УДК 577.27:606 https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-2-116-121 СПЕЦИАЛЬНОСТЬ Клиническая иммунология, аллергология Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)



Действие препарата Кагоцел® на экспрессию генов Toll-подобных рецепторов системы врожденного иммунитета в THP-1 моноцитах человека с разным уровнем дифференцировки

Т. М. Соколова*. В. В. Полосков

Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

ул. Гамалеи, д. 18, Москва, 123098, Российская Федерация

Препарат Кагоцел® применяется в России для лечения вирусных инфекций. По химической структуре субстанция препарата Кагоцел® представляет собой сополимер полифенола госсипола с карбоксиметилцеллюлозой. Кагоцел® был исследован на наличие противовирусной и цитокининдуцирующей активности, а также изучено его токсическое действие. Цель работы: изучение действия субстанции Кагоцел на индукцию экспрессии генов Toll-подобных рецепторов (TLR) системы врожденного иммунитета в культуре клеток острого моноцитарного лейкоза человека линии ТНР-1 с разным уровнем дифференцировки. Материалы и методы: действие субстанции Кагоцел исследовали в концентрациях 0.2 и 2 мг/мл в отношении клеток линии ТНР-1 с разным уровнем дифференцировки — недифференцированных моноцитах и дифференцированных в макрофагоподобные клетки. Сравнительный анализ активности генов TLR 2, 3, 4, 7, 8, 9 проводили количественным методом ОТ-ПЦР. Определены стандартные отклонения уровней экспрессии генов в опытных образцах клеток ($2^{\text{deltaCq}} \pm SD$) относительно экспрессии в контроле. Результаты: субстанция Кагоцел в концентрации 0.2 мг/мл индуцировала в ТНР-1 моноцитах активацию экспрессии TLR2 в 3,5 раза, TLR3 в 2 раза, TLR4 в 1,6 раза, а в концентрации 2 мг/мл — дополнительно генов TLR7 и TLR8 в 1,4 раза, TLR9 в 2 раза. В ТНР-1 моноцитах, частично дифференцированных в макрофагоподобные клетки, уровни индукции TLR2, TLR3, TLR9 были достоверно выше, и наибольший уровень стимуляции наблюдался для TLR2 (в 8 раз). Выводы: полученные результаты характеризуют Кагоцел® как стимулятор генов TLR в линии клеток THP-1. Показано расширение спектра индуцированных генов TLR в THP-1 моноцитах при повышении концентрации препарата. Дифференцировка ТНР-1 моноцитов в макрофагоподобные клетки дополнительно усиливает восприимчивость к Кагоцелу[®]. Позитивная регуляция активности генов *TLR* может объяснять проявляемые препаратом Кагоцел[®] антивирусные и интерферон-индуцирующие свойства и также указывает на дополнительные возможности широкого применения при иммунопатологиях различного происхождения.

Ключевые слова: препарат Кагоцел®; врожденный иммунитет; TLR; экспрессия генов; дифференцировка THP-1 моноцитов

Для цитирования: Соколова ТМ, Полосков ВВ. Действие препарата Кагоцел® на экспрессию генов Toll-подобных рецепторов системы врожденного иммунитета в THP-1 моноцитах человека с разным уровнем дифференцировки. *БИОпрепараты.* Профилактика, диагностика, лечение. 2021;21(2):116–121. https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-2-116-121

The effect of Kagocel® on gene expression of Toll-like receptors of innate immunity in THP-1 human monocytes with different levels of differentiation

T. M. Sokolova*, V. V. Poloskov

National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N. F. Gamaleya, 18 Gamaleya St., Moscow 123098, Russian Federation

Kagocel® is used in Russia for the treatment of viral infections. In terms of its chemical structure, Kagocel® active ingredient is a copolymer of gossypol polyphenol and carboxymethylcellulose. The study investigated antiviral and cytokine-inducing activity of Kagocel®, as well as its toxic effects. The aim of the study was to investigate the effect of Kagocel® active ingredient on the induction of expression of the innate immune system receptor genes (Toll-like receptors, TLR) in the THP-1 human acute monocytic leukemia cell line with different levels of differentiation. Materials and methods: the effect of Kagocel active ingredient was investigated at the concentrations of 0.2 and 2 mg/mL in the THP-1 human acute monocytic leukemia cell line with different levels of differentiation: non-differentiated monocytes, and monocytes differentiated into macrophage-like cells. Comparative analysis of the activity of TLR 2, 3, 4, 7, 8, 9 genes was carried out by quantitative RT-PCR. The study determined standard deviations of the levels of gene expression in the experimental cells (2^{deltaCq} ± SD) relative to the expression in the control cells. Results: Kagocel active ingredient at the concentration of 0.2 mg/mL induced activation of TLR2 expression in THP-1 monocytes by 3.5 times, TLR3 by 2 times, TLR4 by 1.6 times, and at the concentration of 2 mg/mL also induced activation of TLR7 and TLR8 by 1.4 times, and TLR9 by 2 times. The levels of TLR2, TLR3, TLR9 induction were significantly higher in THP-1 monocytes partially differentiated into macrophage-like cells, and the highest stimulation level was observed for TLR2 (8 times). Conclusions: the results obtained characterise Kagocel® as a stimulator of TLR genes in the THP-1 cell line. The number of TLR genes induced in THP-1 monocytes was shown to increase with the increase in the product concentration. THP-1 monocyte differentiation into macrophage-like cells enhances susceptibility to Kagocel®. The positive regulation of TLR genes activity may account for antiviral

^{*} Контактное лицо: Соколова Татьяна Михайловна; tmsokolovavir@mail.ru

and interferon-inducing properties of Kagocel®, and also suggests the possibility of expanding the use of the product for various immune-associated diseases.

