

СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ДРОЖЖЕВОЙ ДВУСПИРАЛЬНОЙ РНК НА АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ БЕЛКОВ СИСТЕМЫ ИНТЕРФЕРОНА

Батенева А.В., Гамалей С.Г., **Лебедев Л.Р.**, Даниленко Е.Д.

Институт медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Бердск, Новосибирская область, Россия

Резюме. В культуре клеток мышинных гистиоцитов J774 и *in vivo* на мышах линии Balb/c исследовано влияние двуспиральной РНК (дсРНК) из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на уровень экспрессии макрофагами генов, кодирующих рецептор TLR3, интерфероны альфа и бета (IFN α , IFN β), ферменты 2',5'-олигоденилатсинтетазу (OAS) и протеинкиназу R (PKR). Продемонстрировано избирательное активирующее действие дсРНК в отношении генов рецептора TLR3 и противовирусных белков IFN α , IFN β и OAS как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*. В культуре клеток J774 наиболее высокая кратность индукции наблюдалась в отношении гена IFN β – в 365-802 раза. Эффект стимуляции возрастал в зависимости от дозы дсРНК в диапазоне от 16,9 до 125 мкг/мл. Препарат в меньшей степени усиливал активность генов IFN α (более чем в 10 раз), TLR3 и OAS (в 3-4 раза), при этом уровень экспрессии данных генов существенно не зависел от дозы препарата. В перитонеальных макрофагах мышей стимулирующее влияние дсРНК носило дозозависимый характер. Максимальный активирующий эффект препарата был обнаружен при введении эффективной противовирусной дозы (0,5 мг/кг по дсРНК). Через 5 ч после внутрибрюшинного введения дсРНК наиболее высокий уровень синтеза мРНК был отмечен в отношении генов IFN α (в 54 раза), OAS (в 43 раза) и TLR3 (в 28 раз). Экспрессия гена IFN β возрастала в меньшей степени (в 9 раз). Увеличение дозы препарата до 1,5 мг/кг приводило к снижению эффекта стимуляции. Уровень экспрессии генов IFN α , TLR3 и OAS в этом случае снижался в 2-4 раза по сравнению с меньшей дозой, а экспрессия гена PKR – в 5 раз относительно контроля. Через сутки после введения дсРНК наблюдалась тенденция к снижению транскрипции генов макрофагов по сравнению с первым сроком в обеих опытных группах. Ослабление генной активности у животных, получавших препарат в дозе 1,5 мг/кг, было выражено в меньшей степени. Более высокими в этот период оставались показатели транскрипции генов IFN β , OAS и TLR3 (в 5-10 раз выше контрольных значений). Динамика транскрипции гена PKR значительно отличалась от экспрессии других генов в обеих экспериментальных системах. Препарат дсРНК в использованных дозах не оказывал выраженного стимулирующего влияния на экспрессию данного гена. Умеренное по величине повышение активности гена PKR в макрофагах мышей было отмечено лишь через сутки после вну-

Адрес для переписки:

Батенева Алена Владимировна
Институт медицинской биотехнологии ФБУН
«Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии „Вектор“»
633010, Россия, Новосибирская обл., г. Бердск,
ул. Химзаводская, 9.
Тел.: 8 (383) 363-80-24 (доп. 53-35).
Факс: 8 (383) 363-80-16.
E-mail: bateneva_av@vector.nsc.ru

Address for correspondence:

Bateneva Alena V.
State Research Center for Virology and Biotechnology “Vector”
633010, Russian Federation, Novosibirsk Region, Berdsk,
Khimzavodskaya str., 9.
Phone: 7 (383) 363-80-24 (add. 53-35).
Fax: 7 (383) 363-80-16.
E-mail: bateneva_av@vector.nsc.ru

Образец цитирования:

А.В. Батенева, С.Г. Гамалей, **Л.Р. Лебедев**,
Е.Д. Даниленко «Стимулирующее влияние дрожжевой
двуспиральной РНК на активность генов белков
системы интерферона» // Медицинская иммунология,
2020. Т. 22, № 6. С. 1155-1162.
doi: 10.15789/1563-0625-SEO-2082
© Батенева А.В. и соавт., 2020

For citation:

