

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ДВУСПИРАЛЬНЫХ РНК НА АКТИВНОСТЬ МЫШИНЫХ СПЛЕНОЦИТОВ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Цыпленкова Е.С., Вязовая Е.А., Даниленко Е.Д.

Институт медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, г. Бердск, Новосибирская обл., Россия

Резюме. Рибонуклеиновые кислоты (РНК), в частности двуспиральные РНК, благодаря их способности модулировать врожденные иммунные реакции представляют несомненный интерес с точки зрения их использования в качестве вакцинных адъювантов. Однако несмотря на то, что препараты дсРНК известны довольно давно, вопросы клеточных взаимодействий и направленности развития иммунных реакций в условиях их воздействия изучены пока недостаточно. Целью настоящего исследования являлась оценка реакции спленоцитов мышей на воздействие дсРНК в культуре клеток и после введения препарата *in vivo*. Исследования проведены на самках мышей линии Balb/c. Статус активации различных популяций клеток селезенки после воздействия препаратов дрожжевой дсРНК и препарата сравнения PolyI:PolyC оценивали методами проточной цитометрии по экспрессии активационных маркеров CD69 и CD86 на В-лимфоцитах CD19⁺ и дендритных клетках (ДК) CD11c⁺. В исследованиях *in vitro* спленоциты инкубировали в среде ДМЕМ, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки, в течение 22 ч после внесения субстанции дрожжевой дсРНК или PolyI:PolyC в количестве 2,5 мкг/мл. В качестве дополнительного контроля использовали препарат одноцепочечной высокополимерной РНК (впРНК), входящий в состав субстанции, в количестве 16 мкг/мл. В ходе исследования продемонстрировано активирующее влияние дсРНК и PolyI:PolyC на экспрессию маркеров CD86 и CD69 на клетках всего пула спленоцитов, В-лимфоцитах и ДК. Высокополимерная РНК повышала общее количество CD86⁺ клеток в популяции без изменения уровня экспрессии маркеров на В-лимфоцитах и ДК. В исследованиях *in vivo* препарат дрожжевой дсРНК (субстанция) вводили внутривенно мышам в дозе 2,5 мг/кг, впРНК — 16 мг/кг. Количество CD69⁺ и CD86⁺ спленоцитов оценивали через 4 часа после введения препаратов. Наибольший стимулирующий эффект дсРНК был зарегистрирован в отношении экспрессии CD69: отмечен значительный рост числа CD69⁺ клеток среди В-лимфоцитов и в общем клеточном регионе. Менее выраженной, но статистически значимой была стимуляция экспрессии корцептора CD86 на В-лимфоцитах. Отмечена способность одноцепочечных и двуспиральных РНК достоверно повышать количество CD86⁺ клеток в популяции дендрит-

Адрес для переписки:

Цыпленкова Елена Сергеевна
Институт медицинской биотехнологии ФБУН
«Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора
633010, Россия, Новосибирская обл., г. Бердск,
ул. Химзаводская, 9.
Тел.: 8 (383) 363-80-24 (доп. 53-16).
Факс: 8 (383) 363-80-16.
E-mail: tsypchenkovaes@gmail.com

Address for correspondence:

Elena S. Tsyplenkova
Institute of Medical Biotechnology, State Research Center
of Virology and Biotechnology “Vector”
9 Khimzavodskaya St
Berdsk, Novosibirsk Region
633010 Russian Federation
Phone: +7 (383) 363-80-24 (acc. 53-16).
Fax: +7 (383) 363-80-16.
E-mail: tsypchenkovaes@gmail.com

Образец цитирования:

Е.С. Цыпленкова, Е.А. Вязовая, Е.Д. Даниленко
«Изучение влияния двуспиральных РНК на активность
мышинных спленоцитов методом проточной
цитометрии» // Медицинская иммунология, 2023.
Т. 25, № 2. С. 387-394.
doi: 10.15789/1563-0625-STE-2572

© Цыпленкова Е.С. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.S. Tsyplenkova, E.A. Vyazovaya, E.D. Danilenko
“Studying the effect of double-stranded RNA upon activity
of mouse splenocytes using flow cytometry”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2023,
Vol. 25, no. 2, pp. 387-394.
doi: 10.15789/1563-0625-STE-2572

© Tsyplenkova E.S. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-STE-2572

ных клеток. Результаты исследования позволили оценить влияние дсРНК на функцию иммунных клеток в некоторых процессах их взаимодействия, созревания и миграции. Этот подход может быть полезен при разработке оптимальных стратегий отбора и исследовательского скрининга новых адъювантов нуклеиновой природы.

Ключевые слова: дсРНК, PolyI:PolyC, селезенка, В-лимфоциты, антиген-презентирующие клетки, дендритные клетки, мыши

STUDYING THE EFFECT OF DOUBLE-STRANDED RNA UPON ACTIVITY OF MOUSE SPLENOCYTES USING FLOW CYTOMETRY

Tsyplenkova E.S., Vyazovaya E.A., Danilenko E.D.