Key words: Kagocel® preparation; innate immunity; TLR; gene expression; differentiation of THP-1 monocytes

For citation: Sokolova TM, Poloskov VV. The effect of Kagocel® on gene expression of Toll-like receptors of innate immunity in THP-1 human monocytes with different levels of differentiation. BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2021;21(2):116–121. https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-2-116-121

**Corresponding author:* Tatyana M. Sokolova; tmsokolovavir@mail.ru

Российский лекарственный препарат Кагоцел® относится к группе так называемых «индукторов интерферона (ИФН)» [1]. Механизмы ИФН-индуцирующей активности препарата Кагоцел® неизвестны, но именно образованием интерферонов объясняют антивирусное действие препарата. Субстанция Кагоцел — сополимер полифенола госсипола и карбоксиметилцеллюлозы с молекулярной массой преимущественно 1-80 кДа. Основным действующим веществом считается госсипол, обладающий токсичностью в свободном виде [2]. Содержание госсипола в полимере составляет не более 3%. Ковалентная химическая связь госсипола с карбоксиметилцеллюлозой прочная и исключает наличие свободного госсипола в субстанции [3]. Карбоксиметилцеллюлоза снижает токсичность госсипола и обеспечивает мембранный контакт препарата с клеточной поверхностью. В клинических исследованиях была подтверждена безопасность препарата Кагоцел®; в настоящее время он широко применяется в России для профилактики и лечения респираторных вирусных инфекций и герпеса [4, 5].

Кагоцел® относится к сложным макромолекулярным соединениям, механизм действия которых может включать несколько видов биологических активностей за счет взаимодействия с разными химическими структурами (принцип неопределенности) [6].

Механизмы противоопухолевого и антивирусного действия производных госсипола и его (+) и (-) энантиомеров активно изучаются в настоящее время [7]. Биологическую активность госсипола связывают с действием на митохондриальный путь апоптоза, регуляцией активности белка р53 и протоонкогена ВсІ-2, нарушением функций вирусных белков gp41 вируса иммунодефицита человека типа 1 и гемагглютинина НА2 вируса гриппа субтипа Н5N1 [8, 9]. Антивирусное действие субстанции препарата Кагоцел® изучено на пандемических и сезонных (H1N1pdm09 и H3N2) штаммах вируса гриппа А в чувствительных клетках [10].

По нашим данным [11, 12] Кагоцел® повышал экспрессию генов системы ИФН и апоптоза, а также синтез провоспалительных цитокинов в культурах лимфоцитов и эмбриональных фибробластов человека. По данным литературы Кагоцел® также стимулировал пролиферацию мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга мышей и модулировал синтез провоспалительных цитокинов при бактериальной инфекции мышей [13, 14]. Характер действия препарата Кагоцел® на мышиных МСК и спектр цитокиновых реакций свидетельствовали о сходстве с механизмом действия лигандов NOD-подобных и Toll-подобных рецепторов (Toll-like receptors. TLR) врожденного иммунитета.

Однако специальных исследований индукции препаратом Кагоцел® TLR и активации их генов в клетках человека проведено ранее не было.

Семейство эволюционно закрепленных TLR врожденного иммунитета играет важную сигнальную роль в защите клеток от вирусных патогенов и включает механизм индукции синтеза ИФН и антивирусных белков [15]. При этом гены *TLR* и группы антивирусных белков-ферментов сами являются ИФН-регулируемыми [16]. Агонистами TLR, наряду со структурами

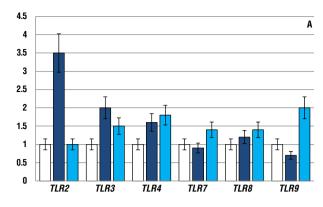
патогенов, также могут быть разные природные и синтетические химические соединения, имеющие структурные отличия от клеточных молекул [17]. Особый интерес представляют известные и вновь создаваемые препараты ИФН-индукторов, обладающие антивирусной активностью и свойствами агонистов TLR врожденного иммунитета. Изучение молекулярных механизмов действия биопрепаратов на систему врожденного иммунитета необходимо для эффективного применения их в медицине как средств профилактики и лечения вирусных заболеваний. Изучение экспрессии генов TLR и RIG-подобных рецепторов (RLR) врожденного иммунитета и процессов сигнальной трансдукции имеет значение при многих видах иммунной патологии, вызываемой вирусными и бактериальными инфекциями, онкологическими и аутоиммунными заболеваниями.