A.V. Bateneva, S.G. Gamaley, **R.L. Lebedev**,
E.D. Danilenko “Stimulating effect of double-stranded yeast
RNA on the activity of interferon system genes”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020,
Vol. 22, no. 6, pp. 1155-1162.
doi: 10.15789/1563-0625-SEO-2082
DOI: 10.15789/1563-0625-SEO-2082

трибрюшинного введения препарата. Как известно, критическими факторами активации гена PKR являются концентрация и длина молекул дсРНК. Способность к повышению экспрессии гена проявляется при низких концентрациях дсРНК (10^{-7} г/мл и ниже), при этом высокополимерные дсРНК ослабляют генную активность. Поскольку в проведенных нами экспериментах дозы и концентрации препарата дсРНК значительно отличались от вышеуказанных, в совокупности это могло повлиять на регуляцию транскрипции гена PKR в сторону ослабления стимулирующего эффекта.

Ключевые слова: дсРНК, TLR3, противовирусные белки, экспрессия генов, макрофаги, клетки J774, мыши

STIMULATING EFFECT OF DOUBLE-STRANDED YEAST RNA ON THE ACTIVITY OF INTERFERON SYSTEM GENES

Bateneva A.V., Gamaley S.G., **Lebedev R.L.**, Danilenko E.D.

State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector", Berdsk, Novosibirsk Region, Russian Federation

Abstract. Influence of double-stranded RNA (dsRNA) from *Saccharomyces cerevisiae* yeast upon expression levels of the macrophage genes encoding TLR3 receptor, interferons alpha and beta (IFN α , IFN β), 2',5'-oligoadenylate synthetase (OAS) and protein kinase R (PKR) enzymes has been studied in the J774 mouse histiocytic cell culture and *in vivo* in Balb/c mice. It has been shown that dsRNA exerts a selective activating effect on genes of TLR3 receptor, antiviral proteins IFN α , IFN β , and OAS, both *in vitro* and *in vivo*. With J774 cell culture, the highest induction capacity was observed for the IFN β gene: 365 to 802-fold. The stimulatory effect was dependent on the dose of dsRNA in the range of 16.9 to 125 μ g/ml. The preparation enhanced IFN α gene activity to lesser degree (more than 10-fold), TLR3 and OAS (3 to 4-fold), while the expression levels for these genes were not significantly dependent on the dose of dsRNA. The stimulating effect of dsRNA was dose-dependent in murine peritoneal macrophages. The maximum activating effect of the preparation was shown upon administration of the effective antiviral dose (0.5 mg of dsRNA/kg). Five hours after intraperitoneal injection of dsRNA, the highest level of mRNA synthesis was observed for IFN α (54-fold), OAS (43-fold) and TLR3 (28-fold) genes. Expression of the IFN β gene increased to a lesser degree (9-fold). An increase in the dose of preparation to 1.5 mg/kg led to decrease of the stimulatory effect. Expression levels of the IFN α , TLR3, and OAS genes in that case decreased by 2–4-fold as compared to a lower dose, and the PKR gene expression was 5-fold lower compared to the control. One day after dsRNA administration, a tendency was observed for both experimental groups towards a decreased transcription of macrophage genes, if compared with the 5-hour term. The weakening of gene activity was less pronounced in animals treated with dsRNA at the dose of 1.5 mg/kg. The transcription indices for IFN β , OAS, and TLR3 genes were much higher during this period (5–10-fold higher than the control values). The dynamics of PKR gene transcription in both experimental systems was significantly different from the expression of other studied genes. The dsRNA preparation at this dose range did not have a pronounced stimulatory effect upon expression of this gene. A moderate increase in PKR gene activity in macrophages of mice was observed only a day following intraperitoneal administration of dsRNA. Concentrations and length of dsRNA molecules are known to be critical factors to the PKR gene activation. An ability to increase the expression of the gene is shown at low dsRNA concentrations (10^{-7} g/ml and below), while highly polymeric dsRNAs weaken the gene activity. Since the doses and concentrations of dsRNA used in our experiments were significantly different from those mentioned above, it could, in general, affect regulation of PKR gene transcription towards reduction of the stimulatory effect.

Keywords: dsRNA, TLR3, antiviral proteins, gene expression, macrophages, J774 cells, mice

Введение

Вирусные инфекции до сих пор остаются актуальной проблемой здравоохранения во всем мире. Общеизвестно, что центральным звеном

врожденной системы иммунитета, обеспечивающим раннюю противовирусную защитную реакцию организма, является система интерферона (IFN). Инфицированные клетки в первые часы после заражения вырабатывают и выделяют во

внеклеточное пространство IFN, индуцируя тем самым синтез широкого спектра цитокинов и ряда других противовирусных белков [9, 15].