Institute of Medical Biotechnology, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Berdsk, Novosibirsk Region, Russian Federation

Abstract. Ribonucleic acids (RNA), in particular, double-stranded RNAs, due to their ability to modulate innate immune responses, are of undoubted interest in view of their usage as vaccine adjuvants. However, despite the fact that dsRNA preparations have been known for a long time, the issues of cellular interactions and orientation of immune response upon their exposure have not yet been properly studied. The aim of this work was to evaluate the *in vitro* response of mouse splenocytes to dsRNA exposure in cell cultures, and after drug administration *in vivo*. The studies were carried out in female Balb/c mice. Activation status of various splenocyte populations after treatment with yeast dsRNA and reference substance (PolyI:PolyC) was assessed by means of flow cytometry by expression of CD69 and CD86 activation markers on CD19⁺B lymphocytes and CD11c⁺ dendritic cells (DC). During *in vitro* studies, the splenocytes were incubated in DMEM medium containing 10% fetal calf serum for 22 hours following addition of the yeast dsRNA preparations, or PolyI:PolyC (2.5 µg/mL) preparation. Single-stranded high-polymer RNA (hpRNA), which is a component of the substance, was used as an additional control at the dose of 16 µg/mL. Our study has shown that the activating effect of dsRNA and PolyI:PolyC on expression of CD86 and CD69 markers upon the cells of the entire pool of splenocytes, B lymphocytes and DC. Highly polymeric RNA increased the total number of CD86⁺ cells in the population without changing the expression level of these markers upon B lymphocytes and DCs. When performing the *in vivo* studies, yeast dsRNA substance was administered intravenously into mice at a dose of 2.5 mg/kg, and hpRNA was used at a dose of 16 mg/kg. The number of CD69⁺ and CD86⁺ splenocytes was assessed 4 hours after drug administration. The highest stimulating effect of dsRNA was registered with CD69 expression marker: significantly increased numbers of CD69⁺ cells were registered for B lymphocytes and the entire cell population. The stimulation of CD86 co-receptor expression on B lymphocytes was less pronounced, but statistically significant. The ability of single-stranded and double-stranded RNAs to cause significant increase in CD86⁺ cell numbers was demonstrated among dendritic cell population. The results of the study made it possible to evaluate the effect of dsRNA on the immune cell function, with respect of their interaction, maturation, and migration. This approach may be useful for developing optimal strategies for selection and screening of new nucleic acid-based adjuvants.

Keywords: dsRNA, PolyI:PolyC, spleen, B lymphocytes, antigen-presenting cells, dendritic cells, mice

Исследование проведено в рамках выполнения государственного задания, тема ГЗ-38/21.

Введение

Важным моментом фармацевтической разработки новых лечебно-профилактических средств борьбы с инфекциями является понимание молекулярных и клеточных механизмов иммунных

процессов, разворачивающихся после их применения. Несмотря на то, что первичный контакт с патогеном в ходе инфицирования происходит в «воротах инфекции» и барьерных тканях, традиционно в качестве модели при изучении иммунных реакций используются клетки селезенки. Это связано с тем, что данный орган является важным сайтом кроветворения, где присутствуют все виды иммунокомпетентных клеток, тесно

взаимодействующие как друг с другом, так и с поступающими через кровоток патогенами [2].

Как известно, двуспиральные РНК (дсРНК) благодаря своей структуре, близкой к структуре вирусного агента, способны связываться с клеточными Толл-лайк рецепторами (Toll-like receptors, TLR), запускать сигнальные пути, регулирующие синтез интерферонов, интерлейкинов и ряда других цитокинов [2], индуцировать и модулировать врожденные и адаптивные клеточные иммунные реакции [6, 9]. Препараты на основе синтетической дсРНК PolyI:PolyC проходят клинические и экспериментальные исследования в качестве средств лечения сезонного гриппа, адъювантов вакцин [7]. Однако несмотря на то, что препараты дсРНК известны довольно давно, вопросы клеточных взаимодействий и направленности развития иммунных реакций в условиях их воздействия изучены еще недостаточно [14].

Целью данного исследования являлась оценка реакции спленоцитов (В-лимфоциты, дендритные клетки) мыши на введение препарата двуспиральных РНК *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы

Исследования проведены на 55 самках мышей линии Balb/c возрастом 8–12 недель с массой тела 18–22 г, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирской обл. В ходе экспериментов животные содержались при естественном освещении на стандартном рационе питания со свободным доступом к воде.

В экспериментах использовали субстанцию натриевой соли дсРНК (далее дсРНК), выделенной из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (ООО «Диафарм», г. Бердск Новосибирской области), с содержанием нуклеотидного материала 95,2%, из которого 13,6% — дсРНК, 86,4% — одноцепочечные высокополимерные РНК (впРНК). В качестве препарата сравнения использовали синтетический комплекс PolyI:PolyC (Sigma-Aldrich, США) и препарат впРНК (ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, г. Бердск Новосибирской области).