Ранее на чувствительной клеточной модели THP-1 моноцитов нами была изучена группа препаратов рекомбинантных ИФН, ИФН-индукторов и иммуномодуляторов, которые оказались стимуляторами определенных видов генов *TLR* и провоспалительных цитокинов [18–20]. Однако препарат Кагоцел® как стимулятор экспрессии генов *TLR* не был изучен.

Цель работы — изучение действия субстанции Кагоцел на индукцию экспрессии генов *TLR* системы врожденного иммунитета в культуре клеток острого моноцитарного лейкоза человека линии THP-1 с разным уровнем дифференцировки. Для решения поставленной цели проводилось сравнительное изучение сигнальных реакций генов *TLR* на воздействие субстанции Кагоцел на чувствительных модельных клетках THP-1 — недифференцированных THP-1 моноцитах [21] и THP-1 моноцитах, стимулированных к дифференцировке в макрофагоподобные клетки [22].

Материалы и методы

В работе использовали перевиваемую линию клеток острого моноцитарного лейкоза человека ТНР-1 (АТСС-ТІВ-202), полученную в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России. ТНР-1 моноциты культивировали в питательной среде RPMI-1640, содержащей глютамин, 10% эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотик гентамицин («ПанЭко», Россия). Диплоидные фибробласты человека (линия ФЛЭЧ-977, Медико-генетический научный центр, Москва) культивировали в питательной среде DMEM с 10% эмбриональной телячьей сывороткой и гентамицином. ТНР-1 моноциты стимулировали к дифференцировке добавлением в питательную среду реагента Цитокин-Стимул-Бест («Вектор-Бест», Россия). Приготовленный по инструкции реагент содержал фитогемагглютинин (ФГА) 4 мкг, конканавалин А 4 мкг (КонА), липополисахарид (ЛПС) 2 мкг — лиганд рецептора TLR4. Культивирование с реагентом на протяжении 1-4 сут вызывало постепенную адгезию и дифференцировку клеток в макрофагоподобные [22]. Субстанцию Кагоцел (000 «Ниармедик Плюс», Россия) растворяли в питательной среде RPMI-1640 и исследовали на THP-1 моноцитах в концентрациях 0,2 и 2 мг/мл. На линии ФЛЭЧ-977 Кагоцел исследовали в концентрациях 0,18 и 0,75 мг/мл, не оказывающих цитодеструктивного действия, в течение 24 ч при 37 °C.



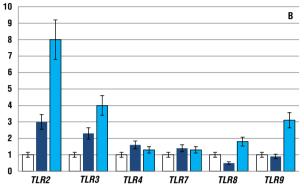


Рис. 1. Действие субстанции Кагоцел на экспрессию генов *TLR* в клеточной линии THP-1. По оси абсцисс – гены *TLR*, по оси ординат – кратность стимуляции транскрипции генов *TLR* после добавления субстанции Кагоцел. □ — контроль; ■ — субстанция Кагоцел 0,2 мг/мл; ■ — субстанция Кагоцел 2 мг/мл. А — недифференцированные THP-1 моноциты (опыт 1); В — THP-1 моноциты, дифференцированные в макрофагоподобные клетки реагентом Цитокин-Стимул-Бест (опыт 2). Данные и стандартные отклонения (±*SD*) представлены в виде средних значений 3 опытов.

Fig. 1. The effect of Kagocel active ingredient on the expression of *TLR* genes in the THP-1 cell line. X axis — *TLR* genes, Y axis — multiplicity factor for *TLR* gene transcription stimulation after addition of Kagocel. □ control; ■ Kagocel active ingredient, 0.2 mg/mL; ■ Kagocel active ingredient, 2 mg/mL. A—non-differentiated THP-1 monocytes (experiment 1); B—THP-1 monocytes differentiated into macrophage-like cells by Cytokine-Stimul-Best reagent (experiment 2). Data and standard deviations (±*SD*) are presented as a mean of 3 experiments.

Эксперименты проводили параллельно на двух популяциях клеточной культуры THP-1: недифференцированные THP-1 моноциты (опыт 1 и контроль 1) и THP-1 моноциты, дифференцированные в макрофагоподобные клетки после добавления реагента Цитокин-Стимул-Бест (опыт 2 и контроль 2). К опытным образцам клеток добавляли субстанцию Кагоцел, к контрольным — субстанцию не добавляли. Опытные и контрольные клетки в количестве 5×10^5 (подсчет клеток производили в автоматическом счетчике клеток ВіоRad TC-20, США, с добавлением красителя — трипановый синий) инкубировали 24 ч при 37 °С в питательной среде объемом 5 мл. Процент жизнеспособных клеток оценивали с использованием автоматического счетчика ВіоRad TC-20 с красителем трипановым синим. Затем клетки осаждали центрифугированием и использовали для выделения РНК.

