

## **АКТИВАЦИЯ ГЕНОВ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ ИММУНИТЕТА: РАЗЛИЧНАЯ ИНДИВИДУАЛЬНАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОК КРОВИ ЧЕЛОВЕКА К ПРЕПАРАТАМ ИНТЕРФЕРОНОВ И ИНДУКТОРОВ IFN**

**Соколова Т.М.<sup>1</sup>, Шувалов А.Н.<sup>1</sup>, Шаповал И.М.<sup>1</sup>, Соколова З.А.<sup>2</sup>,  
Ершов Ф.И.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУ «ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва, Россия

**Резюме.** Исследовали дозовые эффекты препаратов Генфаксон (бета1-IFN), Циклоферон и Иммуномакс (индукторы IFN) на экспрессию 6 генов сигнальных путей иммунитета (TLR3, TLR4, RIG1, IRF3, IPS, B2M) в клетках крови 3-х разных людей методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Обнаружено, что доноры имеют различную чувствительность к исследованным препаратам, возможно, обусловленную конститутивными уровнями активности генов TLR3 и TLR4 и связанную с их иммунной патологией. Генфаксон в дозе 10<sup>4</sup> МЕ давал сильную стимуляцию экспрессии генов TLR3, TLR4, IRF3 и B2M у двух людей, Иммуномакс в дозе 0,5 единиц имел такие же эффекты только у одного мужчины (с инфекцией вирусом Эпштейна–Барр). Циклоферон стимулировал генную экспрессию значительно слабее у всех доноров. Мы показали обратную корреляцию чувствительности клеток человека к препарату Иммуномакс от конститутивных уровней активности TLR3 и TLR4 генов. Стимулирующие эффекты Иммуномакса были максимальными у человека с очень низкими TLR3/4 генными уровнями. Иммуномакс стимулировал гены нескольких сигнальных путей, включая TLR3, TLR4, но RIG1/IPS генные пути были активированы сильнее. Циклоферон индуцировал генную транскрипцию факторов IRF3 и B2M лучше, чем TLR3, TLR4. Таким образом, наши данные подтверждают IFN-индуцирующие свойства препаратов Генфаксон, Иммуномакс и Циклоферон в клетках крови человека. Тестирование экспрессии генов сигнальных путей иммунитета методом ОТ-ПЦР в реальном времени позволит быстро и с высокой специфичностью оценивать активности препаратов IFN и индукторов IFN без использования биологического метода клеточных культур.

*Ключевые слова:* индукторы-IFN, сигнальные иммунные гены, клетки крови

### **Адрес для переписки:**

Соколова Татьяна Михайловна  
ФГБУ «ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии  
им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ  
123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, 18.  
Тел.: 8 (499) 193-43-19.  
Факс: 8 (499) 193-61-83.  
E-mail: tmsokolovavir@mail.ru

### **Address for correspondence:**

Sokolova Tatiana M.  
Federal State Budgetary Institution "N.F. Gamaleya Federal  
Research Centre for Epidemiology and Microbiology", Russian  
Ministry of Health Care  
123098, Russian Federation, Moscow, Gamaleya str., 18.  
Phone: 7 (499) 193-43-19.  
Fax: 7 (499) 193-61-83.  
E-mail: tmsokolovavir@mail.ru

### **Образец цитирования:**

Т.М. Соколова, А.Н. Шувалов, И.М. Шаповал, З.А. Соколова,  
Ф.И. Ершов, «Активация генов сигнальных путей  
иммунитета: различная индивидуальная чувствительность  
клеток крови человека к препаратам интерферонов  
и индукторов IFN» // Медицинская иммунология, 2015, Т. 17,  
№ 1. С. 7-18.

doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-7-18

© Соколова Т.М. и соавт., 2015

### **For citation:**

T.M. Sokolova, A.N. Shuvalov, I.M. Shapoval, Z.A. Sokolova,  
F.I. Ershov, "Activation of genes controlling the immune signaling  
pathways: differential individual sensitivity of human blood cells for  
interferon preparations and IFN inducers",  
*Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*,  
2015, Vol. 17, no. 1, pp. 7-18.

doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-7-18

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-7-18>

# ACTIVATION OF GENES CONTROLLING THE IMMUNE SIGNALING PATHWAYS: DIFFERENTIAL INDIVIDUAL SENSITIVITY OF HUMAN BLOOD CELLS FOR INTERFERON PREPARATIONS AND IFN INDUCERS

Sokolova T.M.<sup>a</sup>, Shuvalov A.N.<sup>a</sup>, Shapoval I.M.<sup>a</sup>, Sokolova Z.A.<sup>b</sup>, Ershov F.I.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> FSBI "N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Russian Ministry of Health Care", Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> FSBSI "N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center", Moscow, Russian Federation

**Abstract.** We have studied dose effects of several Interferon (IFN) inducers, i.e., Genfaxon (beta-1 IFN), Cycloferon and Immunomax upon expression of six genes controlling the signaling in immune pathways (TLR3, TLR4, RIG1, IRF3, IPS, B2M), by means of real-time RT-PCR, being tested with blood cells from three humans. It is revealed that individual cell samples showed different sensitivity to these drugs, probably, due to constitutive levels of TLR3 and TLR4 gene expression and possible connections with their immune pathology. Genfaxon at a dose of 10<sup>4</sup> ME produced potent stimulation of TLR3, TLR4, IRF3 and B2M genes in two persons. Immunomax, at a dose 0,5 unit, exhibited same effect in one case only (with Epstein-Barr virus infection). Cycloferon stimulated gene expression at much lower levels than Genfaxon in any cases. We have shown a reverse correlation between sensitivity of the cells to Immunomax, and constitutive TLR3 and TLR4 expression. The stimulatory effects of Immunomax were maximal in a person with very low TLR3/4 gene expression. Immunomax boosted the genes from several signaling pathways, including TLR3, TLR4, but genes of RIG/IPS pathway showed higher activation. Cycloferon induced gene transcription of IRF3 and B2M-receptor to higher degree, than expression of TLR3 and TLR4 genes. Hence, our data concerning Genfaxon, Immunomax and Cycloferon confirm their IFN-inducing effects upon human blood cells. The RT-PCR-based evaluation of gene expression related to signaling immune pathways in blood cell populations will enable rapid and highly specific quantitation of IFN and IFN-inducer drugs activities, thus avoiding their biological testing in long-term cell cultures.