В экспериментах *in vitro* суммарный пул спленоцитов получали путем измельчения селезенки intactных мышей ножницами в среде ДМЕМ, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (Fetal calf serum, FCS), 0,004% гентамицина, и фильтрации клеточной суспензии через сито с размером пор 70 мкм (BD Falcon, США). Клетки обрабатывали раствором, лизирующим эритроциты (150 мМ NH_4Cl , 2 мМ HEPES , 1 мМ ЭДТА, рН 7,4), в течение 8 мин при комнатной температуре с последующей отмывкой средой ДМЕМ с 10% FCS и гентамицином. После подсчета в ка-

мере Горяева клетки разносили по лункам 24-луночного планшета в количестве $1,5 \times 10^6$ спленоцитов в лунку в объеме 1,5 мл и инкубировали в течение 22 ч при 37 °С в среде ДМЕМ с 10% FCS и гентамицином (контроль). В опытные лунки добавляли субстанцию натриевой соли дсРНК в дозе 2,5 мкг на 1 мл среды в лунке. В качестве дополнительного контроля использовали препарат впРНК (ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, г. Бердск Новосибирской области) в дозе, соответствующей содержанию впРНК в субстанции дсРНК (16 мкг на 1 мл среды в лунке), или раствор PolyI:PolyC в дозе, эквивалентной дозе дсРНК, в качестве положительного контроля.

В исследовании *in vivo* дрожжевую дсРНК вводили мышам внутривенно в дозе 2,5 мг/кг, впРНК в дозе 16 мг/кг в объеме 0,5 мл на 20 г массы тела. Контрольные животные получали инъекцию физиологического раствора в том же объеме. Эксперименты проводили в трех повторах, группы состояли из 4–5 животных. Получение клеточной суспензии и культивирование клеток проводили способом, описанным выше, без внесения в культуральную среду препаратов.

Субпопуляционный состав и функциональную активность клеток селезенки определяли методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител производства фирмы eBioscience (США). Клетки снимали с планшета пипетированием и концентрировали до $1,5 \times 10^6/0,075$ мл центрифугированием при 250 g. Перед окрашиванием клетки инкубировали с анти-CD32/CD16 (клон 2.4G2) мыши в течение 15 минут при 4 °С для блокирования неспецифического связывания через Fc-рецепторы. Для окрашивания антителами из лунок отбирали по 1×10^6 клеток в 50 мкл среды ДМЕМ с 2% FCS. Для иммунофенотипирования в экспериментах использовали традиционные маркеры: CD19 (APC), B220 (PC7), CD11c (APC), CD86 (APC, PE), CD69 (APC). Клетки отмывали 500 мкл среды с последующим центрифугированием и далее ресуспендировали в 350 мкл раствора Хенкса для анализа на цитофлуориметре.

Для идентификации погибших клеток в пробирку добавляли 5 мкл 7AAD (BioLegend, США) на 1×10^6 клеток за 5–10 минут до анализа.

Цитометрический анализ проводили на приборе CytoFlex (Beckman Coulter, США) с использованием программного обеспечения CytExpert 2.4. Для каждого образца было записано 10 000–20 000 событий. Выбор региона исследования осуществляли с использованием параметров прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния. Устранение сигналов от агрегатов клеток и их обломков выполняли на графике площади пика

флуоресценции (FSC-A) в зависимости от высоты пика флуоресценции (FSC-H).

Статистический анализ проводили с помощью пакета статистических программ Statgraphics, Vers. 5.0 (Statistical Graphic Corp., США). Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me), 1-го ($Q_{0,25}$) и 3-го ($Q_{0,75}$) квартилей. Для оценки значимости межгрупповых различий использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез (p) принимали равным 0,05.

Результаты и обсуждение

При анализе спленоцитов на графиках прямого и бокового светорассеяния отмечено, что клетки после инкубации и всех этапов пробоподготовки формируют дополнительный регион P2

(рис. 1Б), в отличие от свежевыделенных клеток (рис. 1А).

Окрашивание с помощью 7AAD показало, что в регионе P2 преобладают погибшие клетки (90% и более). Это позволяет предположить, что некоторые клеточные субпопуляции в экспериментах *in vitro* могут быть представлены в меньших количествах, чем *in vivo* (рис. 1В). Для дальнейшего анализа во всех экспериментах использовали регион P1.

Оценка жизнеспособности спленоцитов после 22 часов инкубации с дсРНК показала, что препарат не оказывал влияния на количество погибших клеток в регионе P1. Доля 7AAD-положительных клеток в опытной группе составила 0,9 (0,9–1,1) %, в контроле – 0,6 (0,6–1,6) %. PolyI:PolyC также не оказывал токсического действия на спленоциты: доля погибших клеток в

