



## Интерферон-регулирующая активность препарата ЦелАгрип и его влияние на образование активных форм кислорода и экспрессию генов врождённого иммунитета в перевиваемых культурах клеток лимфомы Бёркитта

Наровлянский А.Н.<sup>1</sup>, Полосков В.В.<sup>1</sup>, Иванова А.М.<sup>1</sup>, Мезенцева М.В.<sup>1</sup>, Суетина И.А.<sup>1</sup>, Руссу Л.И.<sup>1</sup>, Челарская Е.С.<sup>1</sup>, Измestьева А.В.<sup>1</sup>, Оспельникова Т.П.<sup>1</sup>, Зубашев И.К.<sup>1</sup>, Сарымсаков А.А.<sup>2</sup>, Ершов Ф.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия;

<sup>2</sup> Институт химии и физики полимеров Академии наук Республики Узбекистан, 100128, Ташкент, Узбекистан

**Введение.** Интерфероны (IFN) и их индукторы эффективны в подавлении вирусной репродукции и коррекции механизмов врождённого иммунитета.

**Цель** исследования – проверить гипотезу возможного участия индуктора IFN ЦелАгрип (ЦА) в качестве активатора или супрессора противовирусного ответа в культурах клеток лимфомы Бёркитта (ЛБ), различающихся по способности продуцировать антигены вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ).

**Материал и методы.** Использовали линии человеческих клеток ЛБ Р3HR-1 и Namalva, спонтанно продуцирующие и не продуцирующие антигены ВЭБ. Выполнен кинетический анализ динамики продукции активных форм кислорода (АФК) и определена экспрессия группы генов методом ПЦР в реальном времени в ответ на обработку ЦА.

**Результаты и обсуждение.** При обработке ЦА в клетках Namalva обнаружено снижение индекса активации АФК, в клетках Р3HR-1 наблюдали его повышение. В клетках Namalva после обработки ЦА отсутствовала достоверная активация генов *IFN-α*, *-β* и *-λ*, но возросла кратность экспрессии гена *ISG15* более чем в 1200 раз и гена *P53 (TP53)* – в 4,5 раза. При обработке ЦА клеток Р3HR-1 экспрессия генов *IFN-α* возросла более чем в 200 раз, *IFN-λ* – в 100 раз и гена *ISG15* – в 2,2 раза. Предполагается взаимосвязь IFN-индуцирующего действия ЦА с активностью *ISG15* и АФК в перевиваемых культурах клеток ЛБ, продуцирующих и не продуцирующих антигены ВЭБ.

**Заключение.** В клетках Namalva, не продуцирующих антигены ВЭБ, при обработке ЦА подавляется генерация АФК и активизируется экспрессия генов *ISG15* и *P53 (TP53)*; в клетках Р3HR-1, продуцирующих антигены ВЭБ, наблюдается обратная картина: активизируются образование АФК и экспрессия генов *IFN-α* и *-λ* и супрессируется активность генов *ISG15* и *P53 (TP53)*.

**Ключевые слова:** индуктор интерферона; лимфома Бёркитта; вирус Эпштейна–Барр; активные формы кислорода; экспрессия генов; интерферон-стимулированный ген 15.

**Для цитирования:** Наровлянский А.Н., Полосков В.В., Иванова А.М., Мезенцева М.В., Суетина И.А., Руссу Л.И., Челарская Е.С., Измestьева А.В., Оспельникова Т.П., Зубашев И.К., Сарымсаков А.А., Ершов Ф.И. Интерферон-регулирующая активность препарата ЦелАгрип и его влияние на образование активных форм кислорода и экспрессию генов врождённого иммунитета в перевиваемых культурах клеток лимфомы Бёркитта. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(2): 87-94.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-87-94>

**Для корреспонденции:** Наровлянский Александр Наумович, д-р биол. наук, проф., глав. науч. сотр. ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва. E-mail: [narovl@yandex.ru](mailto:narovl@yandex.ru)

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований по проекту (гранту) № 18-515-41001/19.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Участие авторов:** формулировка идеи, цели, задач, анализ литературы и экспериментальных данных, обсуждение, написание и оформление – Наровлянский А.Н., Ершов Ф.И., Сарымсаков А.А., Мезенцева М.В.; экспериментальная работа (исследование экспрессии группы генов методом ПЦР в реальном времени), оформление – Полосков В.В., Челарская Е.С., Зубашев И.К.; экспериментальная работа (кинетический анализ динамики продукции АФК), статистическая обработка, оформление – Иванова А.М., Измestьева А.В.; экспериментальная работа (культура клеток, контроль качества) – Суетина И.А., Руссу Л.И., Оспельникова Т.П.

Поступила 16.03.2020

Принята в печать 31.03.2020

## 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 lymphoma cell cultures

Alexander N. Narovlyansky<sup>1</sup>, Vladislav V. Poloskov<sup>1</sup>, Alla M. Ivanova<sup>1</sup>, Marina V. Mezentseva<sup>1</sup>, Irina A. Suetina<sup>1</sup>, Leonid I. Russu<sup>1</sup>, Ekaterina S. Chelarskaya<sup>1</sup>, Anna V. Izmet'eva<sup>1</sup>, Tatiyana P. Ospelnikova<sup>1</sup>, Igor K. Zubashev<sup>1</sup>, Abdushukur A. Sarymsakov<sup>2</sup>, Feliks I. Ershov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russia;

<sup>2</sup>Institute of Polymer Chemistry and Physics, Tashkent, 100128, Uzbekistan

**Introduction.** Interferons (IFN) and IFN inducers are effective in suppressing viral reproduction and correcting of the innate immunity mechanisms.

**The aim** of the study was to test the hypothesis of the possible involvement of the IFN inducer CelAgrip (CA) as an activator or suppressor of antiviral effects in Burkitt's lymphoma (LB) cell cultures with different ability to produce Epstein–Barr virus antigens (EBV).