*Keywords:* IFN-inducers, immune signaling genes, blood cells

## Введение

Сигнальные реакции иммунного ответа начинаются с рецепторов врожденного иммунитета, расположенных на мембране, в эндосомах клеток (TLRs) и локализованных в цитоплазме RLRs и NRLs [8, 23, 24]. Интерфероны (IFN) типа I стимулируют экспрессию TLRs рецепторов [25, 29]. Эндосомальный рецептор TLR3 узнает двуспиральные РНК (дсРНК) и играет важную роль в антивирусной защите клеток от вирусов. Мембранный рецептор TLR4 реагирует на липополисахариды бактерий, глюкозаминогликаны и компоненты оболочки вирусов. Адаптором TLR3 является белок TRIF, передающий сигнал на гены IFN типа 1. В TLR4 сигнальных путях

участвует белок MyD88, но также может быть включен и белок TRIF [16]. Рецептор RIG1 узнает в цитоплазме короткие дсРНК и 5'-фосфорилированные РНК (5'-pppРНК) и передает сигнал на митохондриальный адапторный белок IPS (также известный как MAVS и VISA). Таким образом, сигнальные TLR3/4 и RIG1 пути имеют общий результирующий этап – активация фактора транскрипции IRF3 и его взаимодействие с промотором гена бета-IFN [24]. Образовавшийся IFN индуцирует каскад STAT1/2-IRF9 сигналов активации множества IFN-зависимых генов [27, 28]. Среди них группа иммунорегуляторных цитокинов и бета-2-микроглобулин (B2M) – корецептор активированных Т-лимфоцитов. В комплексе с белками главного комплекса ги-

стосовместимости В2М обеспечивает специфическое узнавание антигенов и усиливает синтез специфических антител (гуморальный ответ В-лимфоцитов) [21, 22].

Индивидуальная чувствительность к препаратам IFN и их индукторам представляет серьезную медицинскую проблему. Причины различий в индивидуальном ответе людей на лекарства в большинстве случаев остаются неизвестными. Исследованные нами фармпрепараты Генфаксон (бета1-IFN), Иммуномакс и Циклоферон широко применяются как противовирусные и антибактериальные и иммунокорректирующие препараты [2, 6, 7]. Лечебное действие Генфаксона на аутоиммунные процессы объясняют антипролиферативной активностью высоких доз рекомбинантного бета1-IFN и индукцией экспрессии TLR7 в дендритных клетках [19, 20]. Циклоферон (метилглюкаминавая соль акриданона) является известным индуктором IFN с широким спектром нозологического применения [7]. Механизм его противовирусного, антибактериального и иммуномодулирующего действия активно изучается, но во многом остается непонятным [30, 31]. На основе ряда полученных производных акриданона создаются эффективные противоопухолевые препараты [3, 18]. По нашим данным, Циклоферон индуцирует транскрипцию мРНК IFN типа 1 в клетках крови человека и является регулятором апоптоза [9, 11, 12]. Иммуномакс (растительный пептидогликан) сочетает иммуномодулирующие и IFN-индуцирующие свойства в клетках человека [1, 14].

Для сравнения сигнальных путей действия бета-1IFN «Генфаксона», иммунодулятора «Иммуномакс» и IFN-индуктора «Циклоферона» в клетках крови 3-х разных людей впервые проведен количественный анализ экспрессии 6-ти генов (TLR3, TLR4, RIG1, IPS, IRF3 и В2М) методом количественной ОТ-ПЦР в реальном времени.

## Материалы и методы

**Препараты.** Генфаксон – рекомбинантный бета-1a-IFN (производитель Laboratoire TUTEUR S.A.C.I.F.I.A), выпускается в шприцах 0,5 мл (44 мкг) с активностью 12 млн МЕ. Иммуномакс (Иммафарма, Москва) по химической природе является кислым пептидогликаном с молекулярной массой 1000-40000 kDa. По данным производителя, препарат выделен из растительных и очищен хроматографическими методами,

содержит 200 ЕД активного вещества, предназначен для внутримышечного введения. Циклоферон – N-метилглюкаминавая соль акридонуксусной кислоты, 12,5% водный раствор («Полисан» НТФФ).

**Постановка опытов на клетках крови человека.** Венозная кровь была взята у 3-х разных людей: мужчина 27 лет, носитель вируса Эпштейна–Барр (донор 1); женщина 65 лет с онкологическим заболеванием 1 стадии (донор 2); женщина 53 лет с сердечно-сосудистой патологией (донор 3). 5 мл свежей крови разводили в 15 мл питательной среде RPMI-1640 с глутамином, содержащей 10% сыворотки телят и антибиотик гентамицин. Разведенную кровь разливали по 1 мл в культуральные стерильные пробирки с герметичными пробками. К ней добавляли приготовленные разведения препаратов по 10 мкл. Исследованные дозы Генфаксона составили  $10^5$ ,  $10^4$  и  $10^3$  МЕ/мл, Иммуномакса – 5 и 0,5 ед/мл, Циклоферона – 600 и 125 мкг/мл. Выбор исследованных доз Циклоферона и Иммуномакса сделан исходя из ранее полученных нами данных об их IFN-индуцирующих свойствах в клетках крови человека [9, 12, 14]. Дозы Иммуномакса не вызывали видимых изменений клеточной морфологии и проницаемости (окраска трипановым синим). Инкубацию клеток крови с препаратами проводили 20 ч при 37° С в термостате, затем клетки осаждали при 1000 об/мин на центрифуге. Осадки клеток лизировали в 0,8 мл реагента Purzol (Bio-Rad, США), согласно инструкции, и использовали для выделения РНК и анализа экспрессии генов методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

**Действие Циклоферона в клетках линии Jurkat** (Т-клеточный лимфобластоидный лейкоз) получено из РОНЦ им. Н.Н. Блохина. К суспензионной культуре с плотностью  $10^6$  клеток/мл в питательной среде RPMI-1640 с глутамином, содержащей 10% сыворотки телят и антибиотик гентамицин, добавляли разные дозы препарата на 2 ч при 37 °С. Конечные концентрации Циклоферона варьировали от 2500 до 78 мкг/мл. Затем клетки осаждали центрифугированием и отмывали от препаратов и продолжали инкубацию в свежей питательной среде 24 ч при 37 °С. Из осадков клеток выделяли РНК, как описано выше для клеток крови, и определяли экспрессию генов «домашнего хозяйства» и генов альфа-IFN.

**ОТ-ПЦР в реальном времени.** Подробное описание процедуры выделения РНК, обработки

ТАБЛИЦА 1. СТРУКТУРА ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПЦР-ПРАЙМЕРОВ

Ген/мРНК	Последовательность нуклеотидов 5'-----3'	Размер ПЦР продукта н.п.*
TLR3	П – AGT GCC GTC TAT TTG CCA CA О – GCA TCC CAA AGG GCA AAA GG	149
TLR4	П – GTC AGA CGG TGA TAG CGA GC О – TTA GGA ACC ACC TCC ACG CA	177
RIG1	CCA GAG AAC CAG TTG GGC TT TCT CCA CCA TCT CTG GAC ACC	163
IRF3	П – CTG GGG CCC TTC ATT GTA GA О – GTA GGC CTT GTA CTG GTC GG	270
IPS1	GCA AGA GAC CAG GAT CGA CT TCC GCG AGA TCA ACT AGC TC	152

Примечание. \* – нуклеотидные пары.