Определение уровней экспрессии генов TLR. Суммарную РНК выделяли с помощью реагента Purzol (Bio-Rad, CША) согласно инструкции, остаточную ДНК удаляли реагентом

RNA-free (Ambion, США). Реакцию обратной транскрипции (ОТ) и количественную ПЦР проводили с использованием пар специфических олигонуклеотидных праймеров к мРНК TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 и TLR9, как описано ранее [18-20]. ПЦР выполняли на амплификаторе CFX-96 (Bio-Rad, США) с реакционной смесью SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, США). Количество ДНК-амплификатов оценивали по пороговым циклам (Сд) логарифмической фазы синтеза. Данные обрабатывали в программе CFX Manager Software Gene expression analysis (Bio-Rad, США). Изменения активности генов (2^{deltaCq}) в опытных образцах клеток определяли относительно контрольных, принятых равными 1. Данные кратности стимуляции активности генов и стандартные отклонения (±SD) представлены в виде средних значений трех опытов. Достоверность различий в сравниваемых группах оценивали с применением критерия Стьюдента в программе MedCalc (MedCalc Software Ltd, Бельгия) и U-критерия Манна-Уитни при $p \le 0.05$.

Результаты и обсуждение

В человеческих моноцитах представлены все 10 известных видов TLR [15, 16]. В THP-1 моноцитах методом количественной ОТ-ПЦР определена конститутивная экспрессия генов 6 видов TLR: *TLR2* и *TLR4*, представленных на поверхности клеток, и *TLR3*, *TLR7*, *TLR8*, *TLR9*, локализованных в эндосомах. Установлено, что уровни транскрипции исследованных генов *TLR* в THP-1 моноцитах существенно отличаются. Наиболее транскрипционно-активными в THP-1 моноцитах являются гены *TLR4* и *TLR8* (Cq22–26) и наименее — гены *TLR2*, *TLR3*, *TLR7*, *TLR9* (Cq30–40).

Ранее нами показано, что THP-1 моноциты под действием реагента Цитокин-Стимул-Бест дифференцируются в макрофагоподобные клетки и это вызывает преимущественно увеличение транскрипционной активности генов *TLR3* и *Stat1b*, участвующих в индукции и действии ИФН [22]. В настоящей работе мы сравнили действие субстанции Кагоцел на уровни экспрессии генов *TLR* врожденного иммунитета в недифференцированных ТНР-1 моноцитах и в ТНР-1 моноцитах, индуцированных к дифференцировке в макрофаги реагентом Цитокин-Стимул-Бест. Результаты сравнительного анализа экспрессии генов *TLR* в культуре клеток ТНР-1 (опыты 1 и 2) представлены на рисунках 1А и 1В. Субстанцию Кагоцел в опытах 1 и 2 исследовали в концентрациях 0,2 и 2 мг/мл, не оказывающих цитотоксического действия на клетки ТНР-1.

В недифференцированных ТНР-1 моноцитах (опыт 1) субстанция Кагоцела в низкой концентрации 0,2 мг/мл достоверно стимулировала экспрессию генов трех рецепторов: TLR2 в 3,5 раза, TLR3 в 2 раза, TLR4 в 1,6 раза. В высокой концентрации 2 мг/мл субстанция активировала экспрессию генов пяти рецепторов: TLR3 в 1,5 раза, TLR4 в 1,8 раза, TLR7 и TLR8 в 1,4 раза, TLR9 в 2 раза. Различия в уровнях генной индукции для двух концентраций субстанции Кагоцел в недифференцированных THP-1 моноцитах по сравнению с контролем клеток достоверны при $p \le 0,05$. Таким образом, при увеличении концентрации субстанции Кагоцел до 2 мг/мл спектр стимулированных генов TLR расширялся, но уровни их стимуляции мало изменялись (рис. 1A).

В дифференцированных ТНР-1 моноцитах (опыт 2) субстанция Кагоцел в высокой концентрации 2 мг/мл действовала эффективнее. Уровни стимуляции генов TLR2, TLR3 и TLR9 высокой концентрацией субстанции Кагоцел значимо возрастали (различия в уровнях экспрессии генов TLR2, TLR3 и TLR9 в опытах 1 и 2 достоверны по критерию U Манна-Уитни при $p \leq 0,05$). При этом максимально активировалась экспрессия гена

TLR2 (в 8 раз), слабее активировалась экспрессия генов TLR3 (в 4 раза) и TLR9 (в 3 раза). В то же время изменения в уровнях экспрессии генов TLR4. TLR7 и TLR8 в дифференцированных ТНР-1 моноцитах (опыт 2) по сравнению с недифференцированными ТНР-1 моноцитами (опыт 1) были или недостоверными, или даже ниже уровня экспрессии этих генов в контрольных клетках. Таким образом, макрофагоподобные клетки избирательно реагировали на субстанцию Кагоцел усилением экспрессии генов TLR2, TLR3 и TLR9. Это согласуется с выраженным воспалительным ответом активированных макрофагов и, вероятно, объясняется наличием большего числа этих TLR в макрофагах по сравнению с моноцитами [23]. Рецепторы TLR2, TLR3 и TLR9 имеют разные специфические лиганды, клеточную локализацию, сопряженные белки-адаптеры и сигнальные пути. Возможно, химическая структура Кагоцела способна взаимодействовать сразу с несколькими рецепторами, но более вероятно существование между TLR перекрестных взаимосвязей в сигнальных реакциях [15, 17].