Двуспиральные РНК (дсРНК) давно известны как регуляторы врожденного иммунитета и индукторы интерферона [11, 15]. Основным источником чужеродной дсРНК в клетках являются вирусы, при этом двуспиральные формы РНК в естественных условиях представляют собой либо собственно геном вируса, либо возникают в ходе вирусного репродуктивного цикла [9].

Есть сведения о нескольких семействах дсРНК-распознающих рецепторов клетки, среди которых одним из наиболее значимых является семейство Толл-подобных рецепторов (Toll-like receptor, TLR). TLRs представляют собой трансмембранные сигнальные рецепторы, связывающие путем лиганд-рецепторного взаимодействия консервативные участки молекул различных микроорганизмов – вирусов, бактерий, грибов, простейших. Основную роль в узнавании вирусных дсРНК и последующей передаче сигнала играет рецептор TLR 3 типа [13]. Ген TLR3 обнаружен во многих тканях организма человека и животных – легких, печени, сердце, плаценте, лимфатических узлах, селезенке, мозге. Рецептор экспрессируется преимущественно клетками иммунной системы – дендритными клетками, макрофагами, натуральными киллерами и Т-лимфоцитами, встречается также на соматических клетках (эпителиоциты, фибробласты, астроциты, гепатоциты, эндотелиальные клетки) [8, 12, 13]. В большинстве типов клеток TLR3 расположен внутриклеточных компартментов – на мембранах эндоплазматического ретикулума, эндосом и лизосом, хотя некоторые клетки, такие, например, как эпителиоциты и фибробласты, экспрессируют его и на внешней плазматической мембране [10, 12, 13].

В результате связывания с дсРНК рецептор димеризуется и переходит в активное состояние, что приводит к запуску внутриклеточных сигнальных путей и активации генов IFN 1-го типа, а также ряда провоспалительных цитокинов [2, 10]. Продуктируемый клетками IFN, в свою очередь, многократно усиливает транскрипцию генов IFN-зависимых ферментов, непосредственно реализующих противовирусный ответ. Ключевыми ферментами этих реакций являются 2',5'-олигоденилатсинтетаза (OAS), РНКазы L (RNase L) и протеинкиназа R (PKR), активность которых зависит от присутствия в клетке дсРНК. Активированная дсРНК OAS катализирует образование коротких олигоденилатов, которые при взаимодействии с RNase L переводят ее в активную форму. RNase L разрушает геномную

вирусную РНК, а также мРНК на отдельные фрагменты, препятствуя образованию вирусных и клеточных белков. PKR ингибирует трансляцию мРНК на рибосомах, что также приводит к торможению белкового синтеза. Следствием этих биохимических реакций является подавление репликации вирусов в клетках [11].

В настоящее время известно, что первичный каскад ответных реакций организма на вирусное заражение и введение экзогенной дсРНК (узнавание, инициация внутриклеточных сигнальных путей) имеют много общего, поэтому интерес к двуспиральным полирибонуклеотидам как субстанциям противовирусных лекарственных средств не ослабевает уже многие годы [2].

Природная дсРНК, выделенная из киллерного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, – один из активных компонентов отечественного препарата Ридостин. Ридостин является индуктором интерферона, обладает противовирусными и иммуномодулирующими свойствами, рекомендован для профилактики и лечения инфекционно-воспалительных заболеваний, вызванных вирусами герпеса, гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций, хламидиозов. Экспериментально доказано, что, помимо усиления продукции IFN, дрожжевая дсРНК повышает активность и других факторов неспецифической резистентности, в частности метаболическую активность перитонеальных макрофагов [1, 7], которые экспрессируют широкий набор рецепторов, являются активными продуцентами и мишенями IFN разных типов и представляют интересный объект для изучения особенностей развития внутриклеточной противовирусной реакции.

Целью данного исследования являлось изучение влияния дсРНК, выделенной из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, на транскрипцию генов противовирусных белков – рецептора TLR3, IFN α и IFN β , ферментов OAS и PKR – в макрофагах мышей в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы

В экспериментах использовали натриевую соль дсРНК (смесь дсРНК длиной 1600–4500 п.н.) с чистотой 93%, полученную из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* по методу [3].