препарата ДНК-зой, получения кДНК и проведения количественного ПЦР-анализа на приборе CFX-96 (Bio-Rad, США) приведено в нашей более ранней публикации [12]. Структура олигонуклеотидных праймеров, рассчитанных нами, представлена в таблице 1. Праймеры генов «домашнего хозяйства» (18S рибосомальной РНК, глицеральфосфатдегидрогеназы ГФДГ, бета-актина и бета-2-микроглобулина), а также консервативные для генов альфа-IFN опубликованы [10, 12]. Все праймеры были синтезированы фирмой Синтол (Россия). Полученный ПЦР-продукт соответствовал расчетному по Т-плавления и подвижности в агарозном геле. Относительная оценка экспрессии генов (дельта Cq) сдела-

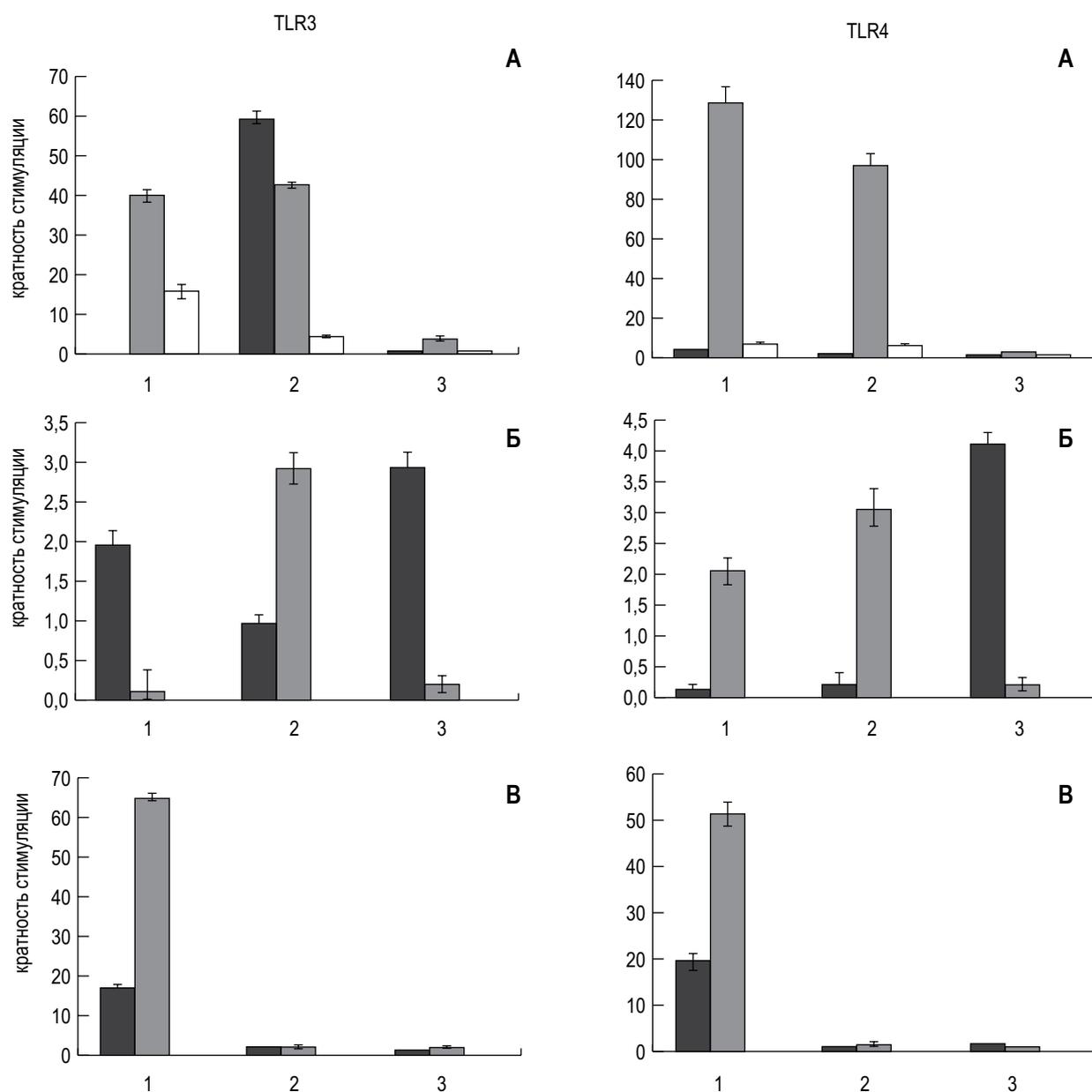
на в программе CFX Manager «Gene expression analysis» в автоматическом режиме.

**Цитотоксичность препарата Циклоферон** исследована в реакции МТТ на клетках аденокарциномы толстого кишечника SW620 (АТТС ССL-227, РОНЦ им. Н.Н. Блохина) согласно описанной методике [5] (табл. 2). Контакт клеток с разными дозами препарата составлял 48 ч при 37 °С, варианты опыта и контроля (без препарата) исследовали в 16 лунках 96-луночного плато. За 5 ч до окончания инкубации в лунки вносили по 20 мкл раствора МТТ (Sigma, Chemical Co, США). Супернатант удаляли и в каждую лунку добавляли по 200 мкл ДМСО, растворителя кристаллов формазана на 10 мин при 37 °С, после чего измеряли оптическую плотность раство-

ТАБЛИЦА 2. ДЕЙСТВИЕ ЦИКЛОФЕРОНА НА КЛЕТочный МЕТАБОЛИЗМ

Метод тестирования	Дозы Циклоферона мкг/мл						
	2500	1250	625	312	156	78	контроль
ОТ-ПЦР Cq* (SD)	Экспрессия генов в клетках Jurkat						
18S рибРНК	23	21	20	18	17	17	18
ГАФДГ	21	19	17	14	13	13	14
B2M	32	30	29	24	24	24	25
альфа-IFN	38	37	35	34	33	34	32
МТТ	Цитотоксичность в культуре клеток SW620 48 часов						
ОЕ** 540 нм	0,8	1,1	1,2	1,4	1,4	1,4	1,4

Примечание. \*Cq – пороговые циклы амплификации, целые средние значения 3-х повторных измерений, SD – стандартные отклонения Cq в пределах 0,1-0,2; \*\* – ОЕ – оптическая плотность, средние значения 16 повторных измерений.