**Material and methods.** The kinetic analysis of the dynamics of reactive oxygen species (ROS) production and determination of gene group expression by real-time PCR in response to CA treatment were done in human cell lines LB P3HR-1 and Namalva, spontaneously producing and not producing EBV antigens.

**Results and discussion.** When treating CA in Namalva cells, a decrease in the ROS activation index was found; in P3HR-1 cells, an increase was observed. After treatment with CA, there was no reliable activation of the *IFN-α*, *IFN-β* and *IFN-λ* genes in Namalva cells, but the expression of the *ISG15* and *P53(TP53)* genes was increased more than 1200 times and 4.5 times, respectively. When processing the CA of P3HR-1 cells, the expression of *IFN-α* genes increased by more than 200 times, *IFN-λ* – 100 times, and the *ISG15* gene – 2.2 times. The relationship between IFN-inducing action of CA and the activity of *ISG15* and ROS in LB cell cultures producing and not producing EBV antigens is supposed.

**Conclusion.** In Namalva cells that do not produce EBV antigens the treatment of CA results in suppression of ROS generation and activation of the expression of genes *ISG15* and *P53 (TP53)*; in P3HR-1 cells producing EBV antigens, the opposite picture is observed – the formation of ROS and the expression of the *IFN-α* and *IFN-λ* genes are activated and the activity of the *ISG15* and *P53 (TP53)* genes is suppressed.

**Keywords:** *interferon inducer; Burkitt's lymphoma; Epstein–Barr virus; reactive oxygen species; gene expression; interferon-stimulated gene 15.*

**For citation:** Narovlyansky A.N., Poloskov V.V., Ivanova A.M., Mezentseva M.V., Suetina I.A., Russu L.I., Chelarskaya E.S., Izmet'eva A.V., Ospelnikova T.P., Zubashev I.K., Sarymsakov A.A., Ershov F.I. 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 lymphoma cells cultures. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology)*. 2020; 65(2): 87-94. (In Russian).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-87-94>

**For correspondence:** Alexander N. Narovlyansky, Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher of the Cytokine Laboratory, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russia. E-mail: [narowl@yandex.ru](mailto:narowl@yandex.ru)

### Information about the author:

Narovlyansky A.N., <http://orcid.org/0000-0003-0601-7148>

Poloskov V.V., <http://orcid.org/0000-0003-0001-2493>

Ivanova A.M., <http://orcid.org/0000-0002-6008-7967>

Mezentseva M.V., <http://orcid.org/0000-0001-7346-5536>

Suetina I.A., <http://orcid.org/0000-0003-2878-0590>

Russu L.I., <http://orcid.org/0000-0001-6353-9917>

Chelarskaya E.S., <https://orcid.org/0000-0002-5254-0493>

Izmet'eva A.V., <http://orcid.org/0000-0002-0035-324X>

Ospelnikova T.P., <http://orcid.org/0000-0002-1580-6096>

Zubashev I.K., <https://orcid.org/0000-0002-3238-7778>

Sarymsakov A.A., <http://orcid.org/0000-0003-4562-7280>

Ershov F.I., <http://orcid.org/0000-0002-4780-7560>

**Acknowledgments.** This work was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research for the project (grant) No. 18-515-41001/19.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Contribution:** formulation of ideas, goals, objectives, analysis of literature and experimental data, discussion, writing and design – Narovlyansky A.N., Ershov F.I., Mezentseva M.V., Sarymsakov A.A.; experimental work (study of gene group expression by real-time PCR), computer data processing, design – Poloskov V.V., Chelarskaya E.S., Zubashev I.K.; experimental work (kinetic analysis of the dynamics of ROS production), statistical processing, design – Ivanova A.M., Izmet'eva A.V.; experimental work (cell culture, quality control) – Suetina I.A., Russu L.I., Ospelnikova T.P.

Received 16 March 2020

Accepted 31 March 2020

## Введение

Интерфероны (IFN) и их индукторы активно участвуют в подавлении вирусной репродукции и коррекции механизмов врождённого иммунитета, поэтому уже более полувека используются для терапии и профилактики вирусных инфекций [1, 2]. Вместе с тем индукторы IFN обладают антиокислительной активностью. Активные формы кислорода (АФК) существуют в виде свободнорадикальных молекул с выраженной окислительной способностью [3] и являются важным системным компонентом организма человека, обеспечивающим его нормальную жизнедеятельность. АФК часто возникают при нарушении функционирования электронно-транспортных цепей митохондрий или микросом [4–6] и участвуют как в реализации физиологических функций здорового организма, так и в патогенезе вирусных и онкологических заболеваний. При этом уровень АФК в тканях или клетках считается одним из основных оценочных факторов [7, 8].

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ), или человеческий герпесвирус 4 (HHV-4), относится к подсемейству гаммагерпесвирусов (*Gammaherpesvirinae*) и является одним из самых распространённых в человеческой популяции, инфицируя более 95% взрослого населения. Он вызывает инфекции ротовой полости (инфекционный мононуклеоз и волосатая лейкоплакия) и ассоциируется с назофарингеальной карциномой, карциномой желудка, В-клеточной лимфомой (включая лимфому Бёркитта (ЛБ, Burkitt's lymphoma)), посттрансплантационным лимфопролиферативным синдромом, лимфомами Ходжкина и не-Ходжкина [9], а также с повышенным риском развития рассеянного склероза [10]. ВЭБ способен успешно уклоняться и обходить первую линию противовирусной защиты – врождённый иммунитет, разрушая механизмы врождённой иммунной сигнализации, активируемые Toll-, RIG-I-, NOD- и AIM2-подобными рецепторами, а также циклической GMP-AMP-синтазой. ВЭБ также противодействует выработке и передаче IFN-сигналов, включая пути TBK1-IRF3 и JAK-STAT [11]. Наконец, ВЭБ способен эффективно трансформировать *in vitro* В-клетки в «бессмертные» линии лимфобластных клеток, что широко используется для исследований лабораториями по всему миру [12].