Исследованные гены *TLR* кодируют рецепторы, распознающие структурные компоненты PHK- и ДНК-содержащих вирусов, многие из которых являются возбудителями опасных заболеваний. От уровней экспрессии рецепторов врожденного иммунитета во многом зависят восприимчивость, характер развития и исход инфекционного процесса в организме [15].

Вместе с тем процессы индукции TLR и действия ИФН между собой взаимосвязаны, так как уровни экспрессии генов TLR регулируются синтезированными ИФН [16]. В дальнейшем необходимо сопоставить активацию препаратом Кагоцел® генов TLR с продукцией ИФН и провоспалительных цитокинов в ТНР-1 моноцитах с разным уровнем дифференцировки. На рисунке 2 представлены данные стимуляции субстанцией Кагоцел экспрессии группы генов системы ИФН в фибробластах человека, полученные нами ранее в виде значений пороговых циклов (Сq) ПЦР [11], дополнительно обработанные и представленные в виде кратности уровней стимуляции генов. Исследования выполнены на высокочувствительной к препаратам ИФН I типа клеточной линии ФЛЭЧ-977, в которой процессы клеточной регуляции на генном уровне не нарушены. Данные на диплоидных фибробластах человека по ИФНиндуцирующей активности субстанции Кагоцел дополняют исследования иммуномодулирующих свойств на чувствительной модели THP-1 моноцитов, экспрессирующих широкий спектр генов TLR и способных к дифференцировке в макрофагоподобные клетки. Кагоцел стимулировал гены ИФН-альфа, ИФН-бета, ИФН-гамма (IFN-alpha, IFN-beta, IFN-gamma) и гены ИФН-зависимых ферментов олигоаденилатсинтетазы (OAS). дсРНК-зависимой протеинкиназы (dsPKR), рибонуклеазы L (RNAse L) и ИФН-стимулируемого гена 15 (ISG15) (рис. 2). С экспрессией генов ИФН-зависимых ферментов связано развитие в клетках антивирусного состояния. Похожие стимулирующие эффекты на гены системы ИФН и синтез провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 бета, ИЛ-6, ИЛ-8) и фактора некроза опухоли-альфа (ФНО-альфа) Кагоцел оказывал в лимфоцитах человека [11, 12].

В литературе опубликованы данные о том, что препарат ЦелАгрип (Radiks, Узбекистан), близкий по химическому составу препарату Кагоцел®, также способен индуцировать гены ИФН и цитокинов в лимфоидных линиях клеток [24, 25]. Таким образом, стимуляция препаратом Кагоцел® экспрессии генов *TLR* в ТНР-1 моноцитах и генов системы ИФН в клетках различного происхождения согласуются между собой, но нуждаются в подтверждении на модели ТНР-1 моноцитов.

Остается недоказанным, может ли Кагоцел® как агонист/лиганд напрямую взаимодействовать с определенными

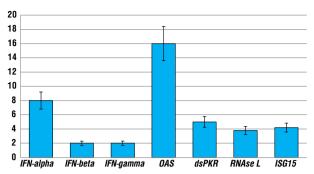


Рис. 2. Действие субстанции Кагоцел на экспрессию генов системы интерферона (ИФН) в фибробластах человека линии ФЛЭЧ-977. По оси абсцисс — гены ИФН (IFN-alpha, IFN-beta, IFN-gamma) и гены ИФН-зависимых антивирусных белков (OAS, dsPKR, RNAse L, ISG15). По оси ординат — кратность стимуляции транскрипции генов относительно контрольных клеток. Данные и стандартные отклонения (±SD) представлены в виде средних значений 3 опытов.

Fig. 2. The effect of Kagocel active ingredient on the expression of interferon system (IFN) genes in human fibroblasts of the FLECH-977 human cell line. X axis—IFN genes (IFN-alpha, IFN-beta, IFN-gamma) and genes of IFN-dependent antiviral proteins (OAS, dsPKR, RNAse L, ISG15). Y axis—multiplicity factor for stimulation of gene transcription relative to the control cells. Data and standard deviations (±SD) are presented as a mean of 3 experiments.

видами TLR. Для получения подобных результатов необходимо проведение специальных рентгеноструктурных исследований. Весьма вероятно, что особенности макромолекулярной структуры препарата Кагоцел® «узнаются» TLR как чужеродные. Список известных TLR-агонистов продолжает пополняться новыми природными и синтетическими соединениями [17]. Среди большой группы иммуномодуляторов уже обнаружены соединения, отличающиеся от канонических TLR-агонистов химической структурой, но также способные к прямому взаимодействию с TLR [26].

