

ТРАНСКРИПЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ TLR/RLR-РЕЦЕПТОРОВ В МАКРОФАГ-ПОДОБНЫХ КЛЕТКАХ ПРИ ДЕЙСТВИИ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ АКРИДОНУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

Наровлянский А. Н. ¹,

Полосков В. В. ¹,

Мезенцева М. В. ¹,

Суетина И. А. ¹,

Цветнов А. В. ¹,

Богданов Е. Ю. ¹,

Федякина И. Т. ¹,

Коваленко А. Л. ²,

Ершов Ф. И. ¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-консультативный центр токсикологии им. С.Н. Голикова», Санкт-Петербург.

**TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY OF TLR/RLR RECEPTOR GENES IN
MACROPHAGE-LIKE CELLS UNDER THE INFLUENCE OF DRUGS
BASED ON ACRIDONEACETIC ACID**

Narovlyansky A. N. ^a,

Poloskov V. V. ^a,

Mezentseva M. V. ^a,

Suetina I. A. ^a,

Tsvetnov A. V. ^a,

Bogdanov E. Yu. ^a,

Fedyakina I. T. ^a,

Kovalenko A. L. ^b,

Ershov F. I. ^a

^a National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow.

^b Scientific Advisory Center of Toxicology named after S.N. Golikova Federal Medical-Biological Agency of Russia, St. Petersburg.

Резюме

Активация Toll-подобных рецепторов (TLR) является одним из самых ранних показателей функционального включения врожденного иммунитета. Поэтому разработка препаратов-стимуляторов транскрипции TLR/RLR-генов и одновременно являющимися «мультитаргетными» препаратами является одной из основных задач современной иммунофармакологии. В связи с этим большой интерес представляют противовирусные препараты, которые сочетают свойства интерферогенов и иммуномодуляторов, к которым также принадлежит Циклоферон® и его аналоги. Цель настоящего исследования заключалась в оценке экспрессии генов, определяющих сигнальные TLR/RLR-реакции врождённого иммунитета при действии иммуномодулирующих противовирусных препаратов на основе акридонуксусной кислоты (Циклоферон® и Циклоферон L). Исследование проведено с использованием модели иммунокомпетентных клеток - THP-1, дифференцированных фоболовым эфиром в макрофаг-подобные клетки. Анализ генной экспрессии выполнен с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени. Изучен уровень экспрессии генов, кодирующих TLR 2, 3, 4, 7/8, 9 и RIG-I, при действии препаратов Циклоферон® и Циклоферон L в трех концентрациях 156, 312 и 625 мкг/мл при трех сроках экспозиции – 1 час, 4 час и 24 час. Показано, что в культуре клеток макрофагов препарат Циклоферон® в концентрации 156, 312 и 625 мкг/мл на 24 час экспозиции в двух сериях экспериментов дозозависимо стимулировал экспрессию генов рецепторов TLR 2, 3, 4, 7, 8. Обнаружена стабильная стимуляция экспрессии генов RIG1 рецепторов при экспозиции с препаратом во всех исследованных концентрациях на сроке 4 час в двух сериях экспериментов. При изучении транскрипционной активности генов TLR/RLR-рецепторов в культуре клеток макрофагов при действии препарата Циклоферон L было впервые выявлено в двух сериях экспериментов стабильное возрастание экспрессии генов TLR 2, 3, 4, 7, 8 только на сроке экспозиции 24 час при одной концентрации препарата Циклоферон L (312 мкг/мл). Обобщая данные, полученные при исследовании препаратов Циклоферон® и Циклоферон L, можно говорить об их способности стимулировать экспрессию генов TLR 2, 3, 4, 7, 8 (и RIG1 для препарата Циклоферон), которые отвечают за синтез рецепторов врожденного иммунитета. Таким образом, подтвержден факт, что Циклоферон® и аналоги являются регуляторами генной экспрессии TLR/RLR-рецепторов врождённого иммунитета.

Ключевые слова: экспрессия генов TLR/RLR, полимеразная цепная реакция в реальном времени, индукторы интерферона, Циклоферон, макрофаг-подобные клетки.