Разработка новых лекарственных препаратов, способных изменять активность генов *IFN* в клетках, латентно инфицированных ВЭБ, и тем самым влиять на состояние врождённого иммунитета, представляет в настоящее время актуальную задачу. В Институте химии и физики полимеров Академии наук Республики Узбекистан (РУ) разработан новый противовирусный лекарственный препарат ЦелАгрип (CelAgrip, (ЦА)), который разрешён Минздравом РУ в качестве профилактического и лечебного средства при гриппе и острых респираторных вирусных инфекциях [13].

В ранее проведённых исследованиях [14] нами было показано, что при обработке ЦА клеток ЛБ наблюдались активация генной экспрессии *IFN- $\lambda$* , интерлейкинов (*IL*) *-1 $\beta$* , *-6*, *-8* и супрессия активности гена *IL-10*.

**Цель** настоящей работы – проверить гипотезу возможного участия индуктора интерферона ЦелАгрип в качестве активатора или супрессора противовирусного ответа в культурах клеток лимфомы Бёркитта, различающихся по способности продуцировать антигены ВЭБ. Для этого исследовали способность ЦА генерировать АФК и влиять на экспрессию группы генов: *P53 (TP53)*, *NF- $\kappa$ B*, *IFN- $\alpha$ 2*, *- $\beta$ 1*, *- $\lambda$ 1* и *IFN*-стимулированного гена *ISG15*.

## Материал и методы

**Клетки:** 1) перевиваемая линия человеческих клеток ЛБ РЗНР-1, спонтанно продуцирующая антигены ВЭБ, была выделена и распространена Y. Hinuma и соавт. [15]; 2) перевиваемая линия человеческих клеток ЛБ Namalva, не продуцирующая антигены ВЭБ, была получена G. Klein и соавт. [16]. Обе линии получены из лаборатории культур тканей подразделения Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

**Культивирование перевиваемых линий клеток** осуществляли в питательной среде Игла ДМЕМ или RPMI-1640 (ООО «Биолот», Санкт-Петербург) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Thermo Fisher Scientific Inc., США) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub>.

**Препараты.** ЦА является натриевой солью сополимера (1→4)-6-0-карбоксиметил- $\beta$ -D-глюкозы, (1→4)- $\beta$ -D-глюкозы, (2→24)2,3,14,15,21,24,29,32-октагидрокси-23-(карбоксиметоксиметил)-7,10-диметил-4,13-ди(2-пропил)-19,22,26,30,31-пентаоксагенацикло [23,3,2,2<sup>16</sup>O<sup>5,28</sup>O<sup>9,18</sup>O<sup>12,17</sup>] дотриактанта 1,3,5(28),6,6(27),9(18),10,12(17),13,15-декаена; препарат предоставлен Институтом химии и физики полимеров Академии наук РУ.

**Олигонуклеотидные ПЦР-праймеры.** Использовали готовые структуры олигонуклеотидных праймеров, ранее рассчитанные в программе Primer 3 Blast NCBI GB и апробированные к исследованным видам мРНК: *P53 (TP53)* [17], *NF- $\kappa$ B* [18], *IFN- $\alpha$ 2* [19], *IFN- $\beta$ 1*, *IFN- $\lambda$ 1*, *ISG15* [20], глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (*GAPDH*) [21]. Синтез олигонуклеотидов осуществлён фирмой «Синтол» (Россия).

**Постановка опытов на клеточных линиях Namalva и РЗНР1 с препаратом ЦА.** Клетки высевали в культуральные флаконы (25 см<sup>3</sup>) в концентрации 1,5 млн/мл, обрабатывали ЦА в конечной концентрации 0,05, 0,5 и 5 мг/мл и инкубировали в течение 24 ч при 37 ± 2 °C (CO<sub>2</sub> 5,0 ± 0,5 %; влажность 70 ± 5 %). Через 24 ч клетки центрифугировали 5 мин при 1500 об/мин и осадок обрабатывали лизирующим буфером.

**Выделение РНК.** Суммарную РНК выделяли с помощью готового набора для выделения РНК «РНК-экстракт» («Синтол», Россия).

**Реакция обратной транскрипции (ОТ).** Реакцию ставили с помощью готового набора для проведения ОТ («Синтол», Россия) с универсальным праймером random 6 согласно прилагаемой инструкции. Полученные кДНК хранили при -70 °C.

Обратную транскрипцию и полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) проводили на амплификаторе CFX-96 с готовой двукратной смесью SsoAdvanced SYBR Green Supermix (Bio-Rad, США) в микропробирках с оптически проницаемыми крышками на 0,2 мл (SSI, США). В ПЦР-боксе смешивали 2 мкл специфических пар праймеров (прямой и обратный) с 3 мкл кДНК (разведённой в 3 раза) и 5 мкл 2-кратной смеси SsoAdvanced SYBR Green Supermix. Каждую пробу исследовали в 2–3 повторах. Программа ПЦР: 96 °С – 2 мин (1 цикл), далее 50–55 циклов 94 °С – 10 с, 55–60 °С – 20 с, 72 °С – 30 с. Программа плавления в конечной точке 65–95 °С, шаг 0,5 °С – 10 с. На экране компьютера (в реальном времени) регистрировали уровни флуоресценции, интеркалирующего в ДНК красителя SYBR Green, в виде кривых накопления ДНК-амплификатов. Количество оценивали по пороговым циклам (Cq) начала логарифмической фазы синтеза. Негативный контроль (проба, не содержащая кДНК) не давал специфических ПЦР-продуктов. Обработка данных амплификации выполнена в программе CFX Manager Software «Gene expression analysis» (Bio-Rad, США) в автоматическом режиме. Определены стандартные отклонения величин  $Cq \pm SD$  логарифмической фазы и изменения уровней в опытных пробах ( $\Delta Cq \pm SD$ ). Ген «домашнего хозяйства» *GAPDH* был использован как стабильный референс-нормализатор генной экспрессии. Изменения генной активности ( $2^{\Delta\Delta Cq}$ ) оценивали относительно контроля, принятого равным 1. Специфичность ДНК-продуктов устанавливали по Т-плавления.

