливающих условиях наблюдается бэнд на несколько большую молекулярную массу (в районе 25-30 кДа). Содержащий бэнд участок геля вырезали и подвергли триптическому гидролизу. Полученный в результате гидролиза продукт использовали для получения MALDI-TOF масс-спектров. В результате масс-спектрометрии данный белок был идентифицирован как человеческий IFN- λ 1 (**рисунок 7**), о чем свидетельствует значение величины Score, которое превышает пороговое значение.

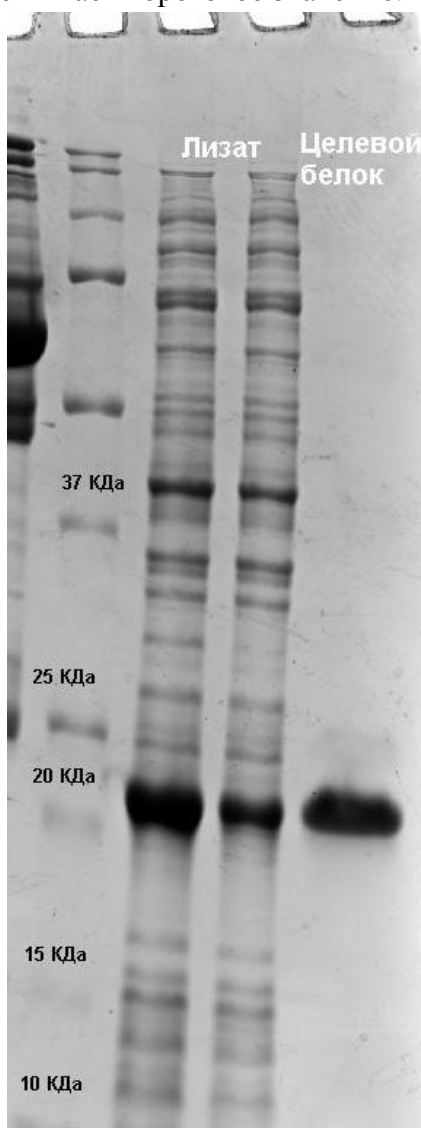


Рисунок 6. Окраска Кумасси. Наличие бэнда в фракции «целевой белок» свидетельствует о селективном выделении белка из присутствующей в клеточной культуре белковой смеси. Данный бэнд был вырезан для MALDI-TOF масс-спектрометрии.

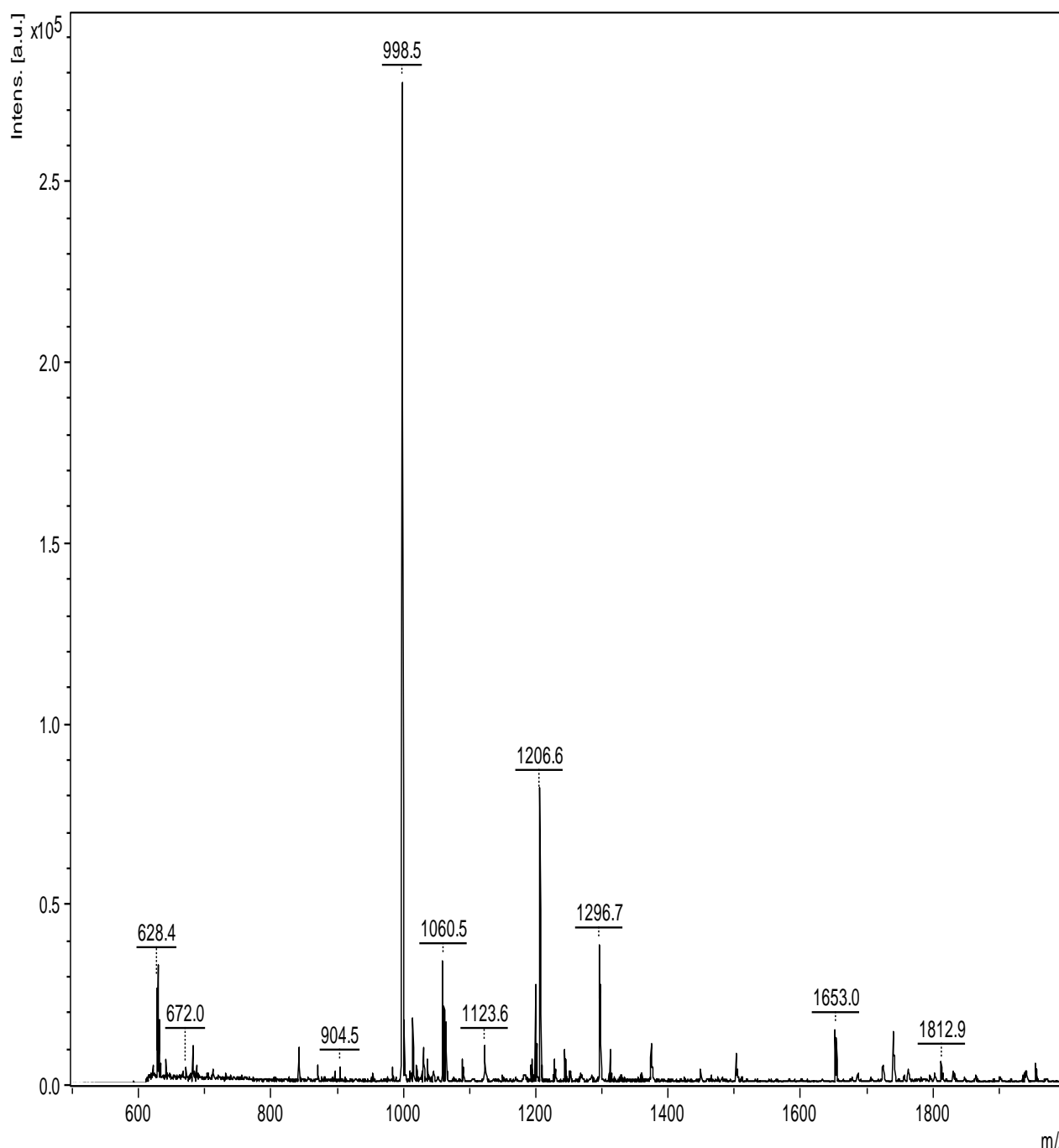


Рисунок 7. MALDI масс-спектр, полученный с помощью триптического гидролиза. Диапазон 500-2000 Да. Белок идентифицирован как человеческий IFN-λ1; величина Score = 96 (пороговое значение 56). В случае, если Score больше порогового значения, то событие является достоверным ($p < 0,05$).

2.6 Оценка биологической активности рекомбинантного IFN-λ1

Методом ОТ-ПЦР была показана биологическая активность IFN-λ1. Отмечено повышение уровня экспрессии гена *MxA* при обработке в течении 10 часов клеток линии A549 IFN-λ1 в концентрации 10 нг/мл по сравнению с интактными A549. Уровень экспрессии *MxA* возрос примерно на два порядка (рисунок 8). Так как *MxA* относится к группе *ISG*, то возрастание уровня экспрессии данного гена можно считать надежным свидетельством биологической активности полученного IFN-λ1. Стоит отметить, что при заражении A549 вирусом гриппа

A/California/04/2009 уровень экспрессии *MxA* возрастал примерно на три порядка, что согласуется с представлениями о данном белке как о маркере вирусной инфекции [17].