Abstract

Activation of Toll-like receptors (TLRs) is one of the earliest indicators of functional activation of the innate immune system. Therefore, the development of drugs that stimulate the transcription of TLR/RLR genes and at the same time are “multi-target” drugs is an important task of modern immunopharmacology. In this regard, antiviral drugs that combine the properties of interferonogens and immunomodulators, which also include Cycloferon® and its analogues, are of great interest. The purpose of this study was to assess the expression of genes that determine the TLR/RLR signaling reactions of the innate immune system under the influence of immunomodulatory antiviral drugs based on acridoneacetic acid (Cycloferon® and Cycloferon L). The study was conducted using a model of immunocompetent cells - THP-1, differentiated by phorbol ester into macrophage-like cells. Gene expression analysis was performed using real-time polymerase chain reaction. The expression level of genes encoding TLR 2, 3, 4, 7/8, 9 and RIG-I was studied under the influence of the drugs Cycloferon® and Cycloferon L in three concentrations (156, 312 and 625 µg/ml) on 1 hour, 4 hour and 24 hour. It was shown that the drug Cycloferon® at concentrations of 156, 312 and 625 µg/ml at 24 hours of exposure dose-dependently stimulated the expression of TLR 2, 3, 4, 7, 8 receptor genes. A stable stimulation of the expression of RIG1 receptor genes was found upon exposure 4 hours to the drug in all studied concentrations. For the first time, it was revealed that the drug Cycloferon L stimulated a stable increase in the expression of TLR 2, 3, 4, 7, 8 genes at an exposure period of 24 hours. Hereby, it was shown that the drugs Cycloferon® and Cycloferon L stimulated the expression of the TLR 2, 3, 4, 7, 8 genes (and RIG1 for the drug Cycloferon), which are responsible for the synthesis of innate immune receptors.

Keywords: TLR/RLR gene expression, real-time polymerase chain reaction, interferon inducers, Cycloferon, macrophage-like cells.

1 Введение

Фармацевтические препараты, разработанные на основе действующего вещества меглюмина акриданонацетата (Циклоферон) и лизина акридоната (Циклоферон L), как известно, являются производными акридонуксусной кислоты и индукторами интерферона (IFN). Кроме того, они обладают противовирусной и иммуномодулирующей активностями [1, 11]. При клиническом применении Циклоферона было выявлено, что его IFN-индуцирующая активность в организме человека в отличие от исследований на мышинных моделях была незначительной [6]. Были проведены многочисленные исследования, однако до сих пор молекулярные механизмы действия препаратов Циклоферона нуждаются в изучении [14].

Активация Toll-подобных рецепторов (TLR) является одним из самых ранних показателей функционального включения врожденного иммунитета [8]. Fitzgerald and Kagan (2020) считают, что «фундаментальные особенности биологии TLR включают: (1) опосредованную патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (PAMP) димеризацию TLR, (2) опосредованную димерами TLR сборку супрамолекулярных организующих центров (SMOC) и (3) SMOC-опосредованную активацию киназ, которые управляют транскрипцией и гликолизом [9]. Все эти события приводят к активации массивных изменений в клеточной активности, которые включают изменения в транскрипции генов, сплайсинге, эффективности трансляции, аутофагии, гликолизе и окислительном фосфорилировании.

Ранее Т.М.Соколова и соавт. показали, что Циклоферон в мононуклеарах периферической крови усиливает экспрессию генов *TLR9*, *TLR3* и генов *IFN-β1* и *IFN-γ* [4, 5]. Также была обнаружена стимуляция экспрессии генов IFN-регулируемых факторов транскрипции (IRF) *IRF3*, *IRF7*, и генов IFN-зависимых ферментов [2, 5].

Цель настоящего исследования заключалась в оценке экспрессии генов TLR/RLR-рецепторов, свидетельствующих о запуске сигнальных реакций врождённого иммунитета при действии иммуномодулирующих противовирусных препаратов на основе акридонуксусной кислоты (Циклоферон® и Циклоферон L). Были проведены исследования транскрипционной активности генов TLR/RLR-рецепторов (*TLR 2, 3, 4, 7/8, 9* и *RIG-I*) в модели дифференцированных форболовым эфиром моноцитарной линии клеток THP-1 при действии препаратов Циклоферон® и Циклоферон L.

2 Материал и методы

Клеточная линия THP-1 (острый моноцитарный лейкоз, ATCC catalog No TIB 202) получена из РОНЦ им.Н.Н.Блохина. Клетки культивировали в среде RPMI 1640 с глутамином и 10% ЭТС и антибиотиками. Получение THP-1 макрофагов (THP-PMA Мф) осуществляли с реагентом форбол 12-миристат 13-ацетат (PMA; Cat. No. S-79346-0,005, Sigma-Aldrich) согласно известной

процедуре РМА [7]. Для проведения экспериментов при определении цитотоксичности использовали 96-луночные планшеты, для определения генной экспрессии использовали 6-луночные планшеты.