Кинетический анализ динамики продукции АФК клетками в ответ на обработку препаратами проводили хемилюминесцентным методом [22] в присутствии люминола (конечное разведение в реакции  $5,6 \cdot 10^{-4}$  М), модифицированным и адаптированным под исследования с конкретными тест-клетками и препаратом ЦА. Постановку реакции проводили в 96 луночных планшетах в объеме 200 мкл/лунку. В каждом постановочном варианте проводили не менее 3 повторов, из которых рассчитывали средний показатель. Учитывали результаты реакции на приборе Synergy H1 (BioTek, США). При измерении отмечали максимальные показатели интенсивности свечения (спонтанной и в присутствии препарата ЦА) (I), а также площадь (S) под кривой динамики свечения за период наблюдения. Для определения интенсивности продукции АФК в каждом временном периоде определяли индекс активации в соответствии с формулой  $I \text{ опыт./I спон.}$  или  $S \text{ опыт./S спон.}$ . Значение индекса активации, равное 1, представляет точку отсчёта для определения стимуляции ( $>1$ ) или подавления ( $<1$ ) продукции АФК клетками.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel.

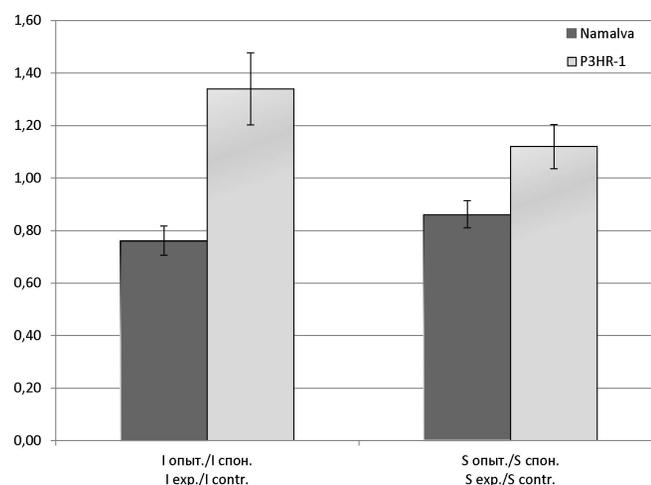
## Результаты

**Продукция АФК.** При обработке клеток препаратом ЦА в клетках Namalva обнаружено снижение индек-

са активации АФК, при этом в клетках P3HR-1, наоборот, наблюдали его увеличение ( $I \text{ опыт./I спон.} - 0,76 \pm 0,043$  для Namalva и  $1,30 \pm 0,109$  для P3HR-1,  $p < 0,001$ ;  $S \text{ опыт./S спон.} - 0,86 \pm 0,053$  для Namalva и  $1,12 \pm 0,084$  для P3HR-1,  $p < 0,01$ ) (рис. 1).

Исходя из полученных данных был сделан вывод о выраженной разнонаправленности ЦА-индуцируемой генерации АФК в клетках линий Namalva и P3HR-1.

**Экспрессия генов цитокинов (ОТ-ПЦР-РВ).** В клетках Namalva через 24 ч обработки ЦА не обнаруживается достоверной активации генов *IFN- $\alpha$ 2*, *- $\beta$ 1*, *- $\lambda$ 1*. При этом возрастает кратность экспрессии *ISG15* более чем в 1200 раз, гена *P53 (TP53)* – в 4,5 раза, *NF- $\kappa$ B* – в 3,2 раза. В то же время при обработке ЦА клеток P3HR-1 активность генов *IFN- $\alpha$ 2* возросла более чем в 200 раз и *IFN- $\lambda$ 1* – в 100 раз, а экспрессия гена *ISG15* возросла только в 2,2 раза. Достоверной активации генов *P53 (TP53)* и *IFN- $\beta$ 1* не обнаружено. На рис. 2 (а, б) представлены данные, показывающие кратность стимуляции генов, нормализованных по гену *GAPDH*, которые свидетельствуют об уровне генной экспрессии при действии препарата ЦА в точных линиях Namalva и P3HR-1.



**Рис. 1.** Продукция активных форм кислорода клетками Namalva и P3HR-1 в ответ на обработку препаратом ЦелАгрип.

По оси ординат – индекс активации; по оси абсцисс – гистограмма интенсивности продукции АФК. При измерении учитывали максимальные показатели интенсивности свечения (I), а также площадь (S) под кривой динамики свечения за период наблюдения. Для определения интенсивности продукции АФК определяли индекс активации в соответствии с формулой  $I \text{ опыт./I спон.}$  и  $S \text{ опыт./S спон.}$

**Fig. 1.** Production of reactive oxygen species (ROS) by Namalva and P3HR-1 cells in response to treatment with CelAgrip.