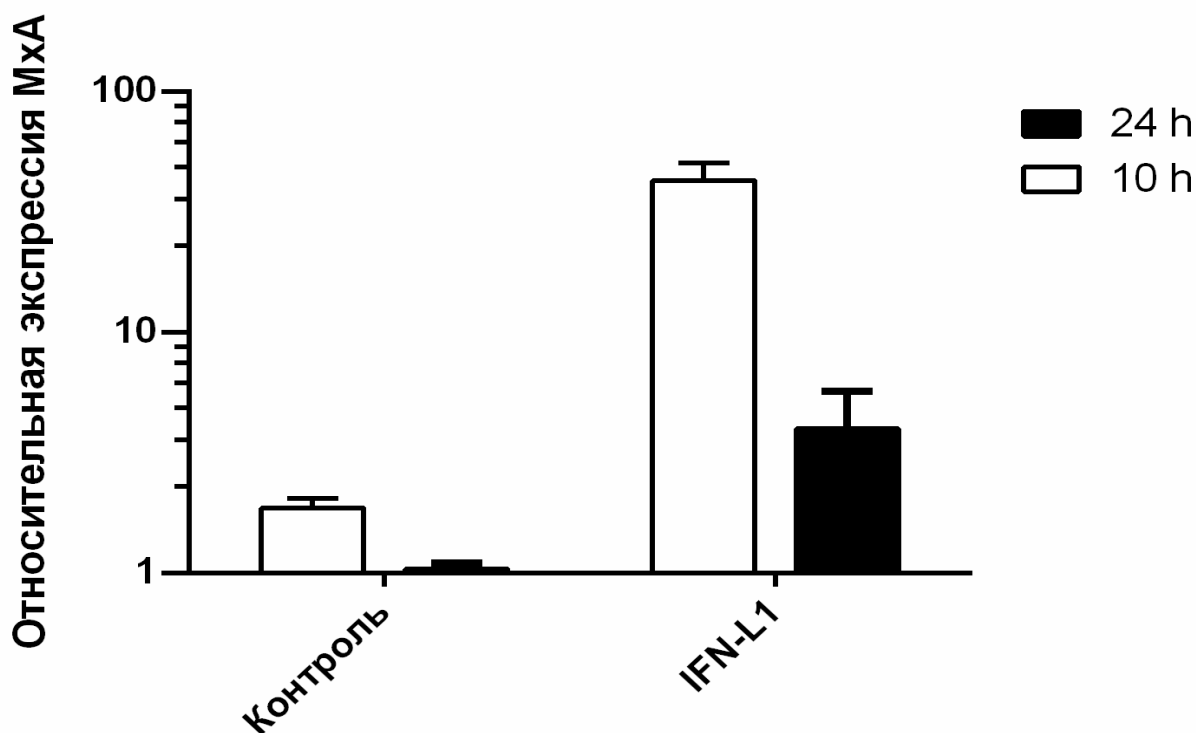


Рисунок 8. Изменение уровня экспрессии *MxA* при обработке клеток A549 рекомбинантным IFN- λ 1 в дозе 10 нг/мл. По оси ординат показан относительный уровень экспрессии гена, по оси абсцисс указаны условия инкубации клеток.

2.7 Оценка противовирусной активности рекомбинантного IFN- λ 1

В предыдущих экспериментах было показано различие в профилях экспрессии IFNs для разных вирусов, что связано с присущей каждому вирусу индивидуальной способностью подавлять врожденный иммунный ответ. На следующем этапе работы было изучено, насколько внесение экзогенного IFN- λ 1 способно активировать факторы специфической противовирусной защиты.

Внесение рекомбинантного IFN- λ 1 в концентрации 500 нг/мл в среду клеток A549 приводило к увеличению экспрессии противовирусных генов *MxA*, *EIF2AK*, *OAS-1*, *RIG-1*, *SOCS-1* в случае инфицирования клеток (A)H1N1pdm09 через 8 hpi. Как вирусное заражение, так и стимуляция IFN- λ 1 приводили к повышению уровня мРНК *IFNB*, и в случае сочетания данных факторов наблюдался аддитивный эффект (рисунок 9). Таким образом, в случае гриппозной инфекции предварительная обработка клеток IFN- λ 1 позволяет активировать экспрессию канонических противовирусных ISGs.

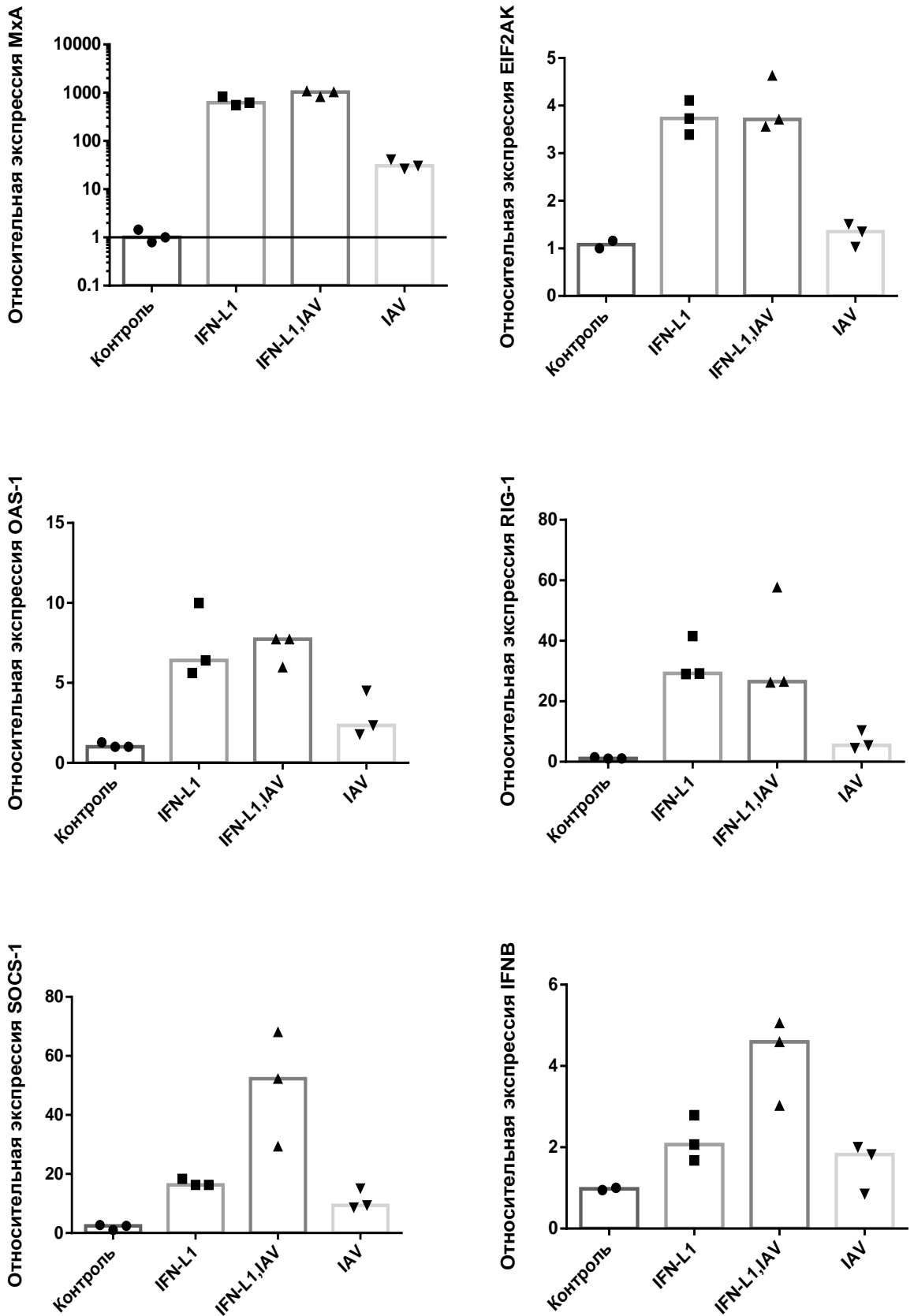


Рисунок 9. Изменение уровня экспрессии генов *MxA*, *EIF2AK*, *OAS-1*, *RIG-1*, *SOCS-1*, *IFNB*. По оси ординат показан относительный уровень экспрессии гена, по оси абсцисс указаны условия

инкубации клеток. Группы: Контроль – незараженные клетки A549; IFN-L1 – внесен рекомбинантный IFN-λ1 в дозе 10 нг/мл; IAV – клетки заражены IAV (штамм A/California/07/09 (H1N1pdm09)); IFN-L1, IAV – клетки предобработаны рекомбинантным IFN-λ1 в дозе 10 нг/мл и затем заражены IAV.

Было продемонстрировано противовирусное действие IFN-λ1 по отношению к штамму вируса гриппа A/California/04/2009. В лизатах клеток A549 показано достоверное снижение вирусной нагрузки в уже дозах 0,064 MOI, различия также были и при более низком уровне вирусной нагрузки – вплоть до 0,001 MOI (**рисунок 10**). Для каждой из концентраций вируса в диапазоне 0,001-0,064 MOI наблюдалось дозозависимое снижение титра вируса по сравнению с необработанными IFN-λ1 клетками A549. Значение IC50, концентрации препарата, приводящей к двукратному снижению вирусной нагрузки, воспроизводилось в приведенных на **рисунок 10** дозах заражения и лежало в диапазоне $11,9 \pm 7,1$ нг/мл ($P < 0,05$).

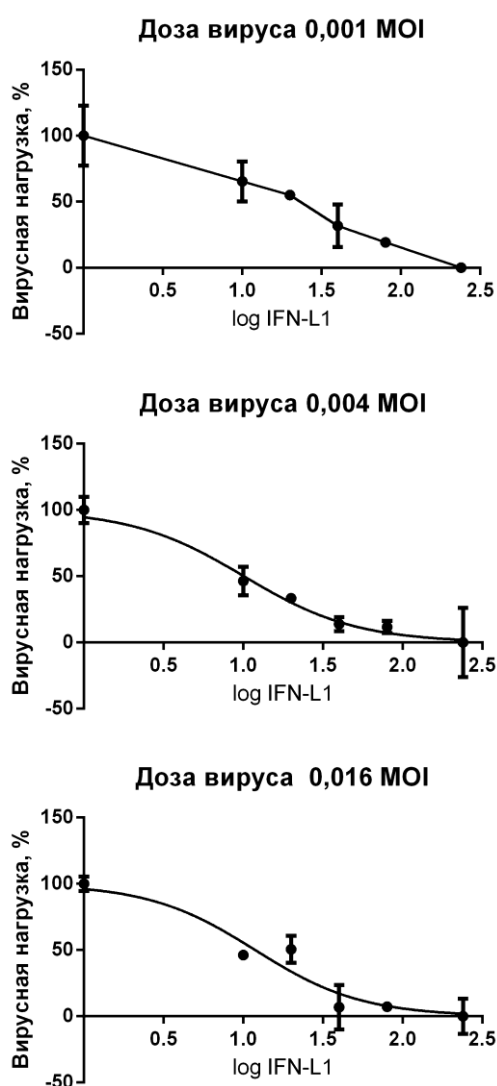


Рисунок 10. Изменение вирусной нагрузки при обработке клеток линии A549 различными дозами IFN-λ1. По оси ординат показан уровень сигнала (относительных единиц) в ИФА, по оси абсцисс указан десятичный логарифм концентрации IFN-λ1.