Выводы

Субстанция препарата Кагоцел® является активатором генов TLR врожденного иммунитета, которые запускают сигнальные механизмы «узнавания» патогенов и приводят к синтезу провоспалительных цитокинов и ИФН. Способность к TLRактивации является несомненным достоинством препарата, расширяющим диапазон его применения при вирусных и бактериальных инфекциях. Стимуляция препаратом Кагоцел® экспрессии генов TLR в моноцитах и макрофагах повышает их чувствительность к патогенам разной природы и вызывает более сильный иммунный ответ в организме. Субстанция препарата Кагоцел® в концентрации 0,2 мг/мл индуцировала в ТНР-1 моноцитах активацию экспрессии TLR2 в 3,5 раза, TLR3 в 2 раза, TLR4 в 1,6 раза, а в концентрации 2 мг/мл — дополнительно генов TLR7 и TLR8 в 1,4 раза, TLR9 в 2 раза. В THP-1 моноцитах, частично дифференцированных в макрофагоподобные клетки, уровни индукции TLR2, TLR3, TLR9 были достоверно выше, и наибольший уровень стимуляции наблюдался для TLR2 (в 8 раз). Макрофаги имеют определяющее значение в ранних защитных реакциях на вирусные патогены и оказывают влияние на дендритные клетки и функции Т- и В-лимфоцитов. Информация о сигнальных рецепторах врожденного иммунитета является важной характеристикой применяемых в медицине антивирусных препаратов и вакцин.

Вклад авторов. Т. М. Соколова — дизайн исследования, эксперименты по изоляции РНК и по постановке реакции обратной транскрипции, анализ результатов работы, написание и редактирование текста статьи; В. В. Полосков — культивирование клеток, проведение ПЦР и обработка полученных данных, написание текста статьи.

Authors' contributions. *Tatyana M. Sokolova*—elaboration of the study design, isolation of RNA, performance of the reverse transcription reaction test, analysis of the study results, writing and editing of the text; *Vladislav V. Poloskov*—cell culture, performing PCR experiments, processing of the obtained data, writing of the text.

Благодарности. Авторы выражают благодарность академику РАН, профессору Ф. И. Ершову за предоставление субстанции Кагоцел и канд. мед. наук А. Н. Шувалову за участие в обсуждении результатов.

Acknowledgements. The authors are grateful to academician, member of the Russian Academy of Sciences, professor F. I. Ershov for provision of Kagocel active ingredient, and to A. N. Shuvalov, Cand. Sci. (Med.), for participation in the discussion of the study results.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье. Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература/References

- Нестеренко ВГ, Суслов АП, Дятлов ВА, Круппа ИС. Полимерные производные госсипола, способ их получения и фармацевтическая композиция на их основе. Патент Российской Федерации № 2577539; 2016. [Nesterenko VG, Suslov AP, Djatlov VA, Kruppa IS. Gossypol polymer derivatives, methods for production thereof and pharmaceutical composition based thereon. Patent of the Russian Federation No. 2577539; 2016 (In Russ.)]
- Keshmiri-Neghab H, Goliaei B. Therapeutic potential of gossypol: an overview. *Pharm Biol.* 2014;52(1):124–8. https:// doi.org/10.3109/13880209.2013.832776
- Киселева ИВ, Рудой БА, Пирогов АВ, Толмачева НГ. Валидация ВЭЖХ-методики определения госсипола в субстанции «Кагоцел». Фармация. 2016;65(8):18–24. [Kiseleva IV, Rudoy BA, Pirogov AV, Tolmacheva NG. Validation of HPLC procedure for detection of gossypol in the substance Kagocel. Farmatsiya = Pharmacy. 2016;65(8):18–24 (In Russ.)]
- Боровская ТГ. Безопасность отечественного противовирусного препарата Кагоцел. Терапевтический архив. 2017;89(11):93–9. [Borovskaya TG. Safety of the Russian antiviral drug Kagocel. Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive. 2017;89(11):93–9 (In Russ.)] http://doi.org/10.17116/terarkh2017891193-99
- 5. Сологуб ТВ, Цветков ВВ. Кагоцел в терапии гриппа и острых респираторных вирусных инфекций: анализ и систематизация данных по результатам доклинических и клинических исследований. *Терапевтический архив*. 2017;89(8):113–9. [Sologub TV, Tsvetkov VV. Kagocel in the therapy of influenza and acute respiratory viral infections: Data analysis and systematization from the results of preclinical and clinical trials. *Terapevticheskiy arkhiv* = *Therapeutic Archive*. 2017;89(8):113–9 (In Russ.)] http://doi.org/10.17116/terarkh2017898113-119
- Нестеренко ВГ. Принцип неопределенности в биологии и медицине. Фармация. 2020;69(6):5–7. [Nesterenko VG. The uncertainty principle in biology and medicine. Farmatsiya = Pharmacy. 2020;69(6):5–7 (In Russ.)] https://doi. org/10.29296/25419218-2020-06-01
- Zeng Y, Ma J, Xu L, Wu D. Natural product gossypol and its derivatives in precision cancer medicine. Curr Med Chem. 2019;26(10):1849–73. https://doi.org/10.2174/09298673246 66170523123655