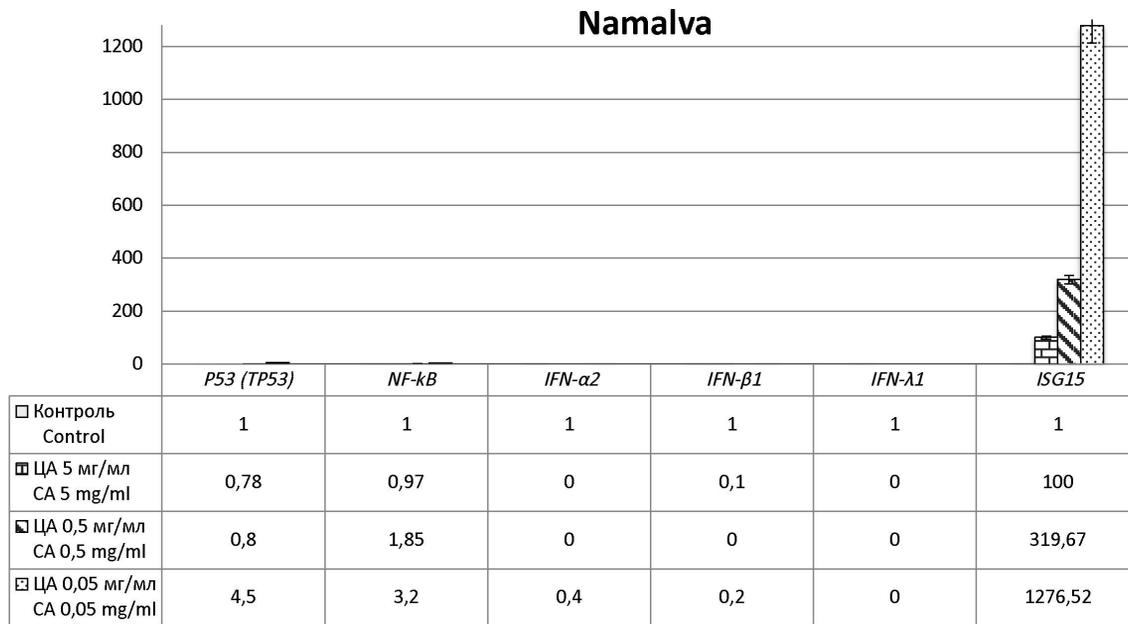
Along the ordinate axis – the value of the activation index; on the abscissa axis is a histogram of the ROS production intensity; during the measurement, the maximum indicators of the luminescence intensity (I), as well as the area (S) under the luminescence dynamics curve for the observation period were taken into account. In order to determine the intensity of ROS production, the activation index was determined in accordance with the formula  $I \text{ exp./I contr.}$  or  $S \text{ exp./S contr.}$

**Обсуждение**

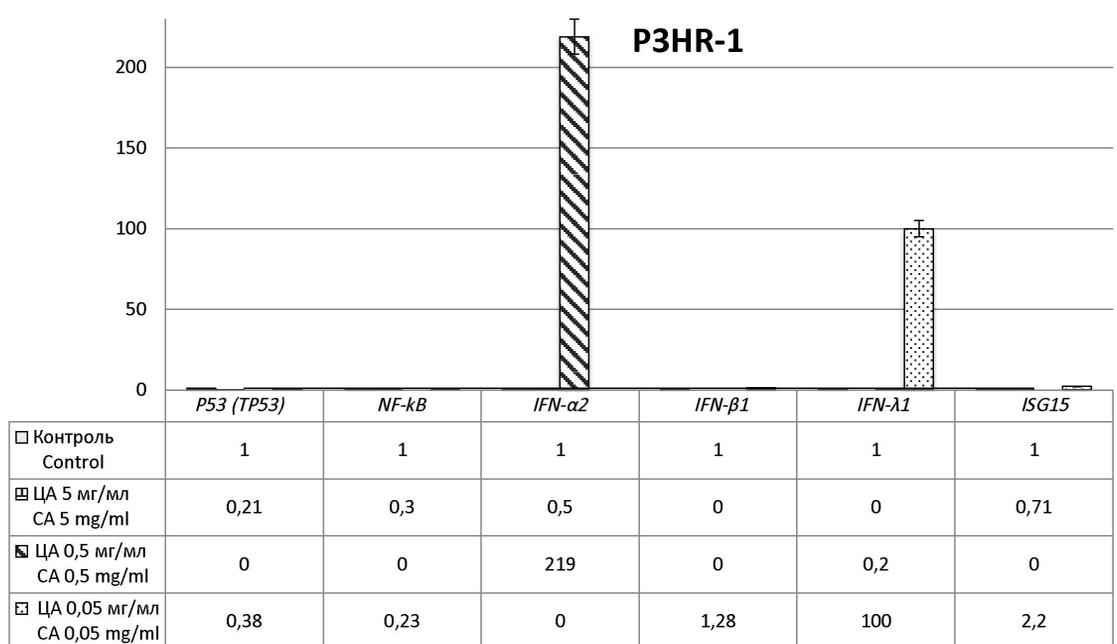
В настоящем исследовании для количественного изучения генной активности были выбраны такие ключевые цитокины, как *IFN-α*, *-β*, *-λ*, и сигнальные молекулы *NF-κB*, *P53*, *ISG15*. Их активность при индукции препаратом ЦА значительно изменялась. Мы наблюдали активацию генов *IFN-α2* и *IFN-λ1*

в культуре клеток P3HR-1, в которых определялась продукция антигенов ВЭБ. В то же время при аналогичной обработке в культуре клеток Namalva, в которой не определялась продукция антигенов ВЭБ, не выявлено увеличения активности генов *IFN* при обработке ЦА, но обнаружен прирост генной активности *P53* (*TP53*), *NF-κB* и *ISG15*. Таким образом,

*a*



*б*



**Рис. 2.** Действие препарата ЦелАгрип на экспрессию генов в клеточных линиях Namalva (а) и P3HR-1 (б).

По оси ординат показана кратность стимуляции генов, нормализованных по гену *GAPDH*.

По оси абсцисс – гены интерферонов (*IFN*) и сигнальных молекул. Конечная концентрация препарата указана в дозах 5; 0,5 и 0,05 мг/мл. ЦА – ЦелАгрип.