Более того, схожие результаты были получены и при исследовании супернатантов клеток A549, инфицированных штаммом A/California/07/09 (H1N1pdm09). Прослеживались достоверные отличия в динамике накопления вирусного белка NP (**рисунок 11**).



Рисунок 11. Изменение уровня вирусного белка NP при обработке клеток линии A549 IFN-λ1 в дозе 500 нг/мл. По оси ординат показан уровень вирусного белка NP, по оси абсцисс указано время после заражения; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$ по сравнению с вирусным контролем в данной временной точке, использован критерий 2-way ANOVA и критерий Tukey для множественных сравнений.

Также, методом ОТ-ПЦР показано, что экспрессия вирусного гена NP была снижена более чем на порядок, при обработке клеток A549 IFN-λ1 в концентрации 500 нг/мл. Добавление препарата влияло на кинетику экспрессии вирусного генома (**рисунок 12**).

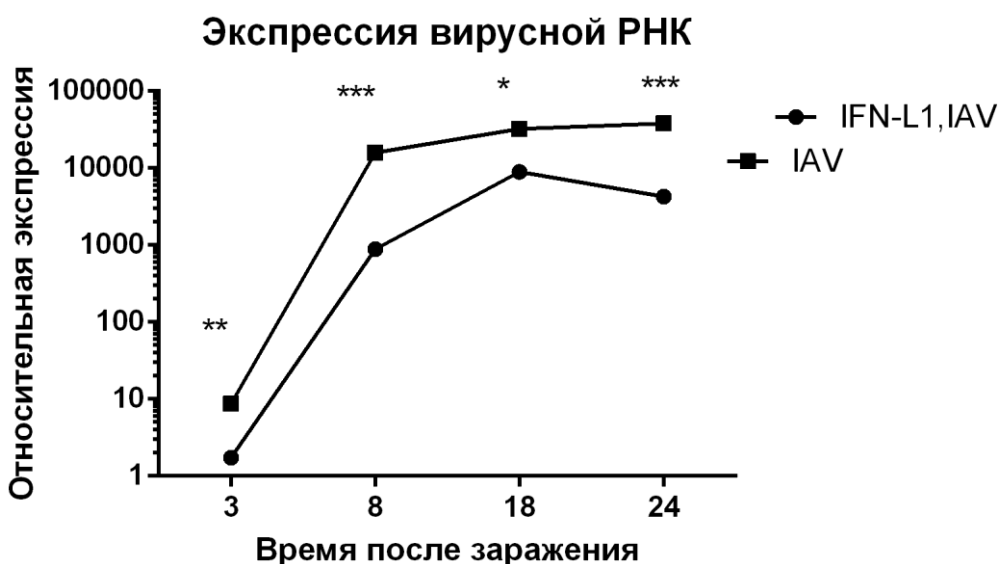


Рисунок 12. Изменение экспрессии вируса гриппа А при обработке клеток IFN-λ в дозе 500 нг/мл. По оси ординат показан относительный уровень экспрессии NP; * - $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$ по сравнению с вирусным контролем в данной временной точке, использован критерий 2-way ANOVA и критерий Tukey для множественных сравнений.

Таким образом, на клетках A549 было убедительно показано, что полученный нами препарат IFN-λ1 способствует индукции ISGs и обладает противовирусной активностью в отношении вируса гриппа А. На следующем этапе были проведены исследования *in vivo*.

2.8 Оценка уровня секреции мышинных IFN-λ в ответ на гриппозную инфекцию

На первом этапе исследований *in vivo* было определено, насколько вирус способен стимулировать продукцию мышинных IFN-λ. Для этого был использован адаптированный к мышам штамм IAV A/California/07/09 (H1N1)pdm09, взятый из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа им А.А. Смородинцева» Минздрава России. Исследования проводили на мышах линии Balb/c, так как данная линия лабораторных животных является дефектной по гену Mx1, и, следовательно, более подвержена гриппозной инфекции. У мышей Balb/c продуцируется мРНК, лишенная 9, 10 и 11 экзонов, что приводит к образованию белкового продукта, не способного к эффективному связыванию с рибонуклеопротеиновым комплексом вируса гриппа [24]

Для определения минимальной летальной дозы (МЛД₅₀) двухмесячных самок мышей линии Balb/c интраназально заражали различными дозами вируса. После определения МЛД₅₀ мышей заражали интраназально под легким эфирным наркозом вирусом в дозе 10 МЛД₅₀ на мышь в объеме 50 мкл. Такая доза вируса соответствует дозе 10^{4.5} TCID₅₀. На 3-й день после заражения по 5 животных из каждой группы подвергали эвтаназии, вскрывали и изолировали их лёгкие. Образцы ткани гомогенизировали в физиологическом растворе с помощью прибора TissueLyserII (Qiagen, США). Гомогенаты легких использовали для проведения ИФА. Также, на третий день после заражения осуществляли забор периферической крови. Полученную сыворотку крови также брали в ИФА. Было показано, что у зараженных гриппом мышей происходило повышение уровня IFN-λ в легочных тканях, но не в периферической крови (**рисунок 13**). Эти данные подтверждают гипотезу о локальном характере действия данного цитокина [7,8] и лишний раз подчеркивают, что даже при тяжелой вирусной инфекции IFN-λ не способствует развитию тяжелого воспалительного процесса на системном уровне [14].

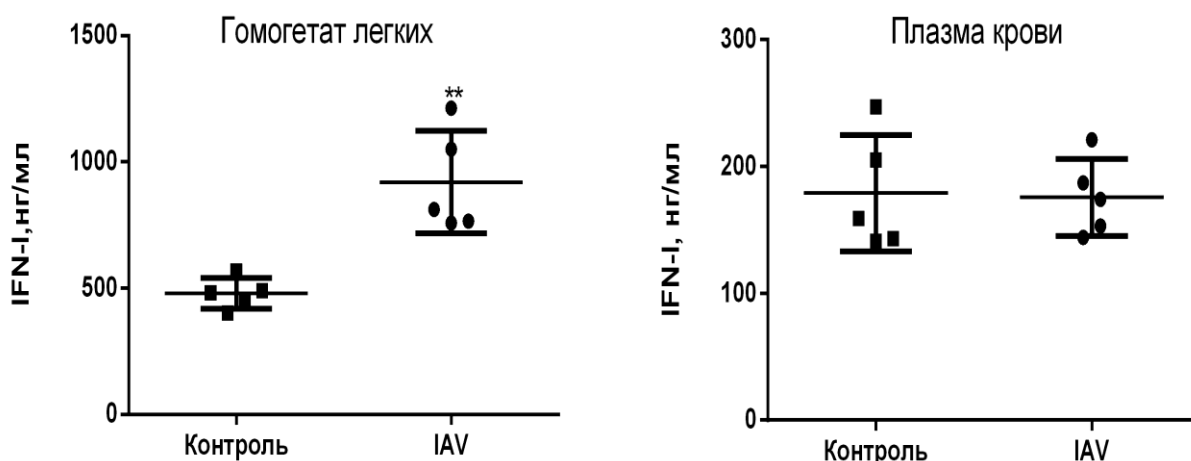


Рисунок 13. Изменение уровня IFN-λ при заражении мышей линии Balb/c адаптированным к мышам штаммом IAV A/California/07/09 (H1N1)pdm09 в дозе заражения 10^{4.5} TCID₅₀. По оси ординат показана концентрация мышинового IFN-λ в нг/мл; ** – P < 0,01 по сравнению с интактным контролем, использован непараметрический критерий Манна-Уитни.

Уровень вирусной нагрузки в мышинных легких показан на **рисунке 14**. Согласно результатам ИФА, в легких эффективно проходила репликация вируса, о чем свидетельствует значительная концентрация вирусного белка NP в гомогенате мышинных легких. Как и следовало ожидать, у контрольной группы вирусный белок не был детектирован.