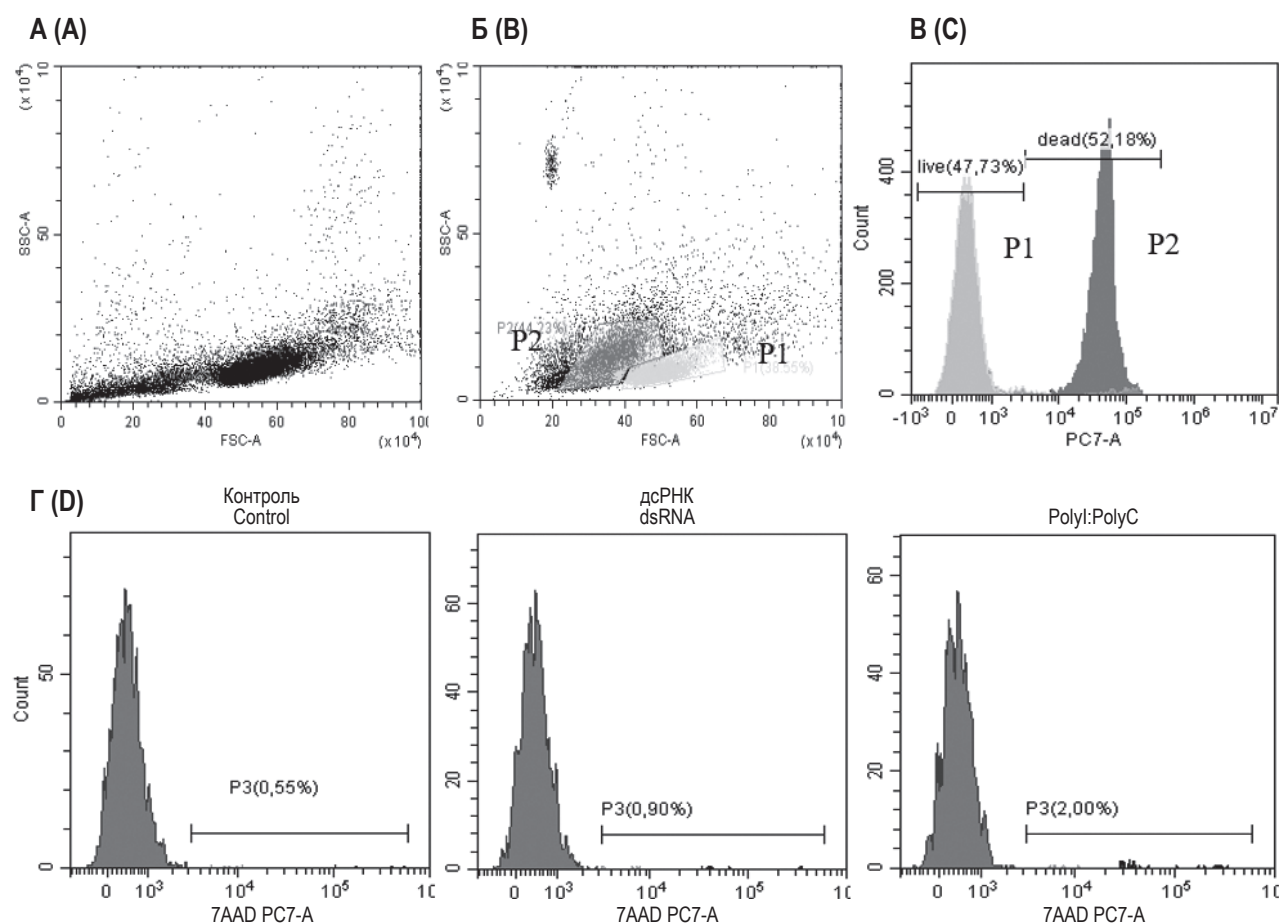


Рисунок 1. Характеристика спленоцитов по морфологическим параметрам и жизнеспособности

Примечание. А – график распределения спленоцитов по параметрам FSC и SSC сразу после выделения. Б – график распределения спленоцитов по параметрам FSC и SSC после 22 часов инкубации. В – гистограмма распределения 7AAD⁺ в регионах P1 и P2 после 22 часов инкубации. Г – гистограмма распределения 7AAD⁺ в регионе P1 после 22 часов инкубации.

Figure 1. Characteristics of splenocytes by morphological parameters and viability

Note. (A) Graph of splenocyte distribution according to FSC and SSC parameters immediately after isolation. (B) Graph of splenocyte distribution by FSC and SSC parameters after 22 hours of incubation. (C) Histogram of 7AAD⁺ distribution in P1 and P2 regions after 22 hours of incubation. (D) Histogram of 7AAD⁺ distribution in P1 region after 22 hours of incubation.

этих лунках, в среднем, составляла 2,0 (2,0-3,3) % (рис. 1Г).

В процессе иммунофенотипирования спленоцитов после инкубации в среде ДМЕМ с 10% FCS установлено, что относительное содержание В-лимфоцитов (CD19⁺) в исследуемом регионе составляло 16,3±2,8%. Субпопуляционный состав В-клеток был достаточно однороден, около 95% из них несли на клеточной поверхности маркер B220⁺. Определение относительного содержания общих маркеров активации лимфоцитов показало более низкие уровни экспрессии на спленоцитах маркера CD69 относительно CD86. Доля дендритных клеток (CD11c⁺) составляла 0,9±0,2%.

Инкубация спленоцитов с препаратами дсРНК приводила к значительному увеличению количества клеток, несущих фенотип CD19⁺CD86⁺, в общем исследуемом регионе (рис. 2А).

Формирование пула клеток, несущих маркер активации CD86, внутри популяции В-лимфоцитов приводило к статистически значимому повышению данного показателя по сравнению с группой контроля (рис. 2Б).