**Fig. 2.** The effect of the CelAgridp on gene expression in the Namalva (a) and P3HR-1 (b) cell lines.

Along the ordinate axis – the multiplicity of stimulation of genes normalized by the *GAPDH* gene. The abscissa axis shows the interferon (*IFN*) genes and the signal molecule genes. The final concentration of the drug is indicated in doses of 5; 0.5, and 0.05 mg/ml. CA – CelAgridp.

анализируя полученные данные, можно говорить о разнонаправленной стимуляции ЦА генов врождённого иммунитета в зависимости от способности клеток продуцировать антигены ВЭБ.

Известно, что P53 является транскрипционным фактором, его активация может вызвать остановку клеточного цикла и репликации ДНК. В конечном счёте это приводит к запуску апоптоза [23]. Относительно взаимодействия NF-κB и P53 известно, что транскрипционный фактор NF-κB влияет на регуляцию апоптоза, подавляя или способствуя индукции апоптоза под действием P53 [24]. Помимо этого NF-κB также участвует в контроле большой группы генов, которые управляют процессами воспаления и пролиферации клеток. Например, сигнальный путь NF-κB контролирует созревание В-лимфоцитов. Кроме того известно, что гиперактивация сигнального пути NF-κB происходит в ряде типов злокачественных опухолей и характерна для диффузной В-крупноклеточной лимфомы [25].

При вирусной инфекции патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMPs) распознаются паттерн-распознающими рецепторами (PRRs) инфицированной клетки, что стимулирует врождённый противовирусный иммунный ответ. Этот ответ приводит к продукции и выделению различных цитокинов, включая IL, фактор некроза опухолей и IFN из заражённых клеток. Ответ IFN I типа является одним из жизненно важных противовирусных защитных механизмов клеток-хозяев. Активация PRRs PAMPs запускает не только JAK-STAT-опосредованный ответ IFN, но и различные ветви врождённой иммунной сигнализации, включая путь NF-κB, активацию воспаления [26], и запрограммированную гибель клеток (апоптоз, некроптоз и пироптоз) [27]. В клетках противовирусная активность IFN осуществляется через сигнализацию JAK-STAT. IFN I и III типа через свои специфические рецепторы активируют пути JAK-STAT и через IFN-стимулированные элементы (ISREs) индуцируют транскрипцию IFN-стимулированных генов (*ISGs*), таких как *MX-A*, *ISG15*, *ISG56* и *OAS1* [28]. ВЭБ противодействует не только продукции IFN, но и его действию. Некоторые из путей активации генов врождённого иммунитета нарушены и в изучаемых нами лимфобластоидных клетках Namalva и P3HR-1. Поскольку IFN I типа может подавлять репликацию герпесвирусов в инфицированных клетках, нарушение проведения IFN-сигналов с помощью ВЭБ обычно рассматривается как провирусный адаптивный механизм обеспечения успешной инфекции и других преимуществ для вируса [29]. По-видимому, препарат ЦА может противодействовать опосредованному ВЭБ нарушению проведения IFN-сигналов, запуская различные пути активации генов в тех или иных клетках; например, стимулируя активность генов *IFN-α2* и *IFN-λ1* в клетках Namalva или генов *NF-κB*, P53 (*TP53*), *ISG15* в клетках P3HR-1.

Ранее было показано, что одним из наиболее высокоиндуцированных генов в сигнальном каскаде IFN I типа является *ISG15*, который кодирует небольшой убиквитин-подобный белок, участвующий в процес-

се посттрансляционной модификации, называемом ISGylation. Благодаря этому процессу, ISG15 ковалентно связывается с широким спектром целевых белков, включая NF-κB, JNK и IRF-3, которые ассоциированы с центральными иммунными путями проведения сигналов [30]. Известно, что ISG15 существует и в свободной форме и действует как внутри, так и вне клеток. Данные *in vitro* и *in vivo* подтверждают его различную роль в клеточных процессах: в онкогенезе, защите от вирусных инфекций, активации иммунных клеток (лимфоцитов, моноцитов и NK-клеток) [31]. Возрастание активности гена *ISG15* более чем в 1200 раз в клетках Namalva при индукции препаратом ЦА требует более пристального изучения этого феномена. Известно также, что митохондрию являются мишенями ISG15 и ISGylation в макрофагах, полученных из костного мозга мышей. ISG15 и ISGylation участвуют в регулировании митохондриального метаболизма. Отсутствие ISG15 приводит к изменениям в окислительном фосфорилировании и, как следствие, к более низкой скорости потребления кислорода и производства АТФ. Такое нарушение механизмов окислительного фосфорилирования уменьшает продукцию АФК [32].

Предпринятый нами анализ активности АФК в клетках Namalva и P3HR-1 при обработке препаратом ЦА выявил снижение индекса активации АФК в клетках Namalva, которое сопровождалось не снижением, а резким увеличением активности *ISG15* и подавлением индукции генов *IFN*. В клетках P3HR-1, наоборот, наблюдали увеличение индекса активации АФК и относительно незначительную активацию гена *ISG15* (всего лишь в 2,2 раза). При этом значительно возростала индукция генов *IFN* I и III типа. J. Wang и соавт. полагают [33], что вирусоносительство связано с повышенной уязвимостью клеток к окислительному стрессу, и доказывают, что ядерный антиген ВЭБ способствует усилению клеточной антиоксидантной защиты. В нашем случае клетки P3HR-1 в отличие от клеток Namalva характеризуются продукцией антигенов ВЭБ. Нами показано, что их обработка ЦА приводит к возрастанию интенсивности продукции АФК и, следовательно, к повышению клеточной уязвимости от окислительного стресса. В связи с этим мы предполагаем возможную роль ЦА в подавлении антиоксидантного ответа инфицированных ВЭБ клеток и перспективности использования ЦА в антиВЭБ терапии.