Препараты: лекарственные препараты Циклоферон® (125 мг/мл; серия 010220) и Циклоферон L (Поливиран) (125 мг/мл; серия B011021) были предоставлены ООО «НТФФ «Полисан». При проведении экспериментов в культуре клеток макрофагов ТНР-РМА Мф препараты Циклоферон® и Циклоферон L использовали в концентрациях - 156, 312 и 625 мкг/мл. Время экспозиции клеток с препаратами составляло 1 час, 4 час и 24 час. Всего было проведено 2 серии экспериментов.

Количественная оценка цитотоксичности препаратов выполнялась с использованием МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид) [13]. Жизнеспособность клеток, измеряя оптическую плотность при длине волны 545 нм фотометра Immunochem 2100 (США). Эксперименты проводились с тремя повторами. Выживаемость клеток в присутствии исследуемого соединения рассчитывалась по формуле: ОП опытных лунок / ОП контр. лунок × 100%, где ОП - оптическая плотность. Концентрацию раствора соединения XXV, вызывающую уменьшения значения оптической плотности при длине волны 545 нм на 50% по сравнению с контролем клеток, принимали за 50% цитотоксическую дозу (CC50).

Выделение РНК

Суммарную РНК выделяли с использованием HiPure Total RNA Plus Kit, Magen Cat. No. R411102 (Китай)., согласно прилагаемой инструкции к набору.

Реакция обратной транскрипции (ОТ)

Реакцию ОТ ставили с универсальным праймером random 6 на матрицах суммарной клеточной РНК согласно прилагаемой инструкции к «Набор реагентов для проведения обратной транскрипции (ОТ)», Кат. № ОТ-01, Синтол (Россия). Полученные кДНК хранили при -70°C.

ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ)

Проводили на амплификаторе CFX Opus 96 с готовой 2-х кратной смесью SSoAdvanced Universal SYBR Green Supermix Cat. No.1725271 (Bio-Rad, США) в микропробирках с оптически-проницаемыми крышками на 0,2 мл (SSIbio, США). В ПЦР-боксе смешивали 2 мкл специфических пар праймеров (прямой и обратный) с 3 мкл кДНК (разведение 2-100 раз) и 5 мкл 2х-кратной смеси SSoAdvanced Universal SYBR Green Supermix. Каждая проба исследовалась в 2х повторах. Программа ПЦР: 50°C 2 мин (1 цикл), 95°C 10 мин (1 цикл), 95°C 15 сек (1 цикл), далее 45 циклов 95°C 15 сек, 60°C 30 сек, 72°C 30 сек. Программа плавления в конечной точке 65–95° C, шаг 0,5° C 10 сек. На экране компьютера (в реальном времени) регистрировались уровни флюоресценции,

интеркалирующего в ДНК красителя SYBR Green в виде кривых накопления ДНК-амплификатов. Количество оценивалось по пороговым циклам (C_q) начала логарифмической фазы синтеза. Негативный контроль (проба, не содержащая кДНК) не давал специфических ПЦР-продуктов.

Олигонуклеотидные ПЦР-праймеры. Структуры олигонуклеотидных праймеров, использованные в работе, были взяты из PrimerBank. Синтез олигонуклеотидов осуществлён фирмой Евроген (Россия).

Расчёты уровней экспрессии генов и статистическая обработка

Расчет значений 50% цитотоксической концентрации (CC_{50}) выполняли общепринятыми для биологических исследований методами при помощи пакета программ Microsoft Excel 5.0 и GraphPad Prism 6.01. За рабочую модель для анализа CC_{50} принимали 4-параметрическое уравнение логистической кривой (пункты меню «Нелинейная регрессия» – «Sigmoidal doseresponse (variable slope)»).

Обработка данных амплификации выполнена в программе CFX Maestro (Bio-rad, США) в автоматическом режиме. Определены стандартные отклонения величин $C_q \pm SD$ логарифмической фазы и изменения уровней в опытных пробах ($\Delta C_q \pm SD$). Ген 18S рибосомальная РНК использовался как стабильный референс-нормализатор генной экспрессии. Специфичность ДНК-продуктов устанавливали по Т-плавления. Изменения активности генов ($2\Delta C_q$) в опытных образцах клеток определяли относительно контрольных, принятых равными 1.

3 Результаты исследований

Оценка цитотоксичности препаратов Циклоферон® и Циклоферон L

После обработки результатов исследования цитотоксического действия препаратов Циклоферон® и Циклоферон L на культуру клеток ТНР-РМА Мф с использованием красителя МТТ с помощью программы GraphPad Prism 6.01 была построена аналитическая кривая, из которой определено значение CC_{50} . Концентрация, уменьшающая значение оптической плотности на 50% по сравнению с контролем, составила 2,028 мг/мл для препарата Циклоферон® (рисунок 1А) и 1,877 мг/мл для Циклоферона L (рисунок 1Б).