Как известно, CD86 является лигандом белков клеточной мембраны Т-лимфоцитов. Экспрессия CD86 на В-лимфоцитах ведет к их взаимной стимуляции с Т-лимфоцитами и последующей специфической дифференцировке. Индукция CD86 на поверхности В-клеток под действием дсРНК свидетельствует о ее способности оказывать регуляторное влияние на процессы клеточных взаимодействий.

Сравнительная оценка влияния на экспрессию корцептора CD86 разных типов дсРНК показала, что синтетический комплекс PolyI:PolyC оказывал сходное действие на В-лимфоциты (рис. 2В). Следовательно, можно предположить, что несмотря на различия в источнике и спосо-

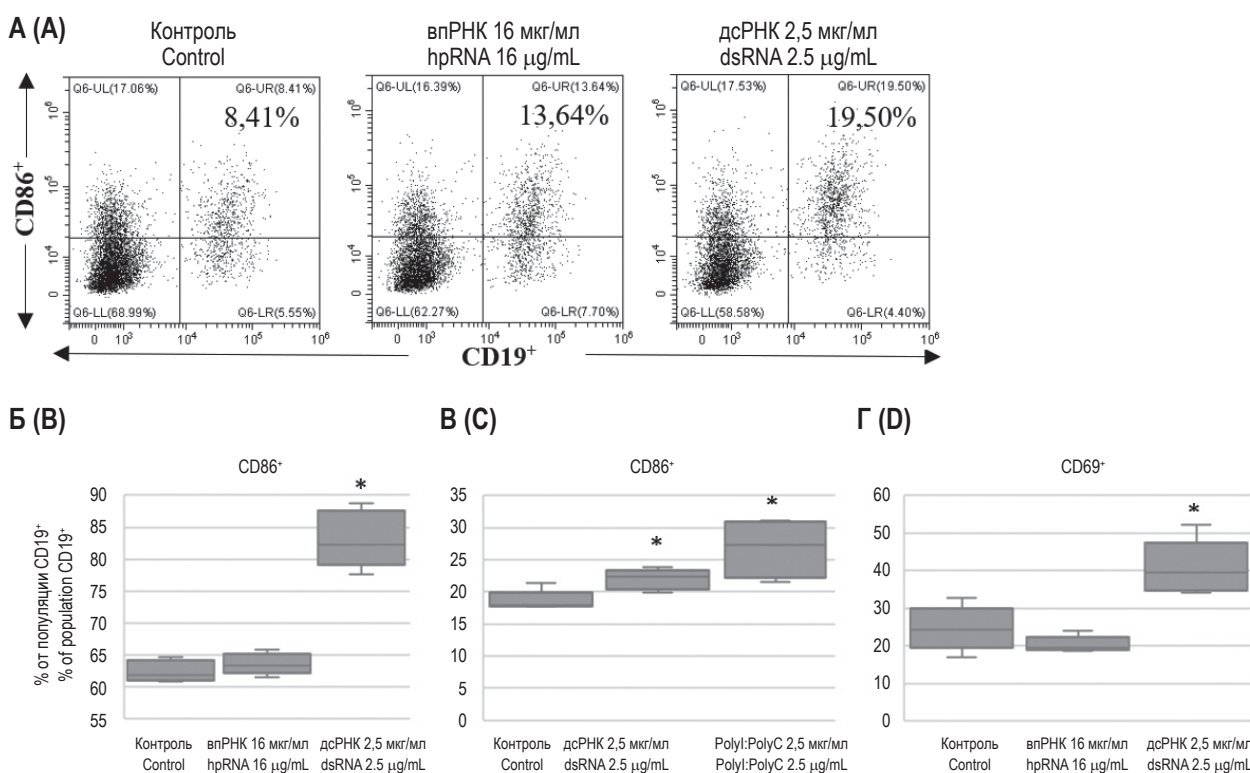


Рисунок 2. Относительное количество маркеров активации на поверхности клеток селезенки мышей Balb/c после 22 часов инкубации с препаратами РНК

Примечание. А – распределение CD19⁺ и CD86⁺ на клетках исследуемого региона. Б – процент CD86⁺ в гейте CD19⁺ в первой серии экспериментов. В – процент CD86⁺ в гейте CD19⁺ во второй серии экспериментов. Г – процент CD69⁺ в гейте CD19⁺. * – статистически значимое отличие относительно контрольной группы, непараметрический критерий Манна–Уитни, $p < 0,05$.

Figure 2. Relative number of activation markers on the surface of the spleen cells of Balb/c mice after 22 hours of incubation with RNA preparations

Note. (A) Distribution of CD19⁺ and CD86⁺ on the cells of the studied region. (B) Percentage of CD86⁺ in CD19⁺ gate in the first series of experiments. (C) Percentage of CD86⁺ in CD19⁺ gate in the second series of experiments. (D) Percentage of CD69⁺ in CD19⁺ gate. *, statistically significant difference relative to the control group, nonparametric Mann–Whitney criterion, $p < 0.05$.