Известно, что экспрессия ISG15 может также индуцироваться вирусной инфекцией [34] и двухцепочечной (дц) РНК [35]. Кроме того, P53 стимулирует экспрессию ISG15 и его ферментов конъюгации [36] и необходим для оптимальной индукции ISG15 с помощью дцРНК [37]. Экспрессию ISG15 индуцирует ряд других соединений, таких как poly I:C, липополисахарид [38], фактор некроза опухолей [39], фактор роста эндотелия сосудов [40], IFN-γ [41, 42], и различные стимулы, включая повреждение ДНК, облучение [43], ишемию [44] и укорочение теломер [45]. Однако экспрессия ISG15 и его конъюгирующих ферментов

дерегулируется при многих типах рака [46–48]. Тем не менее нет единого мнения о том, оказывает этот путь проопухольевый или опухолевый супрессорный эффект [34]. Поэтому способность ЦА индуцировать *ISG15* в некоторых лимфобластоидных клетках требует дополнительного изучения и с точки зрения возможного влияния на ВЭБ-индуцированный онкогенез.

### Заключение

Полученные данные свидетельствуют о том, что исследуемые клеточные культуры Namalva и P3HR-1 по-разному отвечают на обработку препаратом ЦА – индуктором IFN. Если при обработке ЦА клеток Namalva, не продуцирующих антигены ВЭБ, наблюдается подавление генерации АФК и активация экспрессии генов *ISG15*, *P53 (TP53)* и *NF-κB*, то после обработки ЦА клеток P3HR-1, продуцирующих антигены ВЭБ, наблюдается обратная картина – активизация образования АФК, экспрессия генов *IFN-α* и *IFN-λ*, и подавление активности генов *ISG15*, *P53 (TP53)* и *NF-κB*. Мы предполагаем, что существует взаимосвязь IFN-индуцирующего действия ЦА с активностью *ISG15* и АФК в перевиваемых культурах клеток ЛБ, продуцирующих и не продуцирующих антигены ВЭБ.

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 3, 5, 6, 9-12, 15, 16, 21, 23, 25-48 см. REFERENCES)

1. Ершов Ф.И., Киселев О.И. *Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств)*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2005.
2. Ершов Ф.И., Наровлянский А.Н. *Интерфероны и индукторы интерферонов*. В кн.: Хаитов Р.М., Атауллаханов Р.И., Шульженко А.Е., ред. *Иммунотерапия: руководство для врачей*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2018: 123-47.
3. Зайцев В.Г., Закревский В.И. Методологические аспекты исследований свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. *Вестник Волгоградской медицинской академии: Сборник научных трудов*. 1998; 54(4): 49-53.
4. Донцов В.И., Крутько В.Н., Мрикаев Б.М., Уханов С.В. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении. *Труды Института системного анализа Российской академии наук*. 2006; 19: 50-69.
5. Новиков В.Е., Левченкова О.С., Пожилова Е.В. Роль активных форм кислорода в физиологии и патологии клетки и их фармакологическая регуляция. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2014; 12(4): 13-21.
6. Атаханов А.А., Сарымсаков А.А., Рашидова С.Ш. *Наносистемы целлюлозы и серебра: синтез, структура и свойства*. Ташкент; 2016.
7. Наровлянский А.Н., Мезенцева М.В., Суетина И.А., Руссу Л.И., Иванова А.М., Полосков В.В. и др. Цитокин-регулирующая активность противовирусного препарата Целагripp в перевиваемых В-клеточных линиях лимфомы Беркитта. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(4): 165-72. DOI: <http://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-165-172>
8. Шувалов А.Н., Соколова Т.М., Шаповал И.М., Ершов Ф.И. Модуляция транскрипции клеточных генов препаратом иммуномакс: активация генов интерферонов и интерлейкинов. *Иммунология*. 2014; 35(1): 16-20.
9. 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; 14(2): 26-34.
10. Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Колодяжная Л.В., Оспельникова Т.П., Ершов Ф.И. Механизмы действия препарата «Кагоцел» в клетках человека. Сообщение 1. Регуляция транскрипции генов системы интерферона и апоптоза. В кн.: Ершов Ф.И., Наровлянский А.Н., ред. *Интерферон – 2011*. М.; 2012: 389-401.
11. 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 htc116: регуляция рекомбинантными интерферонами альфа2 из бактериальных и растительных продуцентов. *Российский биотерапевтический журнал*. 2013; 12(3): 39-44.
12. Измайлов Д.Ю., Владимиров Г.К. Хемилюминесценция как метод изучения свободных радикалов, глава 8. В кн.: Владимиров Ю.А., ред. *Источники и мишени свободных радикалов в крови человека*. М.: МАКС Пресс; 2017: 273-97.
13. Чумаков П.М. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме. *Успехи биологической химии*. 2007; 47(1): 3-52.