Таким образом при проведении экспериментов в культуре клеток макрофагов ТНР-РМА Мф препараты Циклоферон® и Циклоферон L использовали в нетоксичных концентрациях.

Транскрипционная активность генов TLR/RLR-рецепторов (TLR 2, 3, 4, 7/8, 9 и RIG-I) в культуре клеток макрофагов ТНР-РМА Мф при действии препаратов Циклоферон® и Циклоферон L.

Суммарные данные двух серий экспериментов, в которых изучалось влияние препаратов Циклоферон® и Циклоферон L на уровне генной экспрессии TLR/RLR-рецепторов (2deltaCq) в опытных образцах клеток относительно контрольных значений, принятых равными 1, позволили выявить следующие изменения активности (в скобках представлены данные кратности максимальной стимуляции активности генов в двух сериях экспериментов). В культуре клеток макрофагов ТНР-РМА Мф препарат Циклоферон® в концентрации 156, 312 и 625 мкг/мл на 24 час экспозиции в двух сериях экспериментов стабильно дозо-зависимо стимулировал экспрессию генов рецепторов TLR 2 (59,08 и 18,9), TLR 3 (381,63 и 950,22), TLR 4 (165,74 и 78,14), TLR 7 (110,19 и 13,11), TLR 8 (18,51 и 88,72) (рис.2). Обращает на себя внимание кратность стимуляции экспрессии генов TLR3 на сроке 24 час, которая значительно возрастает (дозовая зависимость) с увеличением концентрации препарата Циклоферон® (156 мкг/мл – 40,9 и 118,35; 312 мкг/мл – 164,11 и 270,13; 625 мкг/мл – 381,63 и 950,22). Стимуляция экспрессии TLR9 в 5,16 и 3,04 раз выявлена только в одном эксперименте на 1 и 24 час, соответственно, экспозиции с препаратом Циклоферон® в концентрации 156 мкг/мл. Обнаружена также стабильная стимуляция (максимально в 8,7 раза) экспрессии генов RIG1 рецепторов при экспозиции с препаратом Циклоферон® практически почти во всех исследованных концентрациях на сроке 4 час в двух сериях экспериментов.

При изучении экспрессии генов TLR/RLR-рецепторов в культуре клеток макрофагов ТНР-РМА Мф при действии препарата Циклоферон L было выявлено в двух сериях экспериментов стабильное возрастание экспрессии генов TLR 2 (21,35 и 8,43), TLR 3 (86,62 и 386,26), TLR 4 (39,48 и 21,55), TLR 7 (54,50 и 6,21), TLR 8 (7,94 и 34,73) только на сроке экспозиции 24 час при одной концентрации препарата Циклоферон L (312 мкг/мл) (рис. 3). Экспрессия гена TLR9 (кратность стимуляции 4,25) обнаружена только в одном эксперименте. Не обнаружена экспрессии генов RIG1 при действии препарата Циклоферон L.

4 Обсуждение результатов

Обобщая данные, полученные при исследовании индукторов ИФН препаратов Циклоферон® и Циклоферон L, можно говорить об их способности стимулировать экспрессию генов *TLR 2, 3, 4, 7, 8* (и *RIG1* для препарата Циклоферон®), и синтез мРНК этих рецепторов, которые и определяют синтез непосредственно рецепторов врожденного иммунитета. Наши исследования в культуре макрофагов ТНР-РМА Мф подтвердили ранее полученные в клетках крови данные Т.М.Соколовой и соавт. [3, 4] об активации генной экспрессии *TLR 3 и 9* и дополнительно выявили экспрессию генов *TLR 2, 4, 7, 8* и *RIG1* для препарата Циклоферон®.

Известно, что рецепторы TLR1, TLR 2, TLR4, TLR5, TLR6 и IL1R, расположенные на клеточной плазматической мембране, запускают каскад

сигналов через MyD88-регулируемый путь, который не связан с индукцией генов *IFN*. Исключение составляет только рецептор TLR4, который задействует TRIF-зависимый механизм индукции синтеза *IFN*. Эндосомальные рецепторы TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9 с использованием MyD88 and TRIF адапторов также формируют сигнальный механизм активации *IFN*-регулируемых факторов транскрипции IRF3, IRF5 и IRF7, который приводит к индукции генов *IFN* [10, 12]. Интересно, что в клетках цельной крови Циклоферон® также стимулировал экспрессию генов *IRF3* и *IRF7*, *IFN-β1* и *IFN-γ*. [4, 5].