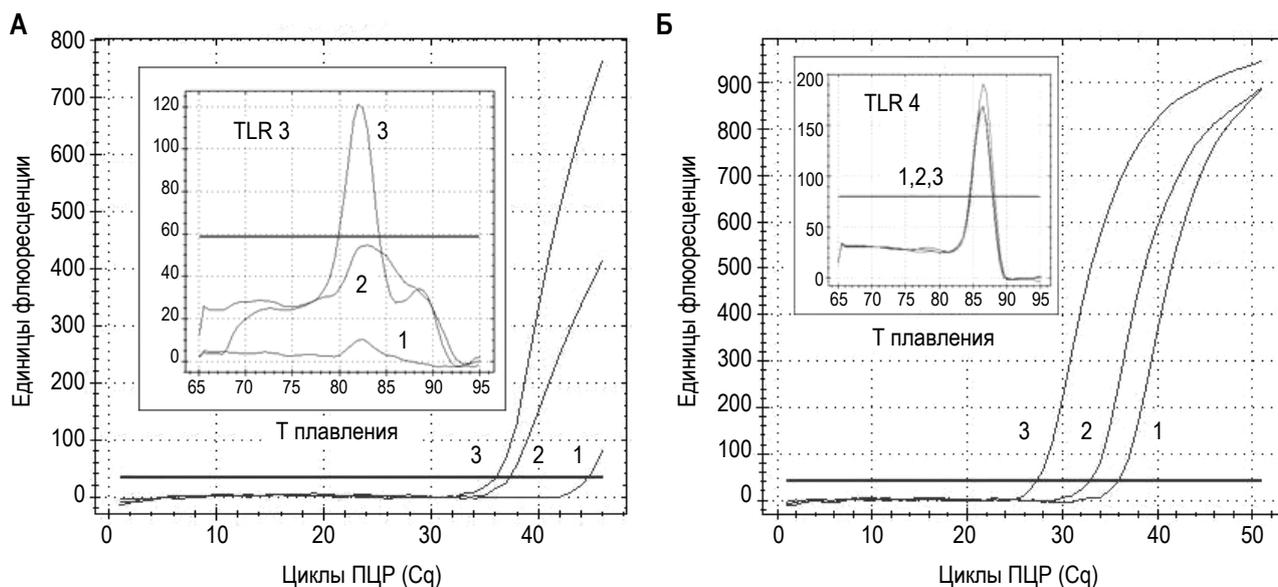


**Рисунок 1.** Экспрессия генов TLR3 и TLR4 в клетках крови человека, индуцированная препаратами Генфаксон (А), Циклоферон (Б) и Иммуномакс (В)

**Примечание.** По оси абсцисс: 1 – донор мужчина 27 лет, носитель вируса Эпштейна–Барр; 2 – донор женщина 65 лет с онкологическим заболеванием; 3 – донор женщина 53 лет с сердечно-сосудистой патологией. По оси ординат – кратность стимуляции транскрипции (дельта-Сq) относительно контроля, принятого равным 1. Столбики черные: Генфаксон 10<sup>5</sup> МЕ/мл, Циклоферон 600 мкг/мл, Иммуномакс 5 ед/мл; столбики серые: Генфаксон 10<sup>4</sup> МЕ/мл, Циклоферон 125 мкг/мл, Иммуномакс 0,5 ед/мл; столбики белые – Генфаксон 10<sup>3</sup> МЕ/мл.

ра на анализаторе иммуноферментных реакций «Униплан» АИФР-01 (Россия). Вычисляли средние значения ОЕ при 540 нм. Опухолевые клетки считали чувствительными к Циклоферону, если наблюдалось достоверное снижение значений средних значений ОЕ в опыте относительно контроля клеток (без добавления препарата).

**Статистическая обработка.** Данные ОТ-ПЦР в реальном времени получены с 3-мя повторными образцами кДНК и представлены как средние значения дельта-Сq со стандартными отклонениями (SD). Величины SD не превышали 10% от значений средних. Значимость различий между образцами оценена по t-критерию



**Рисунок 2. Сравнение конститутивных уровней активности генов TLR3 и TLR4 в клетках крови 3-х людей**

**Примечание.** Кривые накопления ПЦР-продуктов в реальном времени. По оси абсцисс – циклы (Cq) и пики Т-плавления специфических амплификатов. По оси ординат – нарастание флуоресцентного сигнала. 1 – донор мужчина 27 лет, носитель вируса Эпштейна–Барр; 2 – донор женщина 65 лет с онкологическим заболеванием; 3 – донор женщина 53 лет с сердечно-сосудистой патологией.

Стьюдента при  $p < 0,05$  в программе «Statistica 6.0».

## Результаты

Сравнили действие 3-х препаратов Генфаксон, Циклоферон и Иммуномакс на транскрипцию генов сигнальных путей иммунитета TLR3, TLR4, IRF3, B2M, RIG1 и IPS в клетках крови людей разного возраста (доноров) с различной патологией. Данные суммированы и представлены на рисунках 1-4 в виде кратности стимуляции экспрессии генов у доноров 1, 2 и 3 относительно контроля, принятого равным 1.

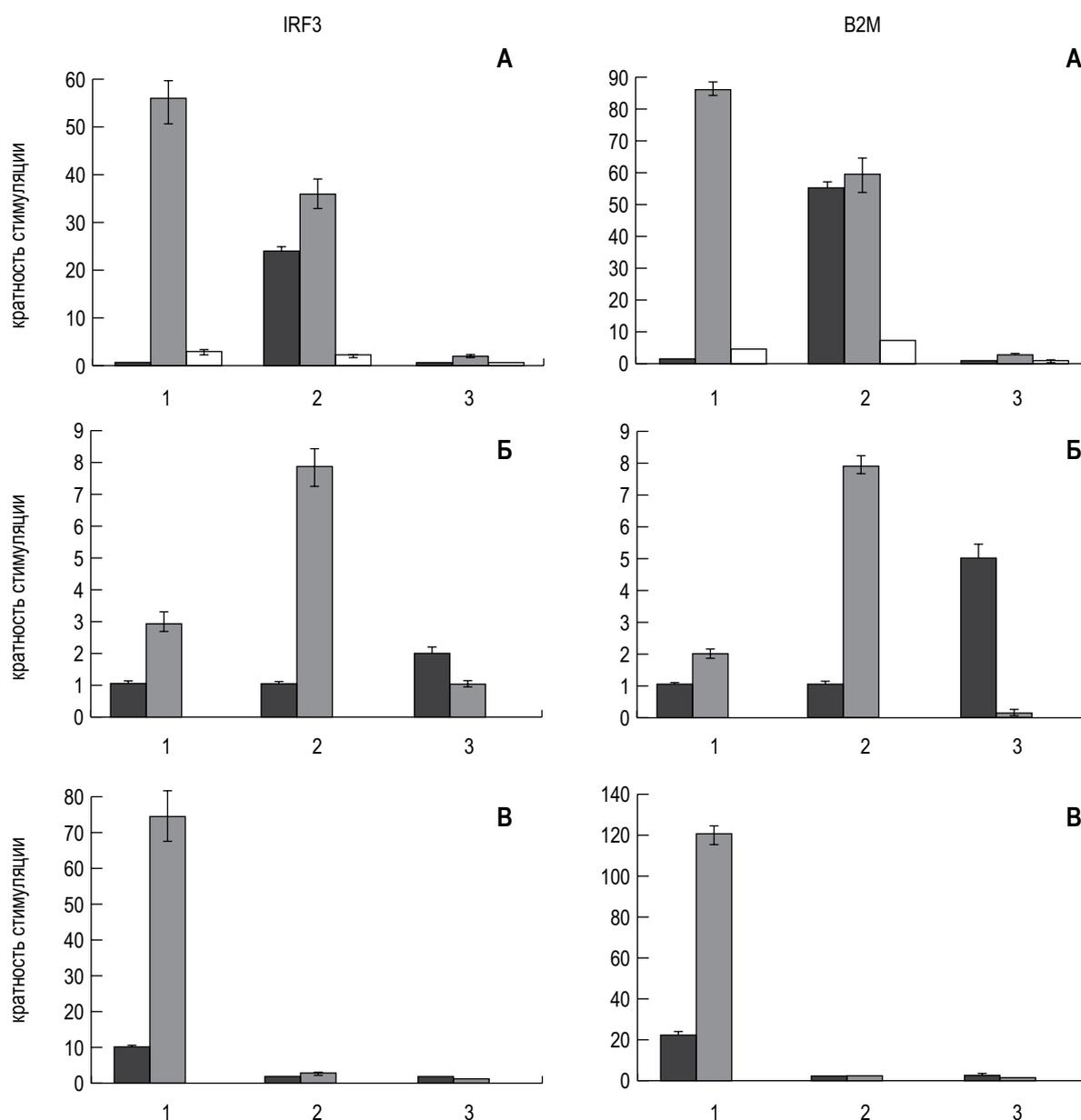
На рисунке 1 (А, Б, В) показано действие препаратов на экспрессию генов TLR3 и TLR4 в клетках крови 3-х доноров. Высокая доза Генфаксона ( $IFN\ 10^5$  МЕ/мл) ингибировала конститутивную активность TLR4 гена у мужчины (донор 1), но давала 100-кратный рост генной транскрипции у женщины с онкологическим заболеванием (донор 2). При этом у нее наблюдалась прямая дозовая зависимость стимулирующего эффекта Генфаксона на ген TLR3 (рис. 1А). Снижение концентрации Генфаксона до  $10^4$  МЕ/мл в клетках этих 2-х доноров оказывало на гены TLR3 и TLR4 сильно выраженное стимулирующее действие. Вместе с тем, в клетках крови донора 3 (женщина с сердечно-сосудистой патологией)