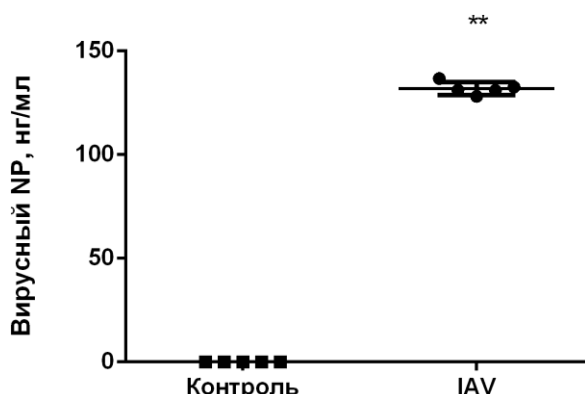


Рисунок 14. Определение уровня вирусного белка NP при заражении мышей линии Balb/c адаптированный к мышам штаммом IAV A/California/07/09 (H1N1)pdm09 в дозе заражения $10^{4.5}$ TCID₅₀. По оси ординат показана концентрация вирусного белка NP в нг/мл; ** – $P < 0,01$ по сравнению с интактным контролем, использован непараметрический критерий Манна-Уитни.

Также, был измерен уровень некоторых цитокинов второй волны (**рисунк 15**).

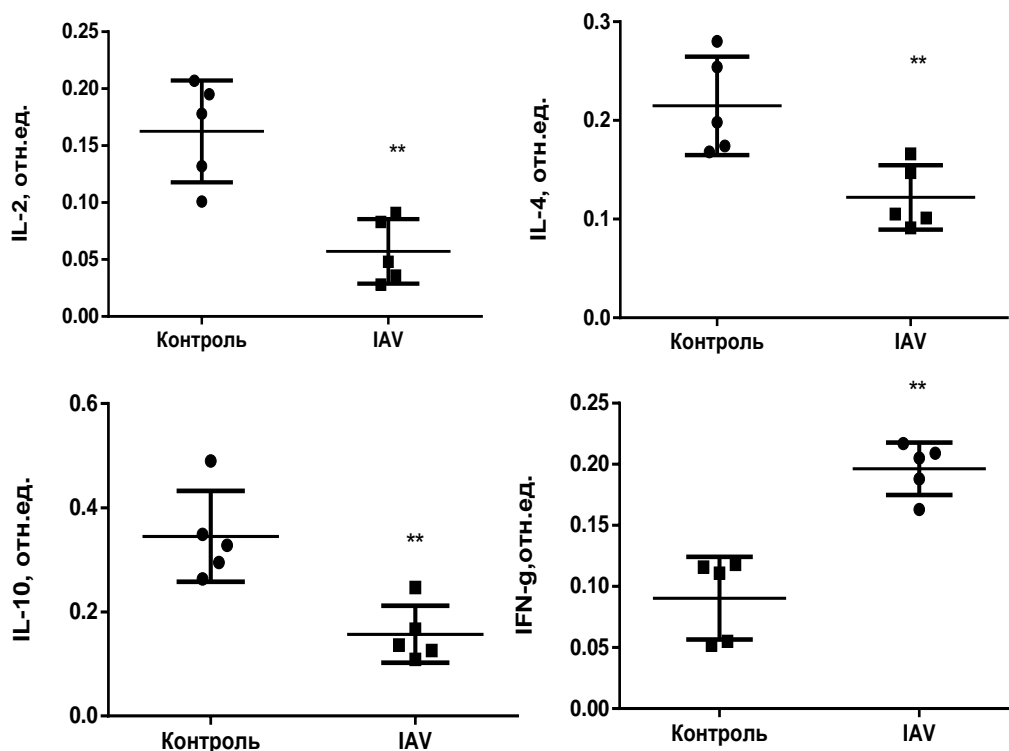


Рисунок 15. Определение уровня IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ при заражении мышей линии Balb/c адаптированный к мышам штаммом IAV A/California/07/09 (H1N1)pdm09 в дозе заражения $10^{4.5}$ TCID₅₀. По оси ординат показана концентрация указанных цитокинов; ** – $P < 0,01$ по сравнению с интактным контролем, использован непараметрический критерий Манна-Уитни.

Как видно из рисунка 15, летальная доза IAV приводит к снижению уровня IL-2, IL-4, IL-10 и повышению IFN- γ в легочных тканях. Уровень IFN- γ может быть повышен из-за активации естественных киллеров. Данные компоненты врожденного иммунного ответа способны продуцировать IFN- γ на ранних этапах заболевания (3-5 день после заражения) для предотвращения вирусной репликации. Также, было показано, что использование экзогенного IFN- γ на ранних стадиях гриппозной инфекции способно оказывать протективный эффект. Следовательно, повышение уровня данного интерферона можно рассматривать в качестве универсального защитного механизма, который реализуется в ответ на заражение IAV [2]. В свою очередь, IL-10 принято относить к противовоспалительным цитокинам, которые отвечают за негативную регуляцию иммунной системы при вирусных и бактериальных инфекциях. Снижение уровня IL-10 может быть связано с развитием острого системного воспаления и цитокинового шторма.

2.9 Оценка противовирусной активности рекомбинантного IFN- λ 1 человека и IFN- λ 3 мыши

Известно, что IFN- λ является консервативным компонентом врожденного иммунного ответа млекопитающих и характеризуется кросс-видовой активностью. У мышей обнаружены IFN- λ 2-го и 3-го типов. *IFNL1* мыши является псевдогеном. Аминокислотная последовательность специфической субъединицы рецептора IFNLR1 мыши на 67% идентична последовательности данной субъединицы человека. Таким образом, IFN- λ человека и мыши способны действовать не только непосредственно на клетки организма хозяина, но и обладают кросс-реактивностью [25]. Так, в работе [26] было показано, что IFN- λ 1 и IFN- λ 4 человека проявляют даже более выраженную противовирусную активность на клетках мыши, чем человека. Наоборот, IFN- λ 2 и IFN- λ 3 человека обладают относительно высокой видовой специфичностью. В свою очередь, IFN- λ 3 мыши также намного эффективнее подавляет репликацию вируса в мышинных клетках, чем в линии клеток A549. На **рисунке 16** представлено выравнивание аминокислотной последовательности IFN- λ мыши и человека

```

IFN- $\lambda$ 1 человека MAAAWTVVIVTLVVLGLAVAGPVP-TSKPTTTGKGCCHIGRFKSLSPQELASFKKARDALEE
IFN- $\lambda$ 3 мыши MLLLLLPLLLAAVLTTRTQADPVP RATRLPVEAKDCHIAQFKSLSPKELQAFKKAKEAIEK
IFN- $\lambda$ 2 мыши MLLLLLPLLLAAVLTTRTQADPVP RATRLPVEAKDCHIAQFKSLSPKELQAFKKAKEAIEK
*          :*:: ** : *.*** ::: .. *.***.:*****:** :*****.*:*:

IFN- $\lambda$ 1 человека SLKLNWSSSPVFPGNWDLRLQVRERPVALEAELALTLKVVLEAAAGPALEDVLDQPLH
IFN- $\lambda$ 3 мыши RLEKDMRCSHSLISRWDLKQLQVQERP KALQAEVALTLKVVWENINDSALTTILGQPLH
IFN- $\lambda$ 2 мыши RLEKDLRCSSHLFPRAWDLKQLQVQERP KALQAEVALTLKVVWENMTDSALATILGQPLH
* *: *** :.. ***: ***:*** **:***:***** * ..** :*.****

IFN- $\lambda$ 1 человека TLHHILSQLQACIQPQPTAGPR-PRGRLHHWLHRLQEA PKKESAGCLEASVTFNLFRLLT
IFN- $\lambda$ 3 мыши TLSHIHSQLQTCTQLQATAEPKPPSRRLSRWLHRLQEAQSKETPGCLEDSVTSNLFQLLL
IFN- $\lambda$ 2 мыши TLSHIHSQLQTCTQLQATAEPRSPSRRLSRWLHRLQEAQSKETPGCLEASVTSNLFRLLT
** ** *****:* * *.** *: * ** :***** .**:.**** ** ***:**

IFN- $\lambda$ 1 человека RDLKYVADGNLCLRTSTHPEST
IFN- $\lambda$ 3 мыши RDLKCVASGDQCV-----
IFN- $\lambda$ 2 мыши RDLKCVANGDQCV-----
**** **.*: *:
```

Рисунок 16. Выравнивание аминокислотных последовательностей IFN- λ 1 человека (NP_742152.1), IFN- λ 3 мыши (NP_796370.1) и IFN- λ 2 мыши (NP_001019844.2). Желтым цветом выделены

аминокислотные остатки, идентичные в IFN-λ1 человека и IFN-λ3 мыши. Зеленым цветом выделены аминокислотные остатки, различающиеся в мышинных IFN-λ3 и IFN-λ2. Выравнивание построено при помощи интернет-сервиса MAFFT [27].

Согласно поставленной задаче, провели оценку противовирусной активности рекомбинантного IFN-λ1 человека и IFN-λ3 мыши. В качестве препарата сравнения был использован IFN-α2b человека. Общая схема эксперимента представлена на **рисунке 17**



Рисунок 17. Общая схема постановки эксперимента по профилактической схеме. На -1 день мышам линии Balb/c интраназально вводили рекомбинантный IFN-λ1 человека, IFN-λ3 мыши и препарата сравнения, IFN-α2b человека. Для заражения мышей использовали адаптированный к мышам штамм IAV A/California/07/09 (H1N1)pdm09 в дозе 2 МЛД₅₀.