без получения, молекулы дсРНК разной природы воздействуют на одни и те же клеточные механизмы активации иммунных клеток. Поскольку двуспиральные РНК играют роль регуляторов врожденного иммунитета [5, 15], в то время как

CD86 является элементом адаптивных иммунных реакций, полученные данные могут свидетельствовать о комбинаторном эффекте дсРНК на функцию В-клеток. Аналогичные закономерности, отражающие связь между эффектами

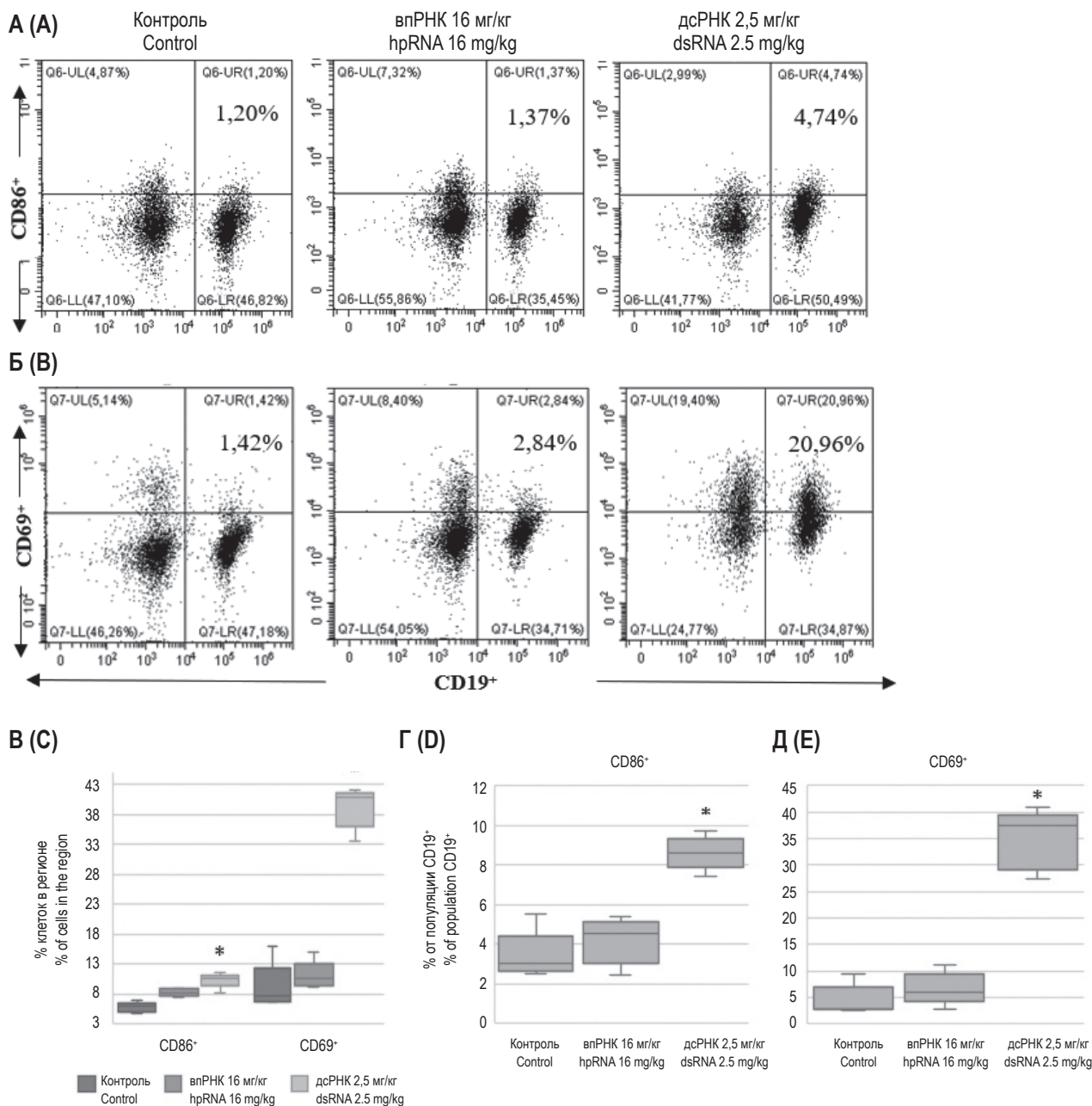


Рисунок 3. Относительное количество маркеров активации на поверхности клеток селезенки мышей Balb/c через 4 часа после внутривенного введения препаратов РНК

Примечание. А – распределение CD19⁺ и CD86⁺ на клетках исследуемого региона. Б – распределение CD19⁺ и CD69⁺ на клетках исследуемого региона. В – относительное количество CD86⁺ и CD69⁺ на поверхности клеток селезенки. Г – процент CD86⁺ в гейте CD19⁺. Д – процент CD69⁺ в гейте CD19⁺. * – статистически значимое отличие относительно контрольной группы, непараметрический критерий Манна–Уитни, $p < 0,05$.