Генфаксон проявлял на эти гены слабый стимулирующий эффект.

Стимулирующие эффекты Циклоферона на гены рецепторов TLR3 и TLR4 были низкими и варьировали от 2 до 4 раз (рис. 1Б). Они выявлялись в клетках крови 3-х доноров избирательно в ответ на дозы 600 и 125 мкг/мл. При этом высокие концентрации Циклоферона ингибировали конститутивную экспрессию гена TLR4.

Действие Иммуномакса на гены рецепторов TLR3 и TLR4 было высокостимулирующим и избирательным в клетках крови только донора 1 (рис. 1В). Максимальный эффект наблюдался с низкой дозой препарата 0,5 ед/мл. Клетки крови доноров 2 и 3 либо не реагировали на Иммуномакс или уровни активации генов TLR3 и TLR4 были низкими.

Выявленные различия в действии препаратов на гены TLR3 и TLR4 у 3-х доноров могли быть обусловлены отличиями в исходных конститутивных уровнях генной активности. Пороговые циклы (Cq) логарифмической фазы амплификации генов TLR3 и TLR4 у 3-х доноров значительно варьировали (рис. 2А, Б). Наибольшие значения Cq генов TLR3 и TLR4 были у донора 1, донор 2 имел средние показатели Cq и наименьшие значения Cq наблюдались у донора 3. Это означает, что донор 1 имеет самые низкие уровни экспрессии генов TLR3 и TLR4,

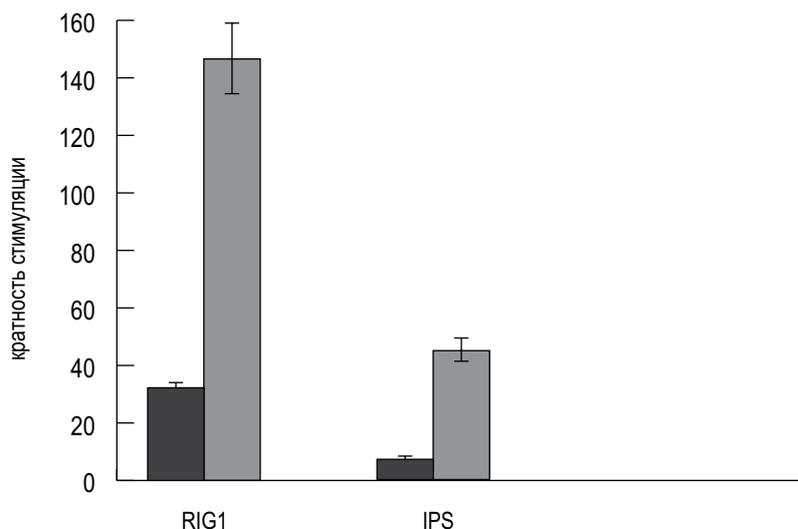


**Рисунок 3.** Экспрессия генов B2M и IRF3 в клетках крови человека, индуцированная препаратами Генфаксон (А), Циклоферон (Б) и Иммуномакс (В)

**Примечание.** Обозначения см. на рисунке 1.

а донор 3 — самые высокие. При этом, по данным плавления, у донора 1 отсутствовал специфический амплификат гена TLR3 и, следовательно, конститутивный синтез мРНК TLR3 был не выявляемым, а у донора 2, по данным плавления, содержал дополнительные неспецифические амплификаты (рис. 2А). Различия между донорами в конститутивных уровнях экспрессии для гена TLR4 составили  $2^{10}$  (рис. 2Б). Следует отметить, что ген TLR4, по сравнению с геном TLR3,

в клетках крови всех доноров имел более высокие конститутивные уровни экспрессии (средние значения TLR4 = Cq25 и TLR3 = Cq35). Можно сделать вывод, что донор 1, с более низкими уровнями экспрессии генов TLR3 и TLR4, отличается от доноров 2 и 3 более высокой индивидуальной чувствительностью к препаратам Генфаксон и Иммуномакс. Наоборот, донор 3, с более высокими конститутивными активностями этих генов, имеет низкую чувствительность к пре-



**Рисунок 4. Экспрессия генов RIG1 и IPS в клетках крови, стимулированная препаратом Иммуномакс**

**Примечание.** Донор 1 мужчины 27 лет, носитель вируса Эпштейна–Барр. По оси абсцисс название генов. Столбики черные – доза 5 ед/мл, столбики серые – доза 0,5 ед/мл. По оси ординат – кратность стимуляции транскрипции (дельта-Сq) относительно контроля, принятого равным 1.

паратам IFN и их индукторов. По-видимому, в клетках крови существуют эндогенные механизмы регуляции уровней транскрипционной активности генов – рецепторов врожденного иммунитета, которые пока остаются неизвестными.