В исследованиях *in vitro* была использована культура мышинных макрофагов линии J774 (гистиоцитарная саркома мышцы линии Balb/c), полученная из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург). Клетки данной линии имеют высокий уровень представленности генов семейства TLR, поэтому являются адекватной

моделью для изучения механизмов реализации ответа на различные патоген-ассоциированные лиганды, в том числе дсРНК [7]. Клетки культивировали в 6-луночных планшетах (10^6 клеток на лунку) в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки в атмосфере с 5% CO_2 при температуре 37 °С и 60% влажности в течение 21 часа для формирования монослоя. Затем в лунки вносили раствор дсРНК до конечной концентрации 125; 67,5; 33,8 и 16,9 мкг/мл и инкубировали в течение 4 часов при тех же условиях. Каждое разведение исследовали в 2 повторях. В контрольные лунки вносили физиологический раствор.

Исследование *in vivo* проведено на 18 половозрелых самцах мышей линии Balb/c массой 20-22 г, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово Новосибирской области). До начала и в ходе эксперимента мыши содержались в стандартных условиях вивария при естественном освещении на сбалансированном пищевом рационе со свободным доступом к корму и воде. Условия содержания и ухода за животными соответствовали ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами». Манипуляции с животными проводили с соблюдением принципов гуманного отношения к животным согласно Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях. Препарат вводили однократно внутривенно в дозах 0,5 и 1,5 мг/кг, что соответствует эффективной дозе препарата Ридостин, определенной ранее в противовирусных исследованиях, и дозе, превышающей ее в три раза (в пересчете на дсРНК). Животным контрольной группы вводили физиологический раствор. Через 5 и 24 ч после введения препарата у животных всех экспериментальных групп забирали перитонеальный экссудат. Для получения монослоя макрофагов клетки культивировали в 6-луночных планшетах в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 40 мкг/мл гентамицина, при 37 °С, 5% CO_2 и 60% влажности в течение 2 ч.

По окончании времени инкубации в обоих экспериментах подсчитывали количество клеток в каждой лунке и выделяли суммарную РНК с помощью набора «RNeasy Mini Kit» (Qiagen). Для удаления геномной ДНК использовали набор «RNase-Free DNase Set» (Qiagen). Содержание РНК и чистоту полученных образцов определяли спектрофотометрически при длине волны 260/280 нм. Пробы выделенной РНК, нормиро-

ванные по стартовому количеству, использовали для построения кДНК путем реакции обратной транскрипции с помощью реагентов «SuperScript III» (Invitrogen). Количественную полимеразную цепную реакцию в реальном времени (ПЦР-РВ) выполняли с использованием коктейля «SYBR GreenER qPCR Super Mix» (Invitrogen) на приборе «iCycler iQ5» (Bio-Rad). Каждый образец в реакции был представлен в трех повторях. Последовательность специфических праймеров исследуемых генов была выбрана из электронной базы праймеров PrimerBank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html>); индивидуальные номера пар праймеров: 146149239c2 (TLR3), 6754294a1 (IFN α), 6754303c3 (IFN β), 281332107b1 (OAS), 6755162a1 (PKR). Синтез праймеров был выполнен ЗАО «Синтол» (г. Москва). Оптимизированные протоколы ПЦР-РВ: 50 °С – 2 мин, 95 °С – 8,5 мин, далее 30-35 циклов при 95 °С – 15 с и 60 °С – 60 с (гены TLR3, PKR и OAS); 50 °С – 2 мин, 95 °С – 8,5 мин, далее 35 циклов 95 °С – 15 с и 57 °С – 60 с (ген IFN β); 50 °С – 2 мин, 95 °С – 8,5 мин, далее 40 циклов 95 °С – 15 с и 62 °С – 60 с (ген IFN α). Специфичность полученных ДНК-продуктов устанавливали в конечной точке ПЦР по температурным пикам плавления. Дополнительно ДНК-амплификаты анализировали электрофорезом в 1,5%-ном агарозном геле с окрашиванием этидиум бромидом для сопоставления с расчетными данными, представленными в PrimerBank.