Разработка препаратов, активирующих экспрессию TLR/RLR-генов является важной задачей иммунофармакологии [15]. Кроме того, такие препараты довольно часто одновременно являются «мультицелестными» препаратами, что представляет исключительный интерес для современного здравоохранения. В связи с этим обращают на себя внимание противовирусные препараты, которые сочетают свойства интерферогенов и иммуномодуляторов, к которым также принадлежит Циклоферон® и его аналоги. Таким образом, Циклоферон® и его аналог Циклоферон L являются регуляторами генной экспрессии TLR/RLR-рецепторов врожденного иммунитета, и стимулируют экспрессию генов *TLR 2, 3, 4, 7, 8* и *RIG1* в модели макрофаг-подобных клеток.

РИСУНКИ

Рисунок 1. Определение цитотоксического действия препарата Циклоферон® (А - $CC_{50}=2,028$ мг/мл) и Циклоферон L (Б - $CC_{50}=1,877$ мг/мл) через 48 ч после добавления к культуре клеток макрофагов ТНР-РМА Мф (с использованием красителя МТТ).

Figure 1. Determination of the cytotoxic effect of the drug Cycloferon® (A - $CC_{50} = 2.028$ mg/ml) and Cycloferon L (B - $CC_{50} = 1.877$ mg/ml) 48 hours after adding THP-RMA Mf to the macrophage cell culture (using MTT dye).

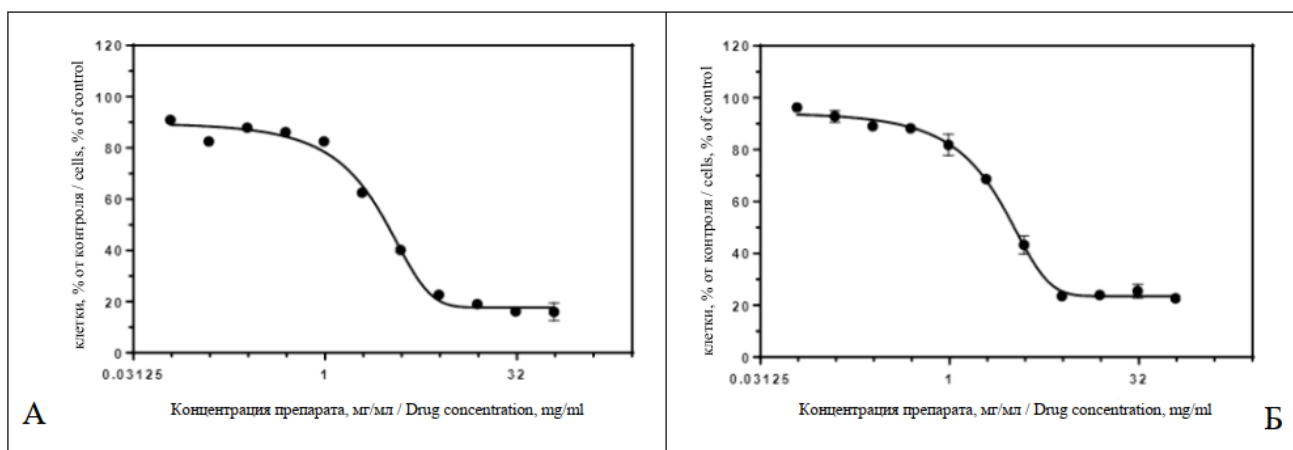


Рисунок 2. Экспрессия генов TLRs при экспозиции 24 часа с Циклофероном® в концентрации 625 мкг/мл в культуре клеток макрофагов THP-RMA Мф. По оси ординат – кратность стимуляции генной экспрессии. По оси абсцисс – название препарата и концентрация. В скобках обозначен номер эксперимента.

Figure 2. Expression of TLRs genes upon exposure for 24 hours to Cycloferon® at a concentration of 625 µg/ml in a culture of macrophage cells THP-RMA Mf. The y-axis is the frequency of stimulation of gene expression. The x-axis is the drug name and concentration. The experiment number is indicated in parentheses.