Дальнейший ПЦР-анализ действия препаратов на экспрессию IFN-зависимых генов – фактора транскрипции IRF3 и B2M подтвердил описанные выше закономерности регуляции генов TLR3 и TLR4 в клетках крови 3-х доноров (рис. 3А, Б, В). По-прежнему гены донора 1 имели наибольшую чувствительность к препаратам Генфаксон и Иммуномакс и гены донора 3 – минимальную. Гены донора 2 проявляли промежуточную чувствительность к рекомбинантному бета1-IFN. Можно лишь предполагать, как наблюдаемые различия у 3-х случайных доноров связаны с имеющейся у них патологией (донор 1 носитель вируса Эпштейна–Барр; донор 2 с онкологическим заболеванием 1 стадии; донор 3 с нарушениями сердечно-сосудистой деятельности). Ответ на эти вопросы требует специальных исследований.

Мы провели дополнительное расширенное исследование влияния разных доз Циклоферона на клеточный метаболизм с помощью 2-х тестов: ОТ-ПЦР и МТТ (табл. 2). По данным 2-х видов анализов (экспрессия генов «домашнего хозяйства» и альфа-IFN) и цитотоксичности на опухолевых клетках Jurkat и SW620 были получены одинаковые значения действующих concentra-

ций. Отличия в дозах Циклоферона от контрольных значений наблюдались до концентрации 312 мкг/мл. Следовательно, доза 125 мкг/мл, использованная нами и активирующая IFN-зависимые гены IRF3 и B2M, не оказывает ингибирующего влияния на клеточный метаболизм. Важно отметить, что активирующее действие Циклоферона на гены IRF3 и B2M более значимое по сравнению с генами рецепторов TLR3 и TLR4 (рис.1Б и рис. 2Б). Однако, по уровням генной индукции уступает эффектам Генфаксона (рис. 1А). Поэтому Циклоферон обладает свойством индуцировать синтез IFN в клетках крови человека, но уступает по активности Генфаксону и Иммуномаксу.

Стимуляция Иммуномаксом генов IRF3 и B2M в клетках крови была на высоком уровне только у донора 1. Специальный интерес представляет выяснение роли RIG1/IPS сигнального пути в механизме действия этого препарата в связи данными об участии в нем мембранного TLR4 [15]. Результаты действия Иммуномакса на экспрессию этих сигнальных генов представлены на рисунке 4. Видна сильная стимуляция уровней транскрипционной активности генов RIG1 и IPS в клетках крови донора 1, высокочувствительного к препарату. С этим согласуются наши данные об Иммуномаксе как активаторе универсальных факторов транскрипции NF-κB и p53, а также генов IFN в клетках человека [14].

## Обсуждение

Исследованные препараты Генфаксон, Циклоферон и Иммуномакс обладают выраженными клиническими эффектами, которые во многом связаны с их иммуномодулирующими и IFN-индуцирующими свойствами. В нашей работе показана способность исследованных препаратов стимулировать экспрессию генов сигнальных рецепторов иммунитета в клетках крови человека, что повышает их чувствительность к патогенам разной природы и вызывает более сильный иммунный ответ в организме. Тем не менее, степень выраженности защитного эффекта препаратов у отдельных людей варьирует, и не всегда удается достичь ожидаемого позитивного результата. Как показано в данной работе, стимуляция препаратами экспрессии генов врожденного и адаптивного иммунитета в клетках крови разных доноров также отличается и не всегда наблюдается активный генный ответ. Возможно, различная чувствительность обусловлена значительными индивидуальными отличиями в конститутивных уровнях активности генов TLR3 и TLR4 в клетках крови 3-х доноров. Низкие конститутивные уровни экспрессии этих генов прямо коррелировали с их высокой чувствительностью к препаратам Генфаксон (бета1-IFN) и Иммуномакс (растительный пептидогликан). Подобная зависимость наблюдалась и для генов IRF3 и B2M. Стимуляция этих генов препаратами Генфаксон и Иммуномакс была выраженной. Препарат Циклоферон, в отличие от Генфаксона и Иммуномакса, вызывал слабую стимуляцию генов TLR3, TLR4, IRF3 и B2M в клетках крови 3-х доноров. До сих пор остается неизвестным, почему Циклоферон индуцирует IFN не во всех типах клеток. Показаны проникновение Циклоферона в человеческие лимфобластоидные клетки и их ядра, взаимодействие препарата с ДНК, индукция альфа-IFN и провоспалительных цитокинов [4]. Препарат оказывает прямое антивирусное действие на репродукцию аденовируса [32] и вирусов герпеса [7]. Можно предположить, что взаимодействие солей акриданона с нуклеиновыми кислотами меняет их структуру. В результате они узнаются цитоплазматическими ДНК- и РНК-сенсорами (хеликазами RIG1, DAI и др.) как чужеродные структуры. Включается сигнальный механизм индукции синтеза IFN типа I и провоспалительных цитокинов [8, 21, 24]. В зараженных вирусами клетках взаимодействие вирусных

РНК и ДНК с Циклофероном может нарушать репликативную активность вируса и процесс сборки полноценных вирионов. Недавно появилось сообщение о способности карбоксиметилакриданона (CMA), подобно c-diGMP (cyclic diguanosine monophosphate) образуемому бактериями, взаимодействовать с белком STING (стимулятор интерферонового гена) [17]. Включение CMA/STING сигнала синтеза IFN эффективно происходит в мышечных макрофагах с участием комплекса TBK1/IRF3, но такой механизм, по данным авторов, не работает в клетках человека. Наши исследования в клетках крови человека показали слабые сигнальные реакции на Циклоферон генов мембранного рецептора TLR4 и эндосомального рецептора TLR3. Вместе с тем, Циклоферон заметно сильнее стимулировал гены фактора транскрипции IRF3 и ко-рецептора B2M. Поэтому механизм индукции им IFN в клетках человека работает, но он, более вероятно, зависит от цитоплазматических ДНК- и РНК-сенсоров. Такой вывод согласуется с результатами масштабного определения IFN-индуцирующей активности Циклоферона у здоровых лиц [13] и нашими данными о стимуляции им генов бета1-IFN и альфа-IFN в клетках крови здорового донора [9].

Иммуномакс, наряду с генами мембранного TLR4 и эндосомального TLR3 рецепторов, в большей степени индуцирует ген цитоплазматического сенсора RIG1. По-видимому, для действия Иммуномакса имеют значения дополнительные цитоплазматические сигнальные пути индукции синтеза IFN с участием митохондриального белка IPS и фактора транскрипции IRF3. Наши данные дополняют имеющуюся информацию относительно участия TLR4 в сигнальном механизме действия Иммуномакса, полученную на клетках с делетированными генами [15]. Проведенные этими авторами исследования не затрагивали гены рецепторов TLR3 и RIG1.

Метод количественного ОТ-ПЦР тестирования экспрессии генов сигнальных реакций иммунитета позволяет быстро и с высокой специфичностью оценить индивидуальную чувствительность клеток к препаратам. Мы предлагаем более широко использовать этот молекулярный подход для оценки эффективности действия IFN-индуцирующих препаратов вместо затратных по времени и более трудоемких биологических методов титрования в культурах клеток.