Введение препаратов интерферонов проводили по профилактической схеме. Для этого за сутки до заражения вирусом гриппа в организм подопытных животных вводили рекомбинантные белки в дозе 5 мкг/мышь, что соответствовало дозе 250 мкг/кг живого веса. Введение проводилось интраназально под легкой эфирной анестезией, в объеме 30 мкл, в дозе 2 МЛД₅₀ на мышь

В нулевой день проводили заражение адаптированным к мышам штаммом IAV A/California/07/09 (H1N1)pdm09, взятым из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа им А.А. Смородинцева» Минздрава России. На третьи сутки после заражения проводили взятие легких и носов. В ходе эксперимента мышей ежедневно взвешивали, отслеживали летальность. Более подробная информация о дизайне эксперимента представлена в **таблице 3**.

В исследовании ставилось две основные задачи: оценить токсичность и противовирусную активность препаратов при профилактической схеме введения на мышах линии Balb/c, восприимчивых к гриппозной инфекции.

Таблица 3 – Дизайн эксперимента по оценке противовирусной активности IFN-λ в профилактической схеме введения препаратов.

№ группы	Пол	Количество животных	Препарат	Доза вируса
1	самки	15	hIFN-λ1 5 мкг/мышь	2 МЛД ₅₀
2	самки	15	NA	2 МЛД ₅₀

3	самки	4	hIFN- λ 1 5 мкг/мышь	NA
4	самки	11	NA	NA
5	самки	15	mIFN- λ 3 5 мкг/мышь	2 МЛД ₅₀
6	самки	4	mIFN- λ 3 5 мкг/мышь	NA
7	самки	15	hIFN- α 2b 5 мкг/мышь	2 МЛД ₅₀
8	самки	4	hIFN- α 2b 5 мкг/мышь	NA
Всего мышей		83		

После введения рекомбинантных IFN у мышей не было зарегистрировано никаких видимых побочных эффектов (таких как носовое кровотечение, судороги). Масса тела подопытных животных также не изменялась (**рисунок 18**).

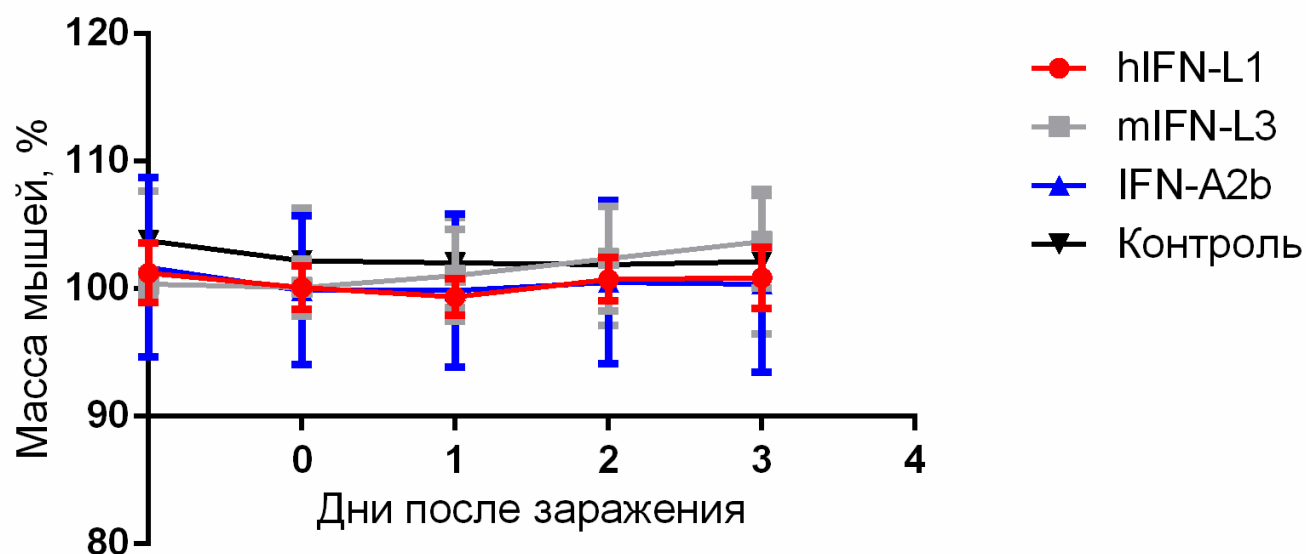


Рисунок 18. Изменение массы тела мышей при введении рекомбинантных IFN, hIFN-L1 – IFN- λ 1 человека; mIFN-L3 – IFN- λ 3 мыши; IFN-A2b – IFN- α 2b человека. По оси Y указано изменение массы мышей, %.

Как видно из приведенных данных, введение рекомбинантных IFN не приводило к значимым последствиям для животных. Следовательно, актуальным является вопрос об их противовирусном протективном действии при летальной гриппозной инфекции. На **рисунке 19** построены кривые выживания лабораторных животных, зараженных вирусом гриппа А.

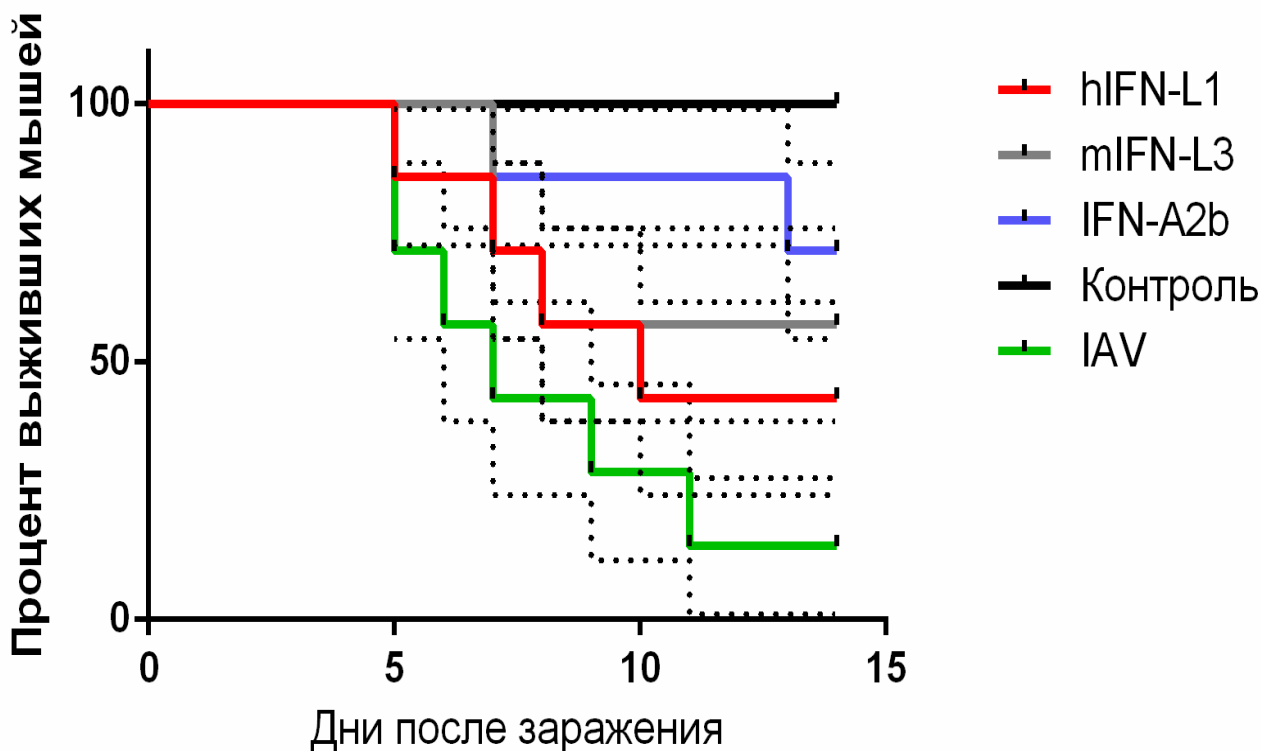


Рисунок 19. Кривые выживания мышей, зараженных IAV A/California/07/09 (H1N1)pdm09 в дозе 2 МЛД₅₀. Интерферон hIFN-L1 – IFN-λ1 человека; mIFN-L3 – IFN-λ3 мыши; IFN-A2b – IFN-α2b человека; IAV – зараженные мыши без лечения. По оси Y указан процент выживших мышей, %, пунктиром указан доверительный интервал.