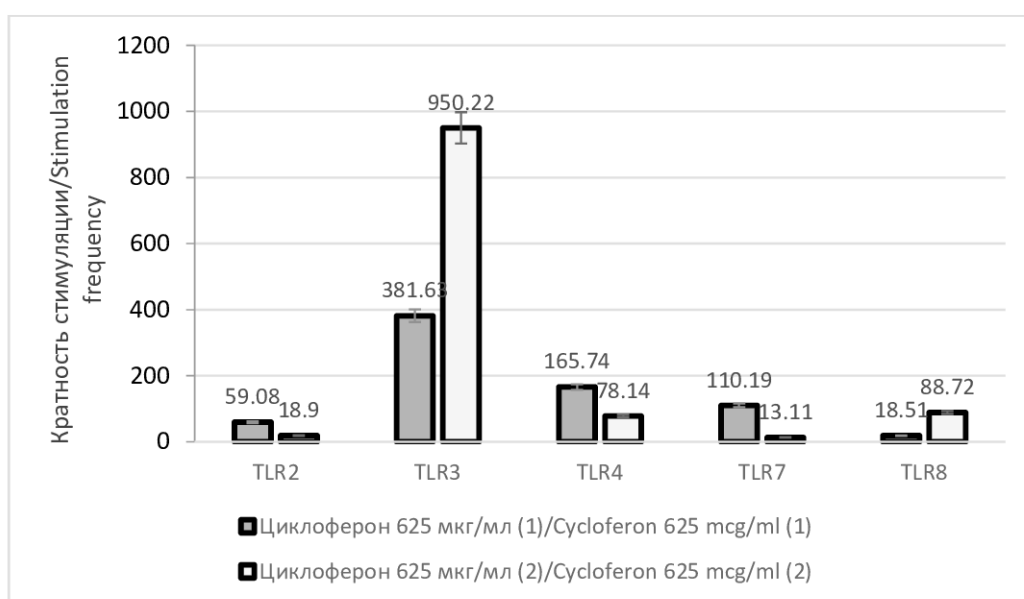
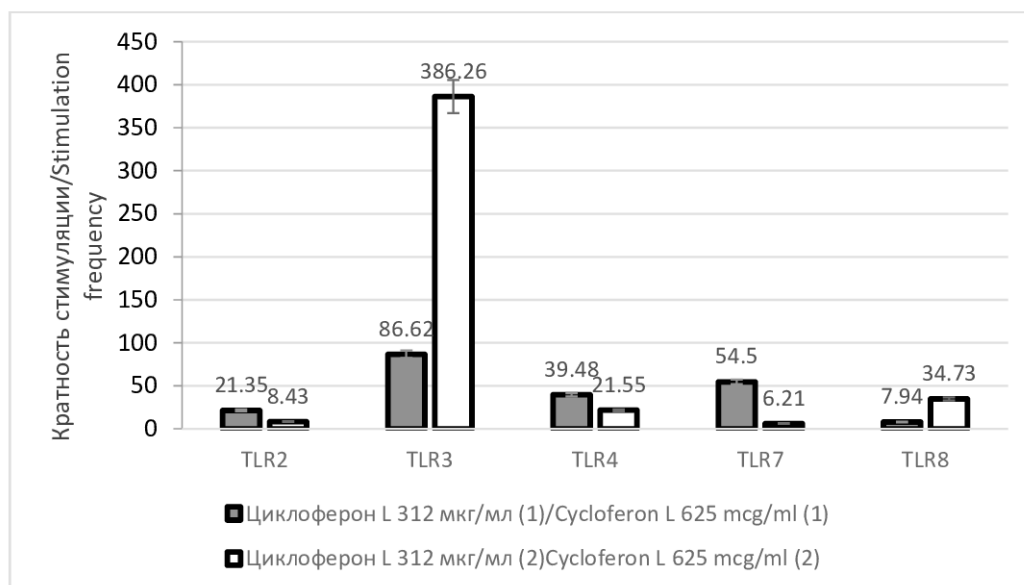


Рисунок 3. Экспрессия генов TLRs при экспозиции 24 часа с Циклофероном L в концентрации 312 мкг/мл в культуре клеток макрофагов THP-RMA Мф. По оси ординат – кратность стимуляции генной экспрессии. По оси абсцисс – название препарата и концентрация. В скобках обозначен номер эксперимента.

Figure 3. Expression of TLRs genes upon exposure for 24 hours to Cycloferon L at a concentration of 312 $\mu\text{g/ml}$ in the THP-RMA Mf macrophage cell culture. The y-axis is the frequency of stimulation of gene expression. The x-axis is the drug name and concentration. The experiment number is indicated in parentheses.



ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДАННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Наровлянский Александр Наумович – доктор биологических наук, профессор, Главный научный сотрудник;

адрес: 123098, Российская Федерация, Москва, ул.Гамалеи, д.18;

телефон/факс: 8(499)193-43-06 / 8(985)226-28-95;

e-mail: narovl@yandex.ru

Narovlyansky Alexander Naumovich – Doctor of Biological Sciences, Professor, Chief Researcher;

address: Gamaleyi St. 18, Moscow, Russian Federation, 123098;

telephone/fax: 8(499)193-43-06 / 8(985)226-28-95;

e-mail: narovl@yandex.ru

Блок 2. Информация об авторах

Полосков В. В. – кандидат медицинских наук, научный сотрудник;

Poloskov V. V. – Candidate of Medical Sciences, researcher;

Мезенцева М. В. – доктор биологических наук, руководитель лаборатории;

Mezentseva M. V. – Doctor of Biological Sciences, Head of the Laboratory;

Суетина И. А. – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник;

Suetina I. A. – Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher;

Цветнов А. В. – младший научный сотрудник;

Tsvetnov A. V. – junior researcher;

Богданов Е. Ю. – лаборант-исследователь;

Bogdanov E. Y. – research assistant;

Федякина И. Т. – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории;

Fedyakina I. T. – Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher, Head of Laboratory.

Коваленко Алексей Леонидович – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник;

Kovalenko A. L. – Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher.

Ершов Ф. И. – доктор медицинских наук, академик РАН, главный научный сотрудник;

Ershov F. I. – Doctor of Medical Sciences, Academician of the Russian Academy of Sciences, Chief Researcher.

Блок 3. Метаданные статьи

ТРАНСКРИПЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ TLR/RLR-РЕЦЕПТОРОВ В
МАКРОФАГ-ПОДОБНЫХ КЛЕТКАХ ПРИ ДЕЙСТВИИ ПРЕПАРАТОВ НА
ОСНОВЕ АКРИДОНУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY OF TLR/RLR RECEPTOR GENES IN
MACROPHAGE-LIKE CELLS UNDER THE INFLUENCE OF DRUGS BASED
ON ACRIDONEACETIC ACID

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ TLR/RLR-РЕЦЕПТОРОВ

EXPRESSION OF TLR/RLR RECEPTOR GENES

Ключевые слова: экспрессия генов TLR/RLR, полимеразная цепная реакция в реальном времени, индукторы интерферона, Циклоферон, макрофаг-подобные клетки.

Keywords: TLR/RLR gene expression, real-time polymerase chain reaction, interferon inducers, Cycloferon, macrophage-like cells.

Объединенный иммунологический форум 2024.

Количество страниц текста – 5,

Количество таблиц – 0,

Количество рисунков – 3.

29.03.2024

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	Ф.И.О, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi
1	Ф.И.Ершов, О.И.Киселев. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств). Москва, ГЭОТАР-Медиа, 2005 г., 368 с.	Ershov F.I., Kiselev O.I. Interferons and their inducers (from molecules to drugs). Moscow, GEOTAR-Media, 2005, 368 p.	https://www.elibrary.ru/item.asp?edn=qknvch
2	Соколова Т.М., Кособокова Е.Н., Шувалов А.Н., Шаповал И.М., Косоруков В.С., Ершов Ф.И. Активность генов системы интерферона в клетках аденокарциномы толстого кишечника HCT-116: регуляция рекомбинантными интерферонами альфа-2 из бактериальных и растительных продуцентов // Российский Биотерапевтический журнал. – 2013. - №3. – С.39-44.	Sokolova T.M., Kosobkova E.N., Shuvalov A.N., Shapoval I.M., Kosorukov V.S., Ershov F.I. of Interferon system gene activity in colon adenocarcinoma cells HCT-116: regulation by interferon-alpha-2B from bacteria or plants // Russian Biotherapeutic Journal. – 2013. - No. 3. – P.39-44.	https://cyberleninka.ru/article/n/aktivnost-genov-sistemy-interferona-v-kletkah-adenokartsinomy-tolstogo-kishechnika-nst-116-regulyatsiya-rekombinantnymi-interferonami/viewer
3	Соколова Т.М., Полосков В.В., Бурова О.С., Шувалов А.Н., Соколова З.А., Иншаков А.Н., Шишкин Ю.В., Ершов Ф.И. Действие интерферонов и индукторов интерферонов на экспрессию генов рецепторов TLR/RLR и	Sokolova T.M., Poloskov V.V., Burova O.S., Shuvalov A.N., Sokolova Z.A., Inshakov A.N., Shishkin Yu.V., Ershov F.I. ACTION INTERFERONS AND	https://bioterapevt.elpub.ru/jour/article/view/818 https://doi.org/10.17650/1726-9784-2016-15-3-28-33