## Список литературы / References

1. Атауллаханов Р.И., Пичугин А.В., Шишкова Н.М., Мастернак Т.Б., Малкина Е.Ю., Ульянова Л.И., Стеценко О. Н. Клеточные механизмы иммуномодулирующего действия препарата Иммуномакс // Иммунология, 2005. Т.26, № 2. С. 111-120. [Ataullakhanov R.I., Pichugin A.V., Shishkova N.M., Masternak T.B., Malkina E.Yu., Ulyanova L.I., Stetsenko O.N. Cell mechanisms of the immunomodulating action produced by drug «Immunomax». *Immunologiya = Immunology*, 2005, Vol. 26, no. 2, pp. 111-120. (In Russ.)]
2. Ершов Ф.И. Антивирусные препараты. Справочник (2-е изд.). М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006, 312 с. [Ershov F.I. Antiviral preparations]. Moscow: GEOTAR-Media, 2006, 312 p.
3. Деева Е.Г., Павловская Я.В., Киселев О.И., Киселев В.И., Пиотровский Л.Б., Ершов Ф.И. Структурный и функциональный анализ биологически активных производных акридина // Вестник Российской Академии наук, 2004. № 2. С. 29-34. [Deeva E.G., Pavlovskaya Ya.V., Kiselev O.I., Kiselev V.I., Piotrovskii L.B., Ershov F.I. The structural and functional analysis of the biological activity of acridine derivatives. *Vestnik Rossiyskoy Akademii nauk = Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2004, no. 2, pp. 29-34. (In Russ.)]
4. Коваленко А.Л., Казаков В.И., Слита А.В., Зарубаев В.В., Сухинин В.П. Исследование внутриклеточной локализации циклоферона, связывание его с ДНК и стимуляции экспрессии цитокинов в клетках при воздействии циклоферона // Цитология, 2000. Т. 42, № 7. С.659-664. [Kovalenko A. L., Kazakov V.I., Slita A.V., Zarubaev V.V., Sukhinin V.P. Intracellular localization of cycloferon, its binding with DNA and stimulation of cytokines expression after exposure to cycloferon. *Tsitologiya = Cytology*, 2000, Vol. 42, no. 7, pp. 659-664. (In Russ.)]
5. Лацерус Л.А., Пинигина И.М., Барышников А.Ю., Огородникова М.В. Цитотоксические и апоптоз-индуцирующие активности препарата Абисилин в отношении опухолевых клеток // Российский биотерапевтический журнал, 2010. № 1. С. 9-12. [Latserez L.A., Pinigina N.M., Baryshnikov A.Yu., Ogorodnikova M.V. The cytotoxic apoptosis-inducing activity of Ambisilin. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapeutic*, 2010, no. 1, pp. 9-12. (In Russ.)]
6. Новиков А.Г., Логунова З.В., Потеева Н.Н. Опыт применения иммуномодулятора «Иммуномакс» // Российский медицинский журнал, 2004, Т. 12, № 13. С. 819-820. [Novikov A.G., Logunova Z.V., Potekaev N.N. Experience of using immunomodulator «Immunomax». *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal*, 2004, Vol. 12, no. 13, pp. 819-820. (In Russ.)]
7. Романцов М.Г., Ершов Ф.И., Коваленко А.Л. Циклоферон в лечении инфекционных заболеваний // Антибиотики и химиотерапия, 2008. Т. 53, № 3-4. С. 36-45. [Romantsov M.G., Ershov F.I., Kovalenko A.L. Cycloferon in the treatment of infectious diseases. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotic and Chemotherapy*, 2008, Vol. 53, no. 3-4, pp. 36-45. (In Russ.)]
8. Соколова Т.М. Иммунное узнавание вирусных нуклеиновых кислот приводит к индукции интерферонов и воспалительных цитокинов. Сборник научных трудов «Интерферон-2011» / Под ред. Ершова Ф.И. М.: НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, 2012. С. 52-62. [Sokolova T. M. Immune recognition viral nucleic acids result in interferon and inflammatory cytokines induction. "Interferon-2011". Moscow: NF Gamaleya Institute of Microbiology, Epidemiology and Immunology, 2012, pp. 52-62.]
9. Соколова Т.М., Урываев Л.В., Тазулахова Э.Б., Ершов Ф.И., Малышкова И.К., Дидковский Н.А. Индивидуальные изменения экспрессии генов системы интерферона в клетках крови человека под влиянием амиксина и циклоферона // Вопросы вирусологии, 2005. № 2. С.32-36. [Sokolova T.M., Uryvaev L.V., Tazulakhova E.B., Ershov F.I., Malysheva I.K., Didkovsky N.A. Individual changes of gene expression in the interferon system in human blood cells due to amixin and cycloferon. *Voprosy Virusologii = Problems of Virology*, 2005, no. 2, pp. 32-36. (In Russ.)]
10. Соколова Т.М., Федорова Н.Е., Меджидова М.Г., Терехов С.М., Урываев Л.В., Куц А.А. Механизмы клеточной резистентности к цитомегаловирусу связаны с пролиферативным состоянием клеток и транскрипционной активностью генов лейкоцитарного и иммунного интерферона // Медицинская иммунология, 2007. Т. 9, № 4-5. С.457-466. [Sokolova T.M., Fedorova N.E., Medjidova M.G., Terekhov S.M., Uryvaev L.V., Kushch A.A. Mechanisms of cell resistance to cytomegalovirus are connected with cell proliferation state and transcription activity of leukocyte and immune interferon genes. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2007, Vol. 9, no. 4-5, pp. 457-466. (In Russ.)]
11. Соколова Т.М., Оспельникова Т.П., Колодяжная Л.В., Шувалов А.Н., Чкадуа Г.З., Ершов Ф.И. Эффекты индукторов интерферона на экспрессию генов – регуляторов апоптоза в лимфоцитах человека //

Цитокины и воспаление, 2011. Т.10, № 2. С. 75-81. [Sokolova T.M., Ospelnikova T.P., Kolodyazhnaya L.V., Shuvalov A.N., Chkadua G.Z. Effects of interferon inducers on the expression of apoptosis regulatory genes in human lymphocytes. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2011, Vol. 10, no. 2, pp. 75-81. (In Russ.)]

12. Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Телков М.В., Колодяжная Л.В., Ершов Ф.И. Препарат «Ридостин» индуцирует транскрипцию широкого спектра генов системы интерферона в клетках человека // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2013. Т. 156, № 8. С. 179-182. [Sokolova T.M., Shuvalov A.N., Telkov M.V., Kolodyazhnaya L.V., Ershov F.I. Preparation "Ridostin" induces transcription wide genes spectrum of interferon system in human cells. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2013, Vol. 156, no. 8, pp. 179-182. (In Russ.)]