- Barba-Barajas M, Hernández-Flores G, Lerma-Díaz JM, Ortiz-Lazareno PC, Domínguez-Rodríguez JR, Barba-Barajas L, et al. Gossypol induced apoptosis of polymorphonuclear leukocytes and monocytes: involvement of mitochondrial pathway and reactive oxygen species. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2009;31(2):320–30. https://doi. org/10.1080/08923970902718049
- Yang J, Chen G, Li LL, Pan W, Zhang F, Yang J, et al. Synthesis and anti-H5N1 activity of chiral gossypol derivatives and its analogs implicated by a viral entry blocking mechanism. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013;23(9):2619–23. http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.02.101
- 10. Федякина ИТ, Коноплева МВ, Прошина ЕС, Линник ЕВ, Никитина НИ. Противовирусное действие субстанции «Кагоцел» in vitro в отношении вирусов гриппа Н1N1, H1N1pdm09 и H3N2. Вопросы вирусологии. 2019;64(3):125–31. [Fediakina IT, Konopleva MV, Proshina ES, Linnik EV, Nikitina NI. Antiviral effect of "Kagocel" substance in vitro on influenza viruses H1N1, H1N1pdm09 and H3N2. Voprosy virusologii = Problems of Virology. 2019;64(3):125–31 (In Russ.)] https://doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-3-125-131
- 11. Соколова ТМ, Шувалов АН, Колодяжная ЛВ, Оспельникова ТП, Ершов ФИ. Механизмы действия препарата «Кагоцел» в клетках человека. Сообщение 1. Регуляция транскрипции генов системы интерферона и апоптоза. В кн.: Ершов ФИ, Наровлянский АН, ред. Сборник научных статей. Интерферон 2011. М.; 2012. С. 389—401. [Sokolova TM, Shuvalov AN, Kolodyazhnaya LV, Ospelnikova TP, Ershov FI. The mechanisms of action of the drug "Kagocel" in human cells. Communication 1. Regulation of transcription of genes of the interferon system and apoptosis. In: Ershov FI, Narovlyanskiy AN, eds. Collection of Proceedings. Interferon 2011. Moscow; 2012. P. 389—401 (In Russ.)]
- 12. Оспельникова ТП, Соколова ТМ, Колодяжная ЛВ, Миронова ТВ, Чкадуа ГЗ, Ершов ФИ. Механизмы действия препарата «Кагоцел» в клетках человека. Сообщение 2. Синтез иммуномодулирующих цитокинов. В кн.: Ершов ФИ, Наровлянский АН, ред. Сборник научных статей. Интерферон 2011. М.; 2012. С. 401–7. [Ospelnikova TP, Sokolova TM, Kolodyazhnaya LV, Mironova TV, Chkadua GZ, Ershov FI. Mechanisms of action of the preparation "Kagocel" in human cells. Communication 2. Synthesis of immunomodulatoty cytokines. In: Ershov FI, Narovlyanskiy AN, eds. Collection of scientific articles. Interferon 2011. Moscow; 2012. P. 401–7 (In Russ.)]
- 13. Горская ЮФ, Грабко ВИ, Коноплёва МВ, Суслов АП, Нестеренко ВГ. Влияние Кагоцела® на численность мультипотентных стромальных клеток, экспрессию генов цитокинов в первичных культурах стромальных клеток костного мозга, а также на концентрацию цитокинов в сыворотке крови мышей линии СВА. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015;159(2):200—4. [Gorskaya YF, Grabko VI, Konopleva MV, Suslov AP, Nesterenko VG. Effects of Kagocel® on the counts of multipotent stromal cells, expression of cytokine genes in primary cultures of bone marrow stromal cells, and serum cytokine concentrations in CBA mice. Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2015;159(2):240—4 (In Russ.)] https://doi.org/10.1007/s10517-015-2932-7
- 14. Горская ЮФ, Семенова ЕН, Грабко ВИ, Суслов АП, Нестеренко ВГ. Противовирусный препарат «Кагоцел®» оказывает модулирующее действие на цитокиновый профиль сыворотки крови мышей линии СВА, формирующийся под действием комплекса антигенов S. typhimurium in vivo. Иммунология. 2014;35(5):272–5. [Gorskaya UF, Semyonova EN, Grabco VI, Suslov AP, Nesterenko VG. Antivirus preparation Kagocel® exerts modulation multidirection influence on blood serum cytokines profile forming by S. typhimurium antigen complex injection in