Уровень экспрессии генов оценивали путем автоматического расчета относительного количества ДНК-амплификатов (ΔCt) с помощью программного обеспечения Bio-Rad iQ5 Optical System software v. 2.0. Вычисление кратности экспрессии проводили относительно контрольной группы, значение которой было принято за 1. Экспериментальные данные представлены в виде средних значений относительного количества ДНК-продуктов и стандартных отклонений ($M \pm SD$).

Результаты и обсуждение

Результаты исследования, проведенного в культуре клеток J774, показали, что 4-часовая экспозиция с препаратом дсРНК приводила к повышению транскрипционной активности генов TLR3, IFN α , IFN β и OAS (табл. 1).

Наиболее выраженным влияние препарата было в отношении экспрессии гена IFN β , которая возрастала в 365-802 раза в зависимости от дозы дсРНК. В значительной степени препарат дсРНК индуцировал и транскрипцию гена IFN α (более чем в 10 раз). Наименьший стимулиро-

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРОТИВОВИРУСНЫХ БЕЛКОВ В КЛЕТКАХ ЛИНИИ J774 ПОСЛЕ 4 ЧАСОВ ИНКУБАЦИИ С ПРЕПАРАТОМ дсРНК

TABLE 1. LEVEL OF GENE EXPRESSION OF ANTIVIRAL PROTEINS IN J774 CELLS AFTER A 4-HOUR-INCUBATION WITH dsRNA

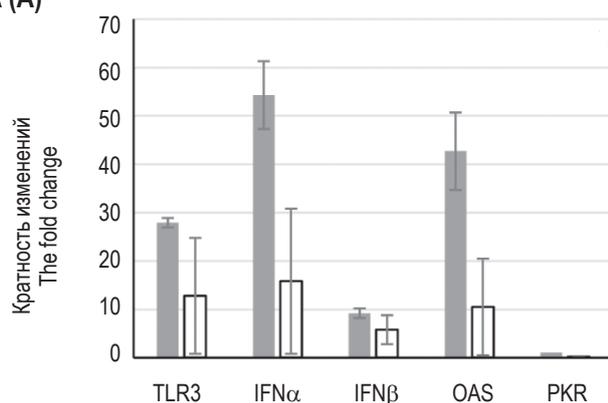
Препарат, доза Preparation, dose	Уровень относительной экспрессии генов белков (M±SD) Level of relative gene expression of proteins (M±SD)				
	TLR3	IFNβ	IFNα	OAS	PKR
Физиологический раствор Physiological saline	1,0±0,1	1,0±0,2	1,0±0,9	1,0±0,2	1,0±0,2
дсРНК, 16,9 мкг/мл dsRNA, 16.9 µg/ml	3,2±0,5	365±49	11,2±2,0	2,8±0,6	0,6±0,1
дсРНК, 33,8 мкг/мл dsRNA, 33.8 µg/ml	3,7±0,4	422±58	10,2±4,2	3,5±1,5	0,7±0,2
дсРНК, 67,5 мкг/мл dsRNA, 67.5 µg/ml	3,4±0,7	613±117	8,7±1,8	2,7±0,9	0,6±0,1
дсРНК, 125 мкг/мл dsRNA, 125 µg/ml	4,2±1,4	802±60	12,1±3,1	3,2±0,9	0,8±0,1

ющий эффект был отмечен в отношении генов TLR3 и OAS (3-4 раза). Влияния дсРНК на количество мРНК фермента PKR в этих условиях не наблюдалось. Следует отметить, что экспрессия генов IFNα, TLR3 и OAS не зависела существенно от дозы препарата. Это позволяет предположить, что данный уровень генной активности является максимально возможным ответом клеток на воздействие дсРНК.

Сравнительная оценка экспрессии генов перитонеальных макрофагов мышей после внутрибрюшинной инъекции дсРНК показала усиление транскрипционной активности тех же генов, что и в клетках J774 (рис. 1.).