13. Суханов Д.С., Романцов М.Г., Смагина Ф.И., Коваленко А.Л., Локтева О.М. Доза зависимая интерферон индуцирующая активность и фармакинетика циклоферона у здоровых лиц // Экспериментальная и клиническая фармакология, 2012. № 75. С.23-26. [Sukhanov D.S., Romantsov M.G., Smagina A.N., Kovalenko A.L. Lokteva O.M. Dose-dependent interferon induction activity and pharmacokinetics of cycloferon in healthy humans. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya = Experimental and Clinical Pharmacology*, 2012, Vol. 75, no. 1, pp. 23-26. (In Russ.)]

14. Шувалов А.Н., Соколова Т.М., Шаповал И.М., Ершов Ф.И. Модуляция клеточных генов препаратом Иммуномакс: активация генов интерферонов и интерлейкинов // Иммунология, 2014. № 1. С. 17-21. [Shuvalov A.N., Sokolova T.M., Shapoval I.M., Ershov F.I. Modulation of cellular gene transcription by drug "Immunomax": activation of Interferon and Interleukine genes. *Immunologiya = Immunology*, 2014, no. 1, pp. 17-21. (In Russ.)]

15. Ghochikyan A., Pichugin A., Bagaev A. Targeting TLR-4 with a novel pharmaceutical grade plant derived agonist Immunomax, as a therapeutic strategy for a metastatic breast cancer. *J. Transl. Med.* 2014, Vol. 12, no. 1, pp. 322-333.

16. Black K.E., Collins S.L., Hagan R.S., Hambin M.J., Chan-Li Y., Hallowell R.W., Powell J.D., Horton M.R.. Hyaluronan fragments induce IFN $\beta$  via a novel TLR4-TRIF-TBK1-IRF3-dependent pathway. *Journal of Inflammation*, 2013, Vol. 10, pp. 23-32.

17. Calvar T., Deimling T., Ablasser A., Hopfner K-P, Hornung V. Species-specific detection of the antiviral small-molecule compound CMA by STING. *The EMBO J.*, 2013, Vol. 32, pp.1440-1450.

18. Cholewiriski G., Dzierzbicka K., Kotodziejczyk A.M. Natural and synthetic acridines /acridones as antitumor agents: their biological activities and methods of synthesis. *Parmacological Reports*, 2011, Vol. 63, pp. 305-336.

19. Denkow K., Baur J.M.J., Herker M., Paap B.K., Thamilarassan M., Koszan D., Shott E., Deuschle K., Bellman-Strobl J., Paul F., Zettl U.K., Ruprecht K., Lehnard S. Multiple Sclerosis: Modulation of Toll-Like receptors (TLR) expression by interferon  $\beta$  includes upregulation of TLR7 in plasmacytoid dendritic cells. *Plos one*, 2013, Vol. 8, issue 8, e70626, pp. 1-11.

20. George P.M., Badiger R., Alazawi W., Foster G.R., Mitchell J.A. Pharmacology and therapeutic potential of interferons. *Parmacology and Therapeutics*, 2012, Vol. 135, pp. 44-53.

21. Gonzalez-Navajas J.M., Lee J., Daid M., Raz E. Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nat. Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 12, no. 2, pp. 125-135.

22. Iwasaki A., Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*, 2010, Vol. 327, pp. 291-295.

23. Lester S.N., Li K. Toll-like receptors in antiviral innate immunity. *J.Mol.Biol.*, [http:// dx.dos.org/10.1016.jmb.2013.11.024](http://dx.dos.org/10.1016/jmb.2013.11.024).

24. Levy D.E., Marie I., Durbin J.E. Induction and Function of Type I and III Interferon in response to viral infection. *Curr Opin Virol.*, 2011, Vol. 1, no. 6, pp. 476-486.

25. Miettinen M., Sareneva T., Julkunen I., Matikainen S. IFNs activate toll-like receptor gene expression in viral infections. *Genes and Immunity*, 2001, Vol. 2, pp. 349-355.

26. Paul-Clark M.J., George P.M., Cateral T., Parzych K., Wright W.R., Crawford D., Bailey L.K., Reed D.M., Mitchell J.A. Pharmacology and therapeutic potential of pattern recognition receptors. *Pharmacology and Therapeutics*, 2012, Vol. 135, pp. 200-215.

27. Plataniias L.C. Mechanisms of type I- and type-II- interferon-mediated signaling. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005, Vol. 5, pp. 375-386.
28. Sadler A.J., Williams B.R. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, Vol. 8, pp. 559-568.
29. Siren J., Pirhonen J., Julkunen I., Matikainen S. IFN- $\alpha$  regulates TLR-dependent gene expression of IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL28 and IL29. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 174, pp. 1932-1937.
30. Vispe S., Vandenberghe I., Rubin M. Novel tetra-acridine derivatives as dual inhibitors of topoisomerase II and the human proteasome. *Biochem. Pharmacol.*, 2007, Vol. 73, no. 12, pp.1863-1872.
31. Wang W.G., Ho W.C., Dicker D.T., Mackinnon C., Winkler J.D., Marmorstein R., El-Deiry W.C. Acridine derivatives activate p53 and induce tumor cell death through Bax. *Cancer Biol. Ther.*, 2005, Vol. 4, pp. 893-898.
32. Zarubaev V.V., Slita A.V., Krivitskaya V.Z., Sirotkin A.K., Kovalenko A.L., Chatterjee N.K. Direct antiviral effects of cycloferon (10-carboxymethyl-0-acridanone) against adenovirus type 6 in vitro. *Antiviral Res.*, 2003, Vol. 58, no. 2, pp. 131-137.

---

**Авторы:**

**Соколова Т.М.** — д.б.н., ведущий научный сотрудник; лаборатория интерфероногенеза, ФГБУ «ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ, Москва, Россия

**Шувалов А.Н.** — аспирант, младший научный сотрудник, лаборатория интерфероногенеза, ФГБУ «ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ, Москва, Россия

**Шаповал И.М.** — к.б.н., старший научный сотрудник, лаборатория интерфероногенеза, ФГБУ «ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ, Москва, Россия

**Соколова З.А.** — к.м.н., старший научный сотрудник, ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва, Россия

**Ершов Ф.И.** — д.м.н., профессор, академик РАН, руководитель отдела интерферонов и лаборатории интерфероногенеза, ФГБУ «ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ, Москва, Россия

**Authors:**

**Sokolova T.M.**, PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Interferonogenesis, FSBI "N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology", Russian Ministry of Health Care, Moscow, Russian Federation

**Shuvalov A.N.**, PhD Fellow, Junior Research Associate, Laboratory of Interferonogenesis, FSBI "N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology", Russian Ministry of Health Care, Moscow, Russian Federation

**Shapoval I.M.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Interferonogenesis, FSBI "N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology", Russian Ministry of Health Care, Moscow, Russian Federation

**Sokolova Z.A.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, FSBSI "N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center", Moscow, Russian Federation

**Ershov F.I.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member of Russian Academy of Sciences, Chief, Department of Interferons and Laboratory of Interferonogenesis, FSBI "N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology", Russian Ministry of Health Care, Moscow, Russian Federation

---

Поступила 11.03.2014  
Принята к печати 29.03.2014

Received 11.03.2014  
Accepted 29.03.2014