Figure 3. Relative number of activation markers on the surface of the spleen cells of Balb/c mice 4 hours after intravenous administration of RNA preparations

Note. (A) Distribution of CD19⁺ and CD86⁺ on the cells of the studied region. (B) Distribution of CD19⁺ and CD69⁺ on the cells of the studied region. (C) Relative amount of CD86⁺ and CD69⁺ on the surface of the spleen cells. (D) Percentage of CD86⁺ in CD19⁺ gate. (E) Percentage of CD69⁺ in CD19⁺ gate. *, statistically significant difference relative to the control group, nonparametric Mann–Whitney criterion, $p < 0.05$.

врожденных и костимулирующих сигналов на В-клетки при заражении вирусным агентом, описаны авторами работы [10].

Одноцепочечная РНК, входящая в состав препарата, в отличие от дсРНК, стимулирующего влияния на поверхностную экспрессию данного активационного маркера на В-клетках не оказывала.

Оценка уровня экспрессии CD69 на спленоцитах показала выраженный рост количества CD69⁺ клеток в популяции CD19⁺ под воздействием дсРНК (рис. 2Г). Как известно, экспрессия CD69 повышается при активации лимфоцитов разных типов [13], что лежит в основе его широкого использования в качестве активационного маркера. В результате идентификации специфических лигандов данного маркера (Gal-1, S1P1) установлена способность CD69 модулировать дифференцировку Т-клеток [4] и регулировать их выход из лимфоидных органов [12]. Таким образом, можно предположить, что дсРНК, усиливая экспрессию CD69, способна влиять на процессы клеточного созревания и миграции.

Следует отметить, что внесение в культуральную среду дсРНК приводило к активации не только В-лимфоцитов, но и всего клеточного пула селезенки (графические данные не приведены). Анализ процентного содержания CD86⁺ и CD69⁺ во всем клеточном регионе выявил статистически значимое повышение данных маркеров в опытных группах. Относительное количество CD86⁺ увеличилось с 25,3 (25,2–25,5) % в контроле до 35,2 (32,3–36,8) % в опыте (группа «дсРНК»), CD69⁺ — с 7,5 (6,7–9,5) % до 15,2 (12,9–16,8) %, соответственно. В популяции дендритных клеток (ДК) (CD11c⁺) обнаружено достоверное увеличение доли CD11c⁺CD86⁺ (в 1,3 раза, по сравнению с контролем), что свидетельствует о стимулирующем действии дсРНК и на это звено иммунитета.

Препарат впРНК, также как дсРНК, статистически значимо повышал относительное количество CD86⁺ клеток общего клеточного региона (до 27,1 (27,0–28,8) %), но при этом не оказывал влияния на активность ДК и экспрессию CD69.

Оценка экспрессии активационных маркеров на поверхности спленоцитов мышей после внутривенной инъекции дсРНК, как и в экспериментах *in vitro*, продемонстрировала усиление данного процесса (рис. 3А, Б).

Наибольший стимулирующий эффект был отмечен в отношении CD69: его общая экспрессия на спленоцитах повышалась в 4 раза, в популяции CD19⁺ — в 8 раз (рис. 3В, Д). Несколько менее выраженным был эффект в отношении CD86, что, возможно, связано с тем, что временная точка являлась слишком ранней для тестирования развития костимулирующего сигнала (рис. 3В, Г). Несмотря на это, относительное количество CD11c⁺CD86⁺ в популяции ДК статистически значимо возрастало после введения дсРНК с 14,0 (13,0–16,9) % до 29,5 (28,9–30,4) %. Повышение числа CD11c⁺CD86⁺ ДК было отмечено и в случае введения впРНК (до 22,5 (19,4–26,0) %).

Как было показано авторами работы [12], внутривенное введение PolyI:PolyC способствует существенному увеличению экспрессии CD69 на клетках лимфоидных органов на фоне снижения его количества в кровотоке. Можно предположить, что подобный механизм позволяет локально увеличивать количество лимфоцитов в месте реакции, необходимое для развития иммунного ответа. Стоит отметить, что активность лимфоцитов в селезенке и лимфатических узлах способна повышаться под действием стромальных соединительнотканых клеточных элементов, которые продуцируют цитокины в ответ на TLR-опосредованную стимуляцию дсРНК [8].

Заключение

Установлено, что препарат дсРНК, выделенной из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (субстанция), обладал способностью повышать экспрессию клеточных маркеров активации CD86 и CD69 на В-лимфоцитах и дендритных клетках селезенки как в культуре клеток, так и в экспериментах *in vivo*. Высокополимерная одноцепочечная РНК такими свойствами в отношении данных маркеров не обладала, хотя следует отметить ее вклад в рост количества CD86⁺ спленоцитов *in vitro* и CD86⁺ клеток в популяции ДК после внутривенного введения. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о способности двуспиральных РНК регулировать реакции не только врожденного, но и приобретенного иммунитета, что может быть важно с точки зрения перспектив использования препаратов данного класса в качестве вакцинных адъювантов.

Список литературы / References

1. Батенева А.В., Гамалей С.Г., Лебедев Л.Р., Даниленко Е.Д. Стимулирующее влияние дрожжевой двуспиральной РНК на активность генов белков системы интерферона // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 6. С. 1155–1162. [Bateneva A.V., Gamaley S.G., Lebedev L.R., Danilenko E.D. Activation of interferon system gen transcription by yeast double-stranded RNA. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 6, pp.1155–1162. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-SEO-2082.