Наблюдаемые изменения носили избирательный характер. Наиболее выраженное увеличение генной активности было отмечено через 5 часов после введения препарата в дозе 0,5 мг/кг

А (А)



Б (Б)

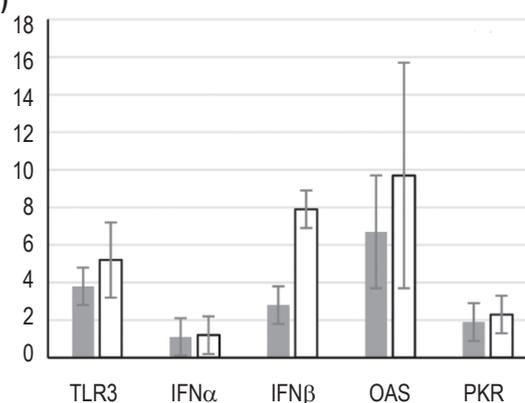


Рисунок 1. Влияние внутрибрюшинной инъекции препарата дсРНК на активность генов противовирусных белков в перитонеальных макрофагах мышей через 5 ч (А) и 24 ч (Б) после введения

Примечание. По оси ординат – величина кратности изменений активности генов (ΔCt) относительно контрольного уровня для каждого гена, принятого за 1. Серые столбцы – дсРНК 0,5 мг/кг; белые столбцы – дсРНК 1,5 мг/кг.

Figure 1. Effect of intraperitoneal injection of a dsRNA preparation on the activity of genes of antiviral proteins in peritoneal macrophages of mice 5 h (A) and 24 h (B) after injection

Note. The ordinate axis presents the values of the fold change in gene activity (delta Ct) relative to the control level for each gene taken as 1. The gray bars – dsRNA of 0.5 mg / kg; the white bars – dsRNA of 1.5 mg/kg.

(рис. 1А). В этот срок более чувствительными к воздействию препарата оказались гены $IFN\alpha$, OAS и TLR3, кратность индукции которых возросла в среднем в 54, 43 и 28 раз соответственно. Уровень транскрипции мРНК $IFN\beta$ увеличился в меньшей степени (в 9 раз), а активность гена PKR в этот период сохранялась на контрольном уровне.

Как и в экспериментах *in vitro*, увеличение дозы препарата до 1,5 мг/кг не приводило к значимому усилению эффекта. Более того, в ранний срок, через 5 часов после введения, наблюдалась тенденция к уменьшению транскрипции генов по сравнению с ответом на меньшую дозу, что особенно заметно в отношении генов $IFN\alpha$, TLR3 и OAS (в 2-4 раза). Уровень экспрессии PKR в этом случае снижался относительно контроля в 5 раз.

Через сутки после внутрибрюшинного введения дсРНК генная активность клеток заметно ослабевала по сравнению с первым сроком в обеих опытных группах, в меньшей степени — у мышей, которым вводили препарат в дозе 1,5 мг/кг (рис. 1Б). Относительно более высокими в этот период оставались показатели синтеза мРНК $IFN\beta$, OAS и TLR3, уровень экспрессии которых превышал контрольные значения в 5-10 раз. Показатели активности гена $IFN\alpha$ через сутки после введения снижались до контрольного уровня, гена PKR — незначительно возрастали (в 2 раза по сравнению с контролем).

Таким образом, как в культуре клеток мышинных макрофагов J774, так и *in vivo* на мышах линии Balb/c, мы наблюдали одну общую закономерность — повышение под действием дсРНК транскрипции генов рецептора TLR3, $IFNs$ (α и β), OAS.

Полученные данные объединяет также тот факт, что динамика транскрипции гена PKR заметно отличалась от других генов. Препарат дсРНК в использованных дозах не обладал выраженной способностью к стимуляции данного гена ни в одной из использованных моделей. Умеренное по величине повышение активности гена в макрофагах мышей было отмечено лишь в конце периода наблюдения, через сутки после введения препарата. На наш взгляд, это можно объяснить следующим образом. Известно, что индукция IFN -регулируемых белков зависит от многих факторов, в том числе от типа клеток, количества и размера молекул дсРНК, проникших в клетку. Как было показано авторами работы [14], ферментативная активность PKR проявлялась исключительно при низких концентрациях дсРНК (10^{-7} - 10^{-9} г/мл), в отличие, например, от OAS, которая была активна при концентрациях от 10^{-5} г/мл и выше. Помимо этого, высокопо-

лимерные дсРНК обладают способностью ингибировать активность PKR и, наоборот, в большей степени активируют OAS [11]. В условиях наших экспериментов дозы и концентрации препарата дсРНК значительно превосходили вышеуказанные значения, а длина молекул дрожжевой дсРНК превышала 1600 п.н., что в совокупности могло повлиять на регуляцию гена PKR в сторону ослабления эффекта стимуляции.