Как указано на рисунке 19, введение препаратов IFN по профилактической схеме, в целом, снижало смертность. Наиболее выраженный эффект наблюдался для препарата сравнения (IFN-A2b) и IFN-λ3 мыши. Достоверного снижения летальности при использовании IFN-λ1 человека показано не было, однако имелась некоторая тенденция к снижению смертности. Так, по итогам эксперимента выживаемость в группе инфицированного контроля составляла всего 14,8%, в то время как применение IFN-λ1 повышало данный показатель до 43%. При использовании IFN-λ3 мыши выжило 57% животных. Во всяком случае, во всех временных точках процент выживших мышей, получивших какой-либо из препаратов рекомбинантного IFN, был выше по сравнению с вирусным контролем. Незараженные мыши, как и следовало ожидать, не гибли в ходе эксперимента и не теряли в массе тела (**рисунок 20**). Динамика изменения веса мышей зараженных IAV, в целом, имела сходную картину, как при использовании IFN, так и при введении PBS (вирусный контроль). И в случае вирусного контроля, и в случае применения IFN-λ1 и IFN-α2b человека наибольшее снижение массы тела наблюдалось на 7-10 сутки после заражения. Любопытно, что в случае применения IFN-λ3 мыши переставали терять массу тела на 6 сутки после заражения. Таким образом, хотя применение IFN-λ3 мыши не снижало летальность по сравнению с препаратом контроля, у выживших животных, если судить по изменению массы тела, быстрее протекал процесс выздоровления.

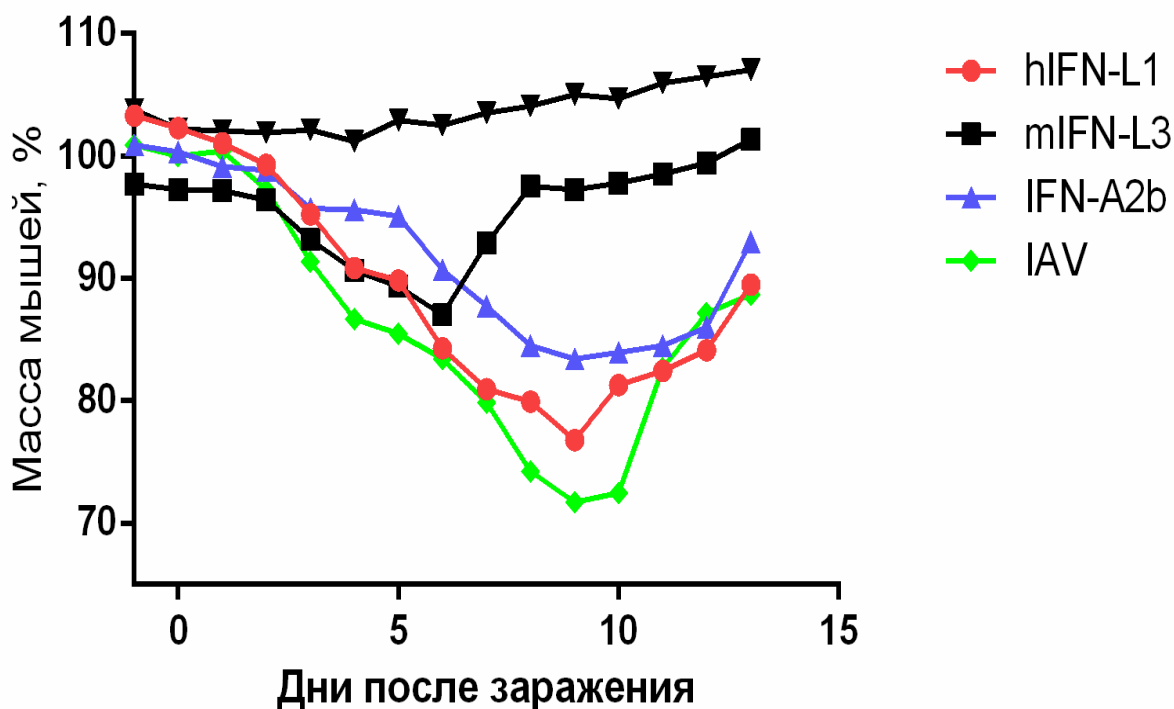


Рисунок 20. Изменение массы тела мышей при введении рекомбинантных IFN по терапевтической схеме и заражении IAV A/California/07/09 (H1N1)pdm09 в дозе 2 МЛД₅₀; hIFN-L1 – IFN- λ 1 человека; mIFN-L3 – IFN- λ 3 мыши; IFN-A2b – IFN- α 2b человека; IAV – вирусный контроль, зараженные мыши без лечения рекомбинантным IFN. По оси Y указано изменение массы мышей, %.

Была определена вирусная нагрузка в гомогенатах легких и носов мышей (рисунок 21).

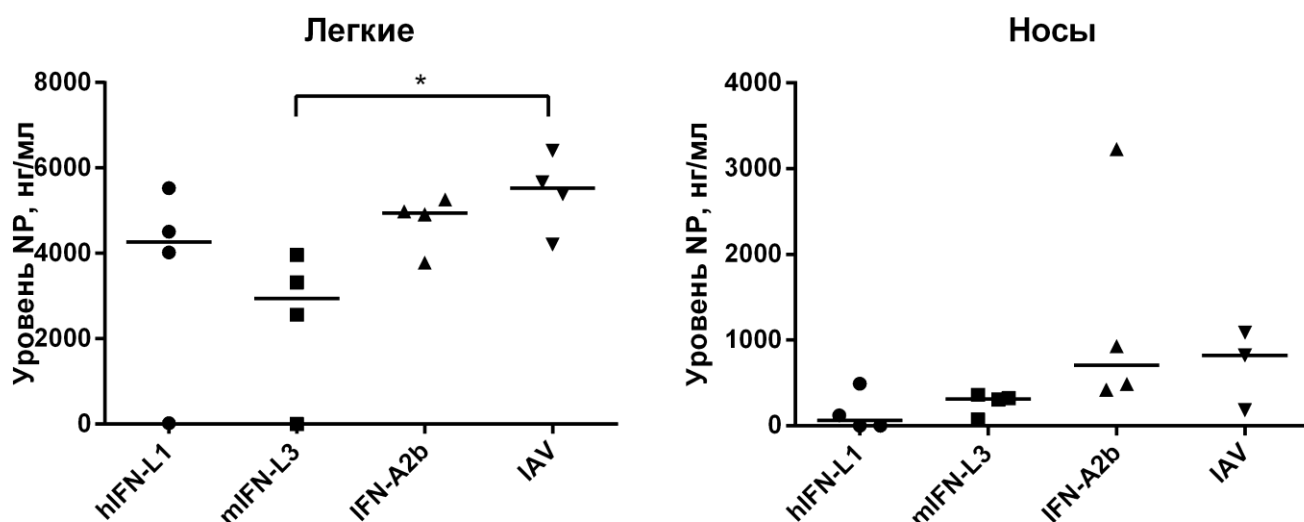


Рисунок 21. Определение уровня вирусного белка NP при заражении мышей линии Balb/c адаптированный к мышам штаммом IAV A/California/07/09 (H1N1)pdm09 в дозе в дозе 2 МЛД₅₀; hIFN-L1 – IFN- λ 1 человека; mIFN-L3 – IFN- λ 3 мыши; IFN-A2b – IFN- α 2b человека; IAV –

вирусный контроль, зараженные мыши без лечения рекомбинантным IFN. По оси ординат показана концентрация вирусного белка NP в нг/мл; * – $P < 0,05$ по сравнению с вирусным контролем (IAV), использованы статистические критерии Краскела-Уоллиса и критерий Данна для множественных сравнений.

Согласно данным, представленным на рисунке 21, использование IFN- $\lambda 3$ мыши приводило к небольшому, но статистически достоверному снижению уровня вирусного белка NP в гомогенате тканей легких. В случае применения других препаратов IFN также имелась некоторая тенденция к понижению уровня вирусного белка NP, однако отличия нельзя интерпретировать как достоверные. В гомогенатах, полученных из носов, как и можно было ожидать, уровень вирусного NP был существенно ниже, чем в легких. Введение рекомбинантных IFN- λ было ассоциировано с некоторым снижением уровня NP, однако маленький объем выборки и существенная вариабельность результатов, вносимая техническими моментами (критически важным является отбирать одинаковую массу носовых тканей, что, к сожалению, не всегда легко осуществимо на практике) не позволяют считать отличия достоверными. Таким образом, можно заключить, что введение рекомбинантного IFN- $\lambda 3$ мыши приводило к снижению вирусной нагрузки в легких на третьи сутки после заражения. Следовательно, как и ряде других исследований [13,14,17,19], показали противовирусную активность IFN- λ .

Любопытным является вопрос, насколько введение экзогенных IFN способно повлиять на изменение уровня эндогенного IFN- λ . Для этого была проведена оценка уровня данных цитокинов (мышинных IFN- $\lambda 2$ и IFN- $\lambda 3$) в легочных тканях на третьи сутки после заражения. Такие сроки позволяют исключить возможность детекции экзогенных IFN и оценить уровень эндогенных IFN- λ на ранних стадиях гриппозной инфекции (рисунок 22).