- CBA mice. *Immunologiya = Immunology*. 2014;35(5):272–5 (In Russ)]
- Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu Rev Immunol*. 2015;33:257–90. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112240
- Khoo JJ, Forster S, Mansell A. Toll-like receptors as interferonregulated genes and their role in disease. *J Interferon Cytokine Res.* 2011;31(1):13–25. https://doi.org/10.1089/jir.2010.0095
- Hussein WM, Liu T-Yu, Skwarczynski M, Toth I. Toll-like receptor agonists: a patent review (2011–2013). Expert Opin Ther Pat. 2014;24(4):453–70. https://doi.org/10.1517/13543 776.2014.880691
- 18. Соколова ТМ, Полосков ВВ, Бурова ОС, Шувалов АН, Соколова ЗА, Иншаков АН и др. Действие интерферонов и индукторов интерферонов на экспрессию генов рецепторов TLR/RLR и дифференцировку опухолевых линий клеток ТНР-1 и HCT-116. Российский биотерапевтический журнал. 2016;15(3):28—33. [Sokolova TM, Poloskov VV, Burova OS, Shuvalov AN, Sokolova ZA, Inshakov AN, et al. Action interferons and IFN-inductors on TLR/RLRs genes expression and differentiation of tumor cell lines THP-1 and HCT-116. Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal = Russian Journal of Biotherapy. 2016;15(3):28—33 (In Russ.)] https://doi.org/10.17650/1726-9784-2016-15-3-28-33
- 19. Соколова ТМ, Полосков ВВ, Шувалов АН, Бурова ОС, Соколова ЗА. Сигнальные TLR/RLR-механизмы иммуномодулирующего действия препаратов ингавирин и тимоген. *Российский биотерапевтический журнал.* 2019;18(1):60–6. [Sokolova TM, Poloskov VV, Shuvalov AN, Burova OS, Sokolova ZA. Signalling TLR/RLR-mechanisms of immunomodulationg action of ingavirin and thymogen preparations. *Rossiysky bioterapevtichesky zhurnal = Russian Journal of Biotherapy.* 2019;18(1):60–6 (In Russ.)] https://doi.org/10.17650/1726-9784-2019-18-1-60-66
- 20. Соколова ТМ, Шувалов АН, Полосков ВВ, Ершов ФИ. Стимуляция генов сигнальной трансдукции препаратами Ридостин, Циклоферон и Ингавирин. *Цитокины и воспаление*. 2015;14(2):26–34. [Sokolova TM, Shuvalov AN, Poloskov VV, Ershov FI. Stimulation of signaling transduction gene expression with drugs Ridostin, Cycloferon and Ingavirin. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*. 2015;14(2):26–34 (In Russ.)]

- Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. Int Immunopharmacol. 2014;23(1):37–45. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.002
- 22. Полосков ВВ, Соколова ЗА, Бурова ОС, Шувалов АН, Соколова ТМ. Действие митогенов на дифференцировку клеток ТНР-1 и экспрессию TLR/RLR-генов. *Цитокины и воспаление*. 2016;15(2):161–5. [Poloskov VV, Sokolova ZA, Burova OS, Shuvalov AN, Sokolova TM. The effect of mitogens on the differentiation of THP-1 cells and the expression of TLR/RLR genes. *Tsitokiny i vospalenie* = *Cytokines and Inflammation*. 2016;15(2):161–5 (In Russ.)]
- Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(6):392-404. https://doi.org/10.1038/nri3671
- 24. Наровлянский АН, Полосков ВВ, Иванова АМ, Мезенцева МВ, Суетина ИА, Руссу ЛИ и др. Интерферон-регулирующая активность препарата ЦелАгрип и его влияние на образование активных форм кислорода и экспрессию генов врожденного иммунитета в перевиваемых культурах клеток лимфомы Бёркитта. Вопросы вирусологии. 2020;65(2):87–94. [Narovlyansky AN, Poloskov VV, Ivanova AM, Mezentseva MV, Suetina IA, Russu LI, et al. Interferon-regulating activity of the CelAgrip drug and its influence on the formation of reactive oxygen species and expression of innate immunity genes in Burkitt's lymphome cell cultures. Voprosy virusologii = Problems of Virology. 2020;65(2):87–94 (In Russ.)] https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-87-94
- 25. Наровлянский АН, Мезенцева МВ, Суетина ИА, Руссу ЛИ, Иванова АМ, Полосков ВВ и др. Цитокин-регулирующая активность противовирусного препарата ЦелАгрип в перевиваемых В-клеточных линиях лимфомы Беркитта. Вопросы вирусологии. 2019;64(4):165–72. [Narovlyanskiy AN, Mezentseva MV, Suetina IA, Russu LI, Ivanova AM, Poloskov VV, et al. Cytokine-regulating activity of anti-virus preparation CelAgripus in Burkitt's lymphoma stable B-cell lines. Voprosy virusologii = Problems of Virology 2019;64(4):165–72 (In Russ.)] https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-165-172
- Su L, Wang Y, Wang J, Mifune Y, Morin MD, Jones BT, et al. Structural basis of TLR2/TLR1 activation by the synthetic agonist Diprovocim. *J Med* Chem. 2019;62(6):2938–49. https:// doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01583

Об авторах / Authors

Соколова Татьяна Михайловна, д-р биол. наук. Tatyana M. Sokolova, Dr. Sci. (Biol.). ORCID: http://orcid.org/0000-0003-0957-4513

Полосков Владислав Васильевич, канд. мед. наук. Vladislav V. Poloskov. Cand. Sci. (Med.). ORCID: http://orcid.org/0000-0003-0001-2493

Поступила 19.03.2021 После доработки 21.05.2021 Принята к публикации 10.06.2021

Received 19 March 2021 Revised 21 May 2021 Accepted 10 June 2021