Следует отметить, что внутриклеточный механизм развития противовирусной реакции под влиянием препарата Ридостин, одним из действующих компонентов которого является дрожжевая дсРНК, ранее уже изучался на разных типах клеток человека. Так, было показано, что в клетках цельной крови Ридостин в концентрациях 10 и 100 мкг/мл активировал широкий спектр генов, включая сигнальные рецепторы врожденного иммунитета (TLR3, TLR8, MDA5), $IFN\alpha$ и $IFN\gamma$, IFN -индуцируемые ферменты и белки (PKR, OAS, РНКазу L, Mx1) [5]. В лимфоцитах крови под воздействием Ридостина преимущественно активировались гены $IFN\alpha$ и $IFN\gamma$ и в меньшей степени — PKR, РНКазы L и OAS. В фибробластах линии ФЛЭЧ-977 препарат в значительной степени стимулировал гены $IFN\beta$, OAS и PKR [4]. В то же время установлено, что Ридостин (40 мкг/мл) оказывал подавляющее действие на экспрессию ряда генов TLR, включая TLR3, и генов IFN -зависимых путей в культуре макрофагов, дифференцированных из моноцитарной линии клеток человека THP-1 [6]. Согласно мнению авторов этой работы, данная ответная реакция объясняется достижением максимального уровня транскрипции генов в активированных макрофагах, дальнейшая стимуляция которых приводит к обратному эффекту. Полученные нами данные относительно характера активации генов противовирусных белков и наличия обратной дозовой зависимости, таким образом, согласуются с результатами работ других исследователей и, по-видимому, отражают общую закономерность ген-активирующего действия дсРНК, независимо от видовой специфичности клеток.

Заключение

Установлено, что дсРНК, выделенная из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, обладает способностью повышать экспрессию генов рецепторных (TLR3) и противовирусных белков ($IFN\alpha$, $IFN\beta$, OAS) в макрофагах мышей как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*. Наиболее высокая кратность индукции в культуре клеток линии J774 наблюдалась в отношении гена $IFN\beta$, при этом эффект носил

дозозависимый характер. Максимальный уровень транскрипционной активности перитонеальных макрофагов мышей в первые часы после введения дсРНК в эффективной противовирус-

ной дозе (0,5 мг/кг) был отмечен для генов IFN α , OAS и TLR3, наименьший – для гена PKR; увеличение дозы приводило к ослаблению эффекта препарата.