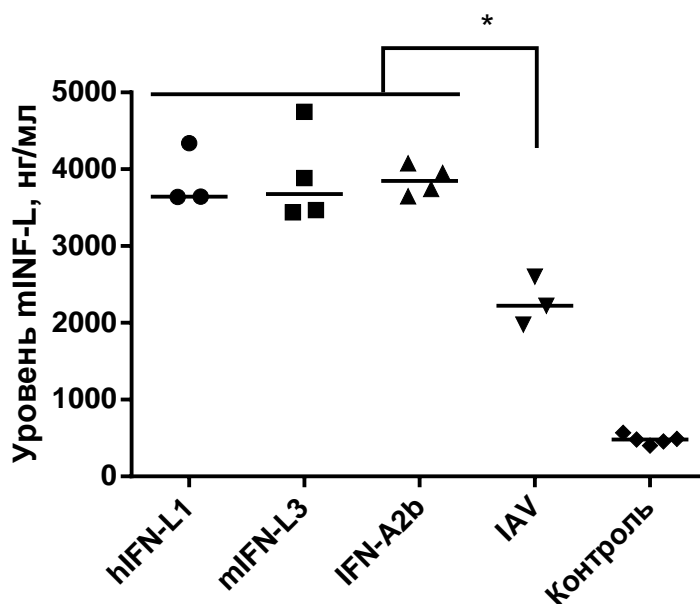


Рисунок 22. Изменение уровня IFN- λ при заражении мышей линии Balb/c адаптированным к мышам штаммом IAV A/California/07/09 (H1N1)pdm09 в гомогенатах легких в дозе заражения 2 МЛД₅₀; hIFN-L1 – IFN- $\lambda 1$ человека; mIFN-L3 – IFN- $\lambda 3$ мыши; IFN-A2b – IFN- $\alpha 2b$ человека; IAV – вирусный контроль, зараженные мыши без лечения рекомбинантным IFN. По оси ординат

показана концентрация мышинового IFN-λ в нг/мл; * – P < 0,05 по сравнению с вирусным контролем, использован критерий Даннетта для множественных сравнений.

Уровень в гомогенате носовых тканей показан на **рисунке 23**.

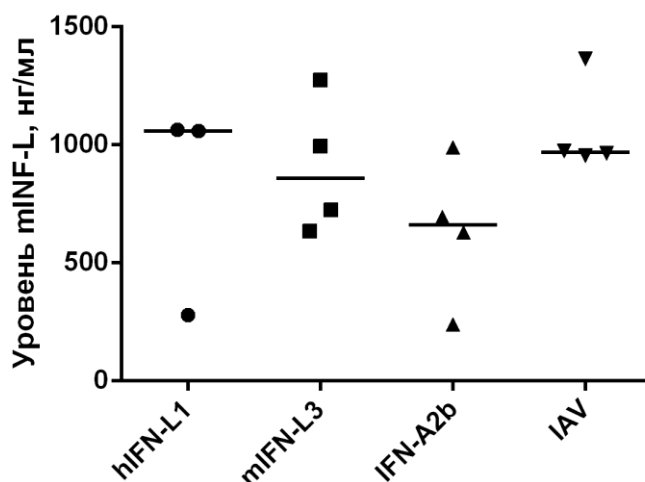


Рисунок 23. Изменение уровня IFN-λ при заражении мышей линии Balb/c адаптированным к мышам штаммом IAV A/California/07/09 (H1N1)pdm09 в гомогенатах носов в дозе заражения 2 МЛД₅₀; hIFN-L1 – IFN-λ1 человека; mIFN-L3 – IFN-λ3 мыши; IFN-A2b – IFN-α2b человека; IAV – вирусный контроль, зараженные мыши без лечения рекомбинантным IFN. По оси ординат показана концентрация мышинового IFN-λ в нг/мл.

Как показано на рисунках 22 и 23, действие экзогенных IFN вызывало активацию эндогенных IFN-λ мыши, что, несомненно, можно рассматривать в качестве защитного механизма, который предотвращает распространение гриппозной инфекции. Отличий между препаратами рекомбинантных IFN не было, что, возможно, является одной из причин кросс-видового протективного действия IFN. Уровень цитокинов второй волны на третий день после заражения представлен на **рисунке 24**.

Как видно из рисунка 24, при вирусной нагрузке действие IFN-λ1 и IFN-A2b человека вызывает повышение уровня IL-10. Возможно, введение данных препаратов IFN сопряжено с избыточной активацией провоспалительных сигнальных каскадов, и в качестве естественного компенсаторного механизма можно наблюдать повышение противовоспалительного IL-10. Любопытно, что введение мышинового IFN-λ3 не ассоциировано с повышением IL-10. Также интересно отметить, что IL-4 был повышен при введении всех рекомбинантных препаратов IFN. Различий в IFN-γ между группами обнаружено не было. Это говорит о том, что для данного цитокина характерно неспецифическое (в отношении наших препаратов) повышение в легочных тканях в ответ на гриппозную инфекцию.

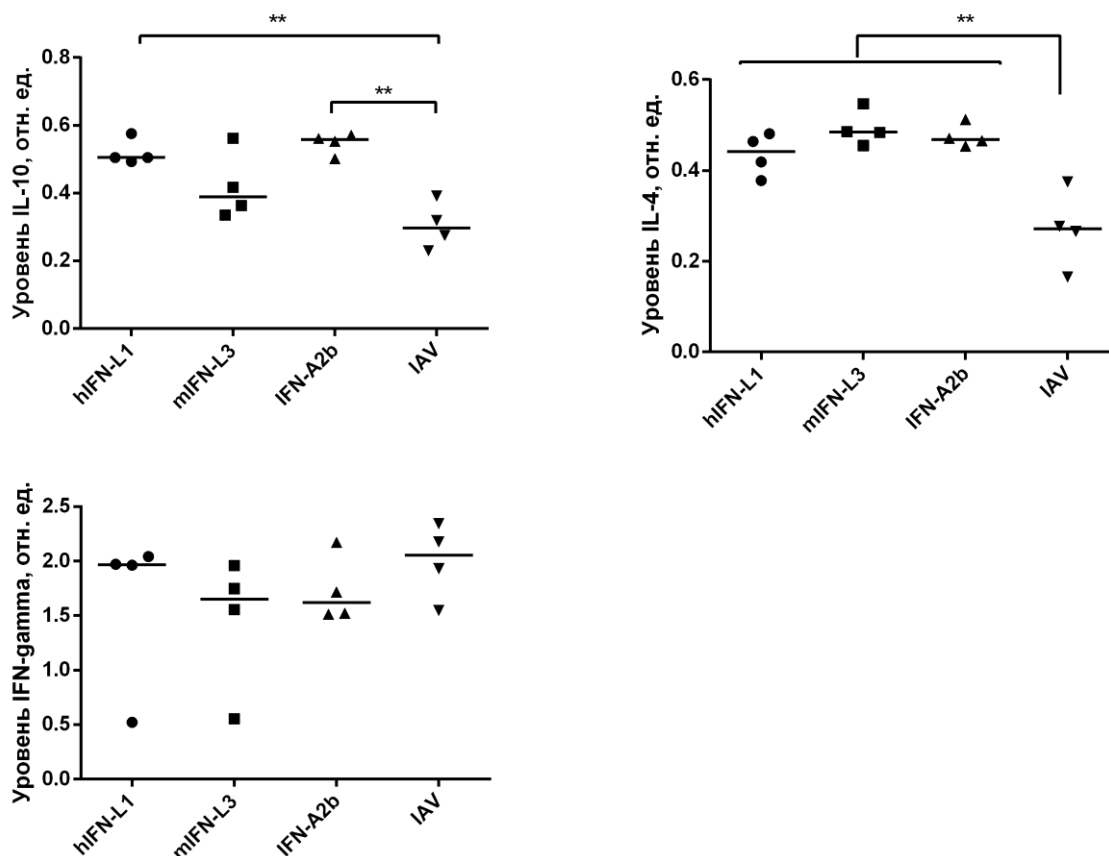


Рисунок 24. Определение уровня IL-4, IL-10, IFN- γ при заражении мышей линии Balb/c адаптированный к мышам штаммом IAV A/California/07/09 (H1N1)pdm09 в дозе заражения 2 МЛД₅₀; hIFN-L1 – IFN- λ 1 человека; mIFN-L3 – IFN- λ 3 мыши; IFN-A2b – IFN- α 2b человека; IAV – вирусный контроль, зараженные мыши без лечения рекомбинантным IFN. По оси ординат показана концентрация указанных цитокинов; ** – P < 0,01 по сравнению с гриппозным контролем, использован критерий Даннетта для множественных сравнений.

Заключение

На первом этапе исследований была определена динамика экспрессии *IFNL* в ответ на заражение клеток A549 различными респираторными вирусами. Было показано, что каждый из респираторных вирусов имеет свой уникальный профиль экспрессии IFN, особенный интерес представляли данные об ингибировании продукции IFN- λ пандемическим штаммом A/California/07/09 (H1N1pdm09) на уровне белка. В силу этого по новому встает вопрос о важности применения экзогенных IFN- λ при гриппозной инфекции. В ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России было осуществлено клонирование рекомбинантного белка IFN- λ 1 человека. Биологическая активность рекомбинантного IFN- λ 1 была подтверждена его способностью запускать экспрессию ISGs и противовирусным действием по отношению к вирусам гриппа A/California/07/09 (H1N1pdm09) и A/California/04/2009. Было показано, что уровень IFN- λ повышается в тканях легких мышей при летальной гриппозной инфекции.