2. Antoniak S., Tatsumi K., Bode M., Vanja S., Williams J.C., Mackman N. Protease-activated receptor 1 enhances Poly I:C induction of the antiviral response in macrophages and mice. *J. Innate Immun.*, 2017, Vol. 9, no. 2, pp. 181-192.
3. Barr T.A., Brown S., Ryan G., Zhao J., Gray D. TLR-mediated stimulation of APC: Distinct cytokine responses of B cells and dendritic cells. *Eur. J. Immunol.*, 2007, Vol. 37, no. 11, pp. 3040-3053.
4. de la Fuente H., Cruz-Adalia A., del Hoyo G.M., Cibrián-Vera D., Bonay P., Pérez-Hernández D., Vázquez J., Navarro P., Gutierrez-Gallego R., Ramirez-Huesca M., Martín P., Sánchez-Madrid F. The leukocyte activation receptor CD69 controls T cell differentiation through its interaction with galectin-1. *Mol. Cell Biol.*, 2014, Vol. 34, no. 13, pp. 2479-2487.
5. Gantier M., Williams B. The response of mammalian cells to double-stranded RNA. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2007, Vol. 18, no. 5-6, pp. 363-371.
6. Kawai T., Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 2011, Vol. 34, no. 5, pp. 637-650.
7. Matsumoto M., Tatematsu M., Nishikawa F., Azuma M., Ishii N., Morii-Sakai A., Shime H., Seya T. Defined TLR3-specific adjuvant that induces NK and CTL activation without significant cytokine production *in vivo*. *Nat. Commun.*, 2015, Vol. 6, no. 6280. doi: 10.1038/ncomms7280.
8. Nelson J., Sorensen E.W., Mintri S., Rabideau A.E., Zheng W., Besin G., Khatwani N., Su S.V., Miracco E.J., Issa W.J., Hoge S., Stanton M.G., Joyal J.L. Impact of mRNA chemistry and manufacturing process on innate immune activation. *Sci. Adv.*, 2020, Vol. 6, no. 26, pp. 4-22.
9. Randall R.E., Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.*, 2008, Vol. 89, no. 1, pp. 1-47.
10. Rau F.C., Dieter J., Zhang L., Priest S.O., Baumgarth N., B7-1/2 (CD80/CD86) direct signaling to B cells enhances IgG secretion. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 12, pp. 7661-7671.
11. Sabbatini P., Tsuji T., Ferran L., Ritter E., Sedrak C., Tuballes K., Jungbluth A.A., Ritter G., Aghajanian C., Bell-McGuinn K., Hensley M.L., Konner J., Tew W., Spriggs D.R., Hoffman E.W., Venhaus R., Pan L., Salazar A.M., Diefenbach C.M., Old L.J., Gnjjatic S. Phase I trial of overlapping long peptides from a tumor self-antigen and poly-ICLC shows rapid induction of integrated immune response in ovarian cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, 2012, Vol. 18, no. 23, pp. 6497-6508.
12. Shiow L.R., Rosen D.B., Brdicková N., Xu Y., An J., Lanier L.L., Cyster J.G., Matloubian M. CD69 acts downstream of interferon- α/β to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature*, 2006, Vol. 440, no. 7083, pp. 540-544.
13. Teodorovic L.S., Riccard C., Torres R.M., Pelanda R. Murine B cell development and antibody responses to model antigens are not impaired in the absence of the TNF receptor GITR. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, no. 2e31632. doi: 10.1371/journal.pone.0031632.
14. Uehata T., Takeuchi O. RNA recognition and immunity-innate immune sensing and its posttranscriptional regulation mechanisms. *Cells*, 2020, Vol. 9, no. 7, 1701. doi: 10.3390/cells9071701.
15. Yoneyama M., Fujita T. Recognition of viral nucleic acids in innate immunity. *Rev. Med. Virol.*, 2010, Vol. 20, no. 1, pp. 4-22.

Авторы:

Цыпленкова Е.С. — младший научный сотрудник отдела биологических исследований, Институт медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, г. Бердск, Новосибирская обл., Россия

Вязовая Е.А. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела биологических исследований, Институт медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, г. Бердск, Новосибирская обл., Россия

Даниленко Е.Д. — к.б.н., директор Института медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, г. Бердск, Новосибирская обл., Россия

Authors:

Tsyplenkova E.S., Junior Research Associate, Department of Biological Studies, Institute of Medical Biotechnology, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Berdsk, Novosibirsk Region, Russian Federation

Vyazovaya E.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Biological Studies, Institute of Medical Biotechnology, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Berdsk, Novosibirsk Region, Russian Federation

Danilenko E.D., PhD (Biology), Director, Institute of Medical Biotechnology, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Berdsk, Novosibirsk Region, Russian Federation

Поступила 26.08.2022

Отправлена на доработку 02.11.2022

Принята к печати 08.11.2022

Дата онлайн-публикации 14.11.2022

Received 26.08.2022

Revision received 02.11.2022

Accepted 08.11.2022

Date of publication online 14.11.2022