Список литературы / References

1. Даниленко Е.Д., Сысоева Г.М., Рослякова Е.Ю., Аликин Ю.С., Масычева В.И. Влияние L- и M-форм двуспиральных РНК из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на функцию фагоцитов // Вестник Уральского медицинского академической науки, 2010. Т. 4, № 32. С. 39-42. [Danilenko E.D., Sysoeva G.M., Roslyakova E.Yu., Alikin Yu.S., Masycheva V.I. The effect of L- and M-forms of double-stranded RNA from *Saccharomyces cerevisiae* on the phagocyte function. *Vestnik Uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Journal of Ural Medical Academic Science*, 2010, Vol. 4, no. 32, pp. 39-42. (In Russ.)]
2. Даниленко Е.Д., Белкина А.О., Сысоева Г.М. Создание лекарственных препаратов на основе высокополимерных двуспиральных РНК для противовирусной и противоопухолевой терапии // Биомедицинская химия, 2019. Т. 65, № 4. С. 277-293. [Danilenko E.D., Belkina A.O., Sysoeva G.M. Development of drugs on the basis of high-polymeric double-stranded RNA for antiviral and antitumor therapy. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*, 2019, Vol. 65, no. 4, pp. 277-293. (In Russ.)]
3. Лебедев Л.Р., Аликин Ю.С., Рослякова Е.Ю., Подгорный В.Ф., Дубинкина О.С., Азаев М.Ш. Выделение и очистка двуспиральной рибонуклеиновой кислоты из киллерного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Биофармацевтический журнал, 2014. Т. 6, № 6. С. 32-38. [Lebedev L.R., Alikin Yu.S., Roslyakova E.Yu., Podgorny V.F., Dubinkina O.S., Azaev M.Sh. Isolation and purification of double stranded RNA from killer strain of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biopharmaceuticals*, 2014, Vol. 6, no. 6, pp. 32-38. (In Russ.)]
4. 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. The drug “Ridostin” induces the transcription of a wide range of interferon system genes in human cells. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2013, Vol. 156, no. 8, pp. 179-182. (In Russ.)]
5. Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Полосков В.В., Ершов Ф.И. Стимуляция генов сигнальной трансдукции препаратами «Ридостин», «Циклоферон» и «Ингавирин» // Цитокины и воспаление, 2015. Т. 14, № 2. С. 26-34. [Sokolova T.M., Shuvalov A.N., Poloskov V.V., Ershov F.I. Stimulation of signaling transduction gene expression with drugs Ridostin, Cycloferon and Ingavirin. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2015, Vol. 14, no. 2, pp. 26-34. (In Russ.)]
6. Соколова Т.М., Полосков В.В., Шувалов А.Н., Ершов Ф.И. Регуляция активности генов TLR/RLR-рецепторов и синтез цитокинов в процессе дифференцировки ТНР-1 моноцитов в макрофаг-подобные клетки под действием форбол-миристината (РМА) // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 1. С. 27-34. [Sokolova T.M., Poloskov V.V., Shuvalov A.N., Ershov F.I. Regulation of TLR/RLR gene activity and synthesis of cytokines during phorbol myristate acetate (PMA)-induced differentiation of THP-1 monocytes into macrophage-like cells. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 1, pp. 27-34. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-27-34.
7. Цыпленкова Е.С., Сысоева Г.М., Шимица Г.Г., Левагина Г.М., Даниленко Е.Д. Сравнительное исследование иммуномодулирующей активности индуктора интерферона дсРНК при разных способах введения // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17), № 3. С. 749-751. [Tsyplenkova E.S., Sysoeva G.M., Shimina G.G., Levagina G.M., Danilenko E.D. Comparative study of immunomodulating activity of interferon inducer dsRNA using different routes of administration. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8 (17), no. 3, pp. 749-751. (In Russ.)]
8. Applequist S.E., Wallin R., Ljunggren H.-G. Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines. *Int. Immunol.*, 2002, Vol. 14, no. 9, pp. 1065-1074.
9. de Faria I.J., Olmo R.P., Silva E.G., Marques J.T. dsRNA sensing during viral infection: lessons from plants, worms, insects, and mammals. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2013, Vol. 33, no. 5, pp. 239-253.
10. Dunlevy F., McElvaney N.G., Greene C.M. TLR3 sensing of viral infection. *Open Infect. Dis. J.*, 2010, Vol. 4, pp. 1-10.
11. 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.
12. Lester S.N., Li K. Toll-like receptors in antiviral innate immunity. *J. Mol. Biol.*, 2014, Vol. 426, no. 6, pp. 1246-1264.

13. Matsumoto M., Seya T. TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008, Vol. 60, no. 7, pp. 805-812.
14. Williams B., Gilbert Ch., Kerr I. The respective roles of the protein kinase and pppA2' p5' A2' p5' A-activated endonuclease in the inhibition of protein synthesis by double stranded RNA in rabbit reticulocyte lysates. *Nucleic Acids Res.*, 1979, Vol. 6, no. 4, pp. 1335-1350.
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:

Батенева А.В. — научный сотрудник отдела биологических исследований, Институт медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Бердск, Новосибирская область, Россия

Гамалей С.Г. — заведующая отделом биологических исследований, Институт медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Бердск, Новосибирская область, Россия

Лебедев Л.Р. — д.б.н., заведующий лабораторией нуклеиновых кислот и рекомбинантных белков, Институт медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Бердск, Новосибирская область, Россия

Даниленко Е.Д. — к.б.н., директор Института медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Бердск, Новосибирская область, Россия

Authors:

Bateneva A.V., Research Associate, Department of Biological Research, Institute of Medical Biotechnology, State Research Center for Virology and Biotechnology “Vector”, Berdsk, Novosibirsk Region, Russian Federation

Gamaley S.G., Head, Department of Biological Research, Institute of Medical Biotechnology, State Research Center for Virology and Biotechnology “Vector”, Berdsk, Novosibirsk Region, Russian Federation

Lebedev L.R., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Nucleic Acids and Recombinant Proteins, Institute of Medical Biotechnology, State Research Center for Virology and Biotechnology “Vector”, Berdsk, Novosibirsk Region, Russian Federation

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