Оценка терапевтического потенциала рекомбинантного IFN- λ по отношению к вирусу гриппа А (A/California/07/09 (H1N1)pdm09) была проведена на мышях линии Balb/c по

профилактической схеме. Было показано, что применение IFN-λ3 мыши снижало летальность и вирусную нагрузку на третьи сутки после заражения при летальной гриппозной инфекции. Преимуществом IFN-λ3 по сравнению с препаратом сравнения, IFN-α2b, было более быстрое выздоровление подопытных животных.

Выводы

- 1) Вирус гриппа A/California/07/09 (H1N1pdm09) способен подавлять продукцию IFN-λ на уровне секреции белка.
- 2) Полученный рекомбинантный IFN-λ1 человека обладает биологической активностью и противовирусным действием по отношению к IAV.
- 3) При летальной гриппозной инфекции у самок мышей линии Balb/c отмечено повышение уровня IFN-λ и IFN-γ на третьи сутки после заражения в легочных тканях, в то время как уровень цитокинов второй волны (IL-2, IL-4, IL-10), наоборот, падает. При этом не происходит повышение уровня IFN-λ в периферической крови, что указывает на локальный характер действия данного цитокина.
- 4) Введение рекомбинантного IFN-λ3 мыши по профилактической схеме более чем в два раза снижает смертность при летальной гриппозной инфекции и снижает вирусную нагрузку в полтора раза на третьи сутки после заражения у самок мышей линии Balb/c. Рекомбинантный IFN-λ1 человека проявляет противовирусную активность на линии клеток A549, но не защищает мышей от летальной гриппозной инфекции.
- 5) IFN-λ3 мыши по сравнению с препаратом сравнения, IFN-α2b, характеризуется более быстрым набором веса самок мышей линии Balb/c. Восстановление массы тела при лечении IFN-λ3 наблюдалось начиная с 6-ых суток после заражения, в то время как при лечении IFN-α2b мыши начинали набирать вес только через 12 дней после заражения.

Список работ, опубликованных по теме исследования

Публикации в рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК

- 1) **Lozhkov, A. A.**, Klotchenko, S. A., Ramsay, E. S., Moshkoff, H. D., Moshkoff, D. A., Vasin, A. V., Salvato, M. S. The key roles of interferon lambda in human molecular defense against respiratory viral infections //Pathogens. – 2020. – Т. 9. – №. 12. – С. 989. Impact Factor: 3,492.
- 2) Plotnikova, M., **Lozhkov, A.**, Romanovskaya-Romanko, E., Baranovskaya, I., Sergeeva, M., Klotchenko, S., Vasin, A. IFN-λ1 Displays Various Levels of Antiviral Activity In Vitro in a Select Panel of RNA Viruses //Viruses. – 2021. – Т. 13. – №. 8. – С. 1602. Impact Factor: 5,048.

Тезисы международных и всероссийских конференций

- 1) **Ложков А.А.**, Плотникова М.А., Бондаренко А.Б. Оценка противовирусной активности рекомбинантного человеческого IFN-λ1 по отношению к пандемическому штамму вируса гриппа A/California/04/2009 с использованием линии клеток A549. Неделя науки СПбПУ : материалы научной конференции с международным участием,

18–23 ноября 2019 г. Институт биомедицинских систем и биотехнологий. В 2 ч. Ч. 2. Высшая школа биомедицинских систем и технологий. – СПб. : ПОЛИТЕХ-ПРЕСС, 2019. – 159 с.

- 2) **Lozhkov AA**, Yolshin ND, Plotnikova MA, Klotchenko SA, Vasin AV. INTERFERON- λ EXPRESSION IN A549 CELLS IN RESPONSE TO INFLUENZA VIRUS INFECTION. Международный форум «Дни вирусологии (Virology Days) – 2020», Санкт-Петербург, 6–7 октября 2020 года.
- 3) **Ложков А.А.**, Плотникова М.А., Каа К.В. В поисках универсальных противовирусных препаратов. оценка антивирусной активности интерферона-лямбда 1-го типа по отношению к вирусу гриппа а, вирусу чикунгунья и коронавирусу. XI Всероссийская конференция студентов и аспирантов с международным участием «МОЛОДАЯ ФАРМАЦИЯ – ПОТЕНЦИАЛ БУДУЩЕГО», 29 марта – 23 апреля 2021 г. ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России.

Список литературы

- 1 Cole S. L., Ho L. P. Contribution of innate immune cells to pathogenesis of severe influenza virus infection //Clinical Science. – 2017. – Т. 131. – №. 4. – С. 269-283.
- 2 Xi-zhi J. G., Thomas P. G. New fronts emerge in the influenza cytokine storm //Seminars in immunopathology. – Springer Berlin Heidelberg, 2017. – Т. 39. – №. 5. – С. 541-550.
- 3 Killip M. J., Fodor E., Randall R. E. Influenza virus activation of the interferon system //Virus research. – 2015. – Т. 209. – С. 11-22.
- 4 Davidson S. et al. IFN λ is a potent anti-influenza therapeutic without the inflammatory sideeffects of IFN α treatment //EMBO molecular medicine. – 2016. – Т. 8. – №. 9. – С. 1099-1112.
- 5 Randall R. E., Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures //Journal of General Virology. – 2008. – Т. 89. – №. 1. – С. 1-47.
- 6 Egli A. et al. The impact of the interferon-lambda family on the innate and adaptive immune response to viral infections //Emerging microbes & infections. – 2014. – Т. 3. – №. 1. – С. 1-12.
- 7 Lazear H. M., Nice T. J., Diamond M. S. Interferon- λ : immune functions at barrier surfaces and beyond //Immunity. – 2015. – Т. 43. – №. 1. – С. 15-28.
- 8 Miknis Z. J. et al. Crystal structure of human interferon- λ 1 in complex with its high-affinity receptor interferon- λ R1 //Journal of molecular biology. – 2010. – Т. 404. – №. 4. – С. 650-664.
- 9 Prokunina-Olsson L. et al. A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus //Nature genetics. – 2013. – Т. 45. – №. 2. – С. 164.
- 10 Hamming I. et al. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis //The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland. – 2004. – Т. 203. – №. 2. – С. 631-637.
- 11 Hermant P., Michiels T. Interferon- λ in the context of viral infections: production, response and therapeutic implications //Journal of innate immunity. – 2014. – Т. 6. – №. 5. – С. 563-574.
- 12 Ioannidis I. et al. Plasticity and virus specificity of the airway epithelial cell immune response during respiratory virus infection //Journal of virology. – 2012. – Т. 86. – №. 10. – С. 5422-5436.
- 13 Crotta S. et al. Type I and type III interferons drive redundant amplification loops to induce a transcriptional signature in influenza-infected airway epithelia //PLoS Pathog. – 2013. – Т. 9. – №. 11. – С. e1003773.
- 14 Galani I. E. et al. Interferon- λ mediates non-redundant front-line antiviral protection against influenza virus infection without compromising host fitness //Immunity. – 2017. – Т. 46. – №. 5. – С. 875-890. e6.

- 15 Hayden F. G., de Jong M. D. Emerging influenza antiviral resistance threats. – 2011.
- 16 Plotnikova M. A. et al. Antibody microarray immunoassay for screening and differential diagnosis of upper respiratory tract viral pathogens //Journal of Immunological Methods. – 2020.
- 17 Baños-Lara M. D. R. et al. Impact and regulation of lambda interferon response in human metapneumovirus infection //Journal of virology. – 2015. – Т. 89. – №. 1. – С. 730-742.
- 18 O'Brien T. R. et al. Weak induction of interferon expression by SARS-CoV-2 supports clinical trials of interferon lambda to treat early COVID-19 //Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America. – 2020.
- 19 Dinnon K. H. et al. A mouse-adapted model of SARS-CoV-2 to test COVID-19 countermeasures //Nature. – 2020. – С. 1-9.
- 20 Rich H. E. et al. Interferon lambda inhibits bacterial uptake during influenza superinfection //Infection and immunity. – 2019. – Т. 87. – №. 5.
- 21 Major J. et al. Type I and III interferons disrupt lung epithelial repair during recovery from viral infection //Science. – 2020.
- 22 Hadjadj J. et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients //Science. – 2020. – Т. 369. – №. 6504. – С. 718-724.
- 23 Shahbazi M. et al. Linkage of Lambda Interferons in Protection Against Severe COVID-19 //Journal of Interferon & Cytokine Research. – 2021. – Т. 41. – №. 4. – С. 149-152.
- 24 The Jackson Laboratory. Balb/cJ Inbred Strain. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.jax.org/strain/000651>.
- 25 Lozhkov A. A. et al. The key roles of interferon lambda in human molecular defense against respiratory viral infections //Pathogens. – 2020. – Т. 9. – №. 12. – С. 989.
- 26 Jacobs S. et al. Species specificity of type III interferon activity and development of a sensitive luciferase-based bioassay for quantitation of mouse interferon- λ //Journal of Interferon & Cytokine Research. – 2018. – Т. 38. – №. 11. – С. 469-479.
- 27 MAFFT, version 7. Multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequences [Электронный ресурс]. URL: <https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>

Аспирант _____ Ложков Алексей Александрович