	дифференцировку опухолевых линий клеток THP-1 и HCT-116 // Российский биотерапевтический журнал. – 2016. - Т. 15, № 3, С. 28-33.	IFN-INDUCTORS ON TLR/RLRS GENES EXPRESSION AND DIFFERENTIATION OF TUMOR CELL LINES THP-1 AND HCT-116. Russian Journal of Biotherapy. 2016;15(3):28-33.	
4	Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Полосков В. В., Ершов Ф.И. Стимуляция генов сигнальной трансдукции препаратами Ридостин, Циклоферон и Ингавирин. // Цитокины и воспаления. - 2015. - №2. – С.26–34	Sokolova T.M., Shuvalov A.N., Poloskov V.V., Ershov F.I. Stimulation of signal transduction genes with drugs Ridostin, Cycloferon and Ingavirin. // Cytokines and inflammation. - 2015. - No. 2. – P.26–34	https://elibrary.ru/item.asp?id=29452886&ysclid=lu5dj85gis50546908
5	Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Шаповал И.М., Соколова З.А., Ершов Ф.И., «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	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	https://www.mimmun.ru/index.php/mimmun/article/view/802 DOI: http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-7-18

		interferon preparations and IFN inducers”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 7-18.	
6	Суханов, Д.С., Романцов М.Г., Смагина Ф.И., Коваленко А.Л., Локтева О.М. Доза зависимая интерферон индуцирующая активность и фармакокинетика циклоферона у здоровых лиц // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2012. - № 75. - С.23-26	Sukhanov, D.S., Romantsov M.G., Smagina F.I., Kovalenko A.L., Lokteva O.M. Dose-dependent interferon-inducing activity and pharmacokinetics of cycloferon in healthy individuals // Experimental and clinical pharmacology. - 2012. - No. 75. - P.23-26.	http://ekf.folium.ru/index.php/ekf/article/view/251 DOI: https://doi.org/10.30906/0869-2092-2012-75-1-23-26
7	Assay Guidance Manuel.	-	http://www.ncgc.nih.gov/guidance/section2.html
8	El-Zayat S.R., Sibaii H., Mannaa, F.A. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. Bull Natl Res Cent, 2019, Vol. 43, no. 187	-	https://bnrc.springeropen.com/articles/10.1186/s42269-019-0227-2 https://doi.org/10.1186/s42269-019-0227-2

9	Fitzgerald K.A., Kagan J.C. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. Cell, 2020, Vol.180, no. 6, pp. 1044-1066	-	https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(20)30218-X?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS009286742030218X%3Fshowall%3Dtrue https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.041
10	Kawai T., Akira S. Signaling to NF-kappaB by toll-like receptors. Trends Mol Med., 2007, Vol. 13, no.11, pp.460-569	-	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471491407001840?via%3Dihub https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.09.002
11	Kramer M.J., Cleeland R., Grunberg E. Antiviral Activity of 10-Carboxymethyl-9-Acridanone. Antimicrob Agents Chemother. 1976, Vol.9, no. 2, pp. 233–238	-	https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/aac.9.2.233 https://doi.org/10.1128/aac.9.2.233
12	Mancino A., Lawrence T. Nuclear factor-κB and tumor-associated macrophages. Clin. Cancer Res, 2010, Vol. 16, pp.784-789	-	https://aacrjournals.org/clincancerres/article/16/3/784/75609/Nuclear-Factor-B-and-Tumor-Associated https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1015

13	Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // J. Immunol. Methods, 1983, Vol. 65, no 1–2, pp. 55–63	-	https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0022175983903034?via%3Dihub https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4
14	Plotnikova M.A., Klotchenko S.A., Kiselev A.A., Gorshkov A.N., Shurygina A-P.S., Vasilyev K.A., Uciechowska-Kaczmarzyk U., Samsonov S.A., Kovalenko A.L., Vasin A.V. Meglumine acridone acetate, the ionic salt of CMA and N-methylglucamine, induces apoptosis in human PBMCs via the mitochondrial pathway. Sci Rep 2019, Vol. 9, p. 18240	-	https://www.nature.com/articles/s41598-019-54208-9 https://doi.org/10.1038/s41598-019-54208-9
15	Tartey, S., Takeuchi O. Pathogen recognition and Toll-like receptor targeted therapeutics in innate immune cells. Int Rev Immunol, 2017, Vol. 6, pp.1-17	-	https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08830185.2016.1261318 https://doi.org/10.1080/08830185.2016.1261318