### REFERENCES

1. Ershov F.I., Kiselev O.I. *Interferons and Their Inductors (From Molecules to Drugs) [Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств)]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2005. (in Russian)
2. Ershov F.I., Narovlyanskiy A.N. Interferons and inducers of interferons. In: Khaitov R.M., Ataulakhanov R.I., Shul'zhenko A.E., eds. *Immunotherapy: A Guide for Doctors [Иммунотерапия: руководство для врачей]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2018: 123-47. (in Russian)
3. Segal A.W. How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.* 2005; 23: 197-223. DOI: <http://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653>
4. Zaytsev V.G., Zakrevskiy V.I. Methodological aspects of study of the free radical oxidation and the body antioxidant system. *Vestnik Volgogradskoy meditsinskoy akademii: Sbornik nauchnykh trudov*. 1998; 54(4): 49-53. (in Russian)
5. Cross A.R., Jones O.T.G. Enzymic mechanism of superoxide production. *Biochem. Biophys. Acta*. 1991; 1057(3): 281-98. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0005-2728\(05\)80140-9](http://doi.org/10.1016/S0005-2728(05)80140-9)
6. Sandhu S.K., Kaur G. Mitochondrial electron transport chain complexes in aging rat brain and lymphocytes. *Biogerontol.* 2003; 4(1): 19-29. DOI: <http://doi.org/10.1023/a:1022473219044>
7. Dontsov V.I., Krut'ko V.N., Mrikaev B.M., Ukhanov S.V. Active forms of oxygen as a system: significance in physiology, pathology and natural aging. *Trudy Instituta sistemnogo analiza Rossiyskoy akademii nauk*. 2006; 19: 50-69. (in Russian)
8. Novikov V.E., Levchenkova O.S., Pozhilova E.V. Role of reactive oxygen species in cell physiology and pathology and their pharmacological regulation. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii*. 2014; 12(4): 13-21. (in Russian)
9. Jha H.C., Pei Y., Robertson E.S. Epstein-Barr virus: Diseases linked to infection and transformation. *Front. Microbiol.* 2016; 7: 1602. DOI: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01602>
10. Ascherio A., Munger K.L. EBV and autoimmunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2015; 390(Pt. 1): 365-85. DOI: [http://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8\\_15](http://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8_15)
11. Jangra S., Yuen K.S., Botelgo M.G., Jin D.Y. Epstein-Barr virus and innate immunity: Friends or foes? *Microorganisms*. 2019; 7(6): pii E183. DOI: <http://doi.org/10.3390/microorganisms7060183>
12. Hussain T., Mulherkar R. Lymphoblastoid cell lines: a continuous in vitro source of cells to study carcinogen sensitivity and DNA repair. *Int. J. Mol. Cell Med.* 2012; 1(2): 75-87.
13. Atakhanov A.A., Sarymsakov A.A., Rashidova S.Sh. *Nanosystems of Cellulose and Silver: Synthesis, Structure and Properties [Наносистемы целлюлозы и серебра: синтез, структура и свойства]*. Tashkent; 2016. (in Russian)
14. Narovlyanskiy A.N., Mezentseva M.V., Suetina I.A., Russu L.I., Ivanova A.M., Poloskov V.V., et al. Cytokine-regulating activity of anti-virus preparation Celagripp in Burkitt's lymphoma stable B-cell lines. *Voprosy virusologii*. 2019; 64(4): 165-72. DOI: <http://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-165-172> (in Russian)
15. Hinuma Y., Konn M., Yamaguchi J., Grace J.T. Replication of herpes-type virus in a Burkitt lymphoma cell line. *J. Virol.* 1967; 1(6): 1045-51.
16. Klein E., Klein G., Nadkarni J.S., Nadkarni J.J., Wigzell H., Clifford P. Surface IgM kappa specificity on a Burkitt lymphoma cell in vivo and in derived cultured lines. *Cancer Res.* 1968; 28(7): 1300-10.
17. Shuvalov A.N., Sokolova T.M., Shapoval I.M., Ershov F.I. Modulation of cellular gene transcription by drug “immunomax”:

- activation of interferon and interleukine genes. *Immunologiya*. 2014; 35(1): 16-20. (in Russian)
18. 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*. 2015; 14(2): 26-34. (in Russian)
  19. Sokolova T.M., Shuvalov A.N., Kolodyazhnaya L.V., Ospel'nikova T.P., Ershov F.I. 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 F.I., Narovlyanskiy A.N., eds. *Interferon – 2011 [Interferon – 2011]*. Moscow; 2012: 389-401. (in Russian)
  20. Sokolova T.M., Kosobokova E.N., Shuvalov A.N., Shapoval I.M., Kosorukov V.S., Ershov F.I. Interferon system gene activity in colon adenocarcinoma cells HCT-116: Regulation by interferon-alpha-2B from bacteria or plants. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal*. 2013; 12(3): 39-44. (in Russian)
  21. Li L.D., Sun H.F., Liu X.X., Gao S.P., Jiang H.L., Hu X., et al. Down-regulation of NDUFB9 promotes breast cancer cell proliferation, metastasis by mediating mitochondrial metabolism. *PLoS One*. 2015; 10(12): e0144441. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0144441>
  22. Izmaylov D.Yu., Vladimirov G.K. Chapter 8. Chemiluminescence as a method of studying free radicals. In: Vladimirov Yu.A., ed. *Sources and Targets of Free Radicals in Human Blood [Istochniki i misheni svobodnykh radikalov v krovi cheloveka]*. Moscow: MAKSS Press; 2017: 273-97. (in Russian)
  23. Toufektchan E., Toledo F. The Guardian of the genome revisited: P53 downregulates genes required for telomere maintenance, DNA repair, and centromere structure. *Cancers (Basel)*. 2018; 10(5): pii E135. DOI: <http://doi.org/10.3390/cancers10050135>
  24. Chumakov P.M. The p53 protein and its universal functions in a multicellular organism. *Uspekhi biologicheskoy khimii*. 2007; 47(1): 3-52. (in Russian)
  25. Davis R.E., Brown K.D., Siebenlist U., Staudt L.M. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J. Exp. Med.* 2001; 194(12): 1861-74. DOI: <http://doi.org/10.1084/jem.194.12.1861>
  26. Stephenson H.N., Herzig A., Zychlinsky A. Beyond the grave: When is cell death critical for immunity to infection? *Curr. Opin. Immunol.* 2016; 38: 59-66. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.coi.2015.11.004>
  27. Jorgensen I., Rayamajhi M., Miao E.A. Programmed cell death as a defence against infection. *Nat. Rev. Immunol.* 2017; 17(3): 151-64. DOI: <http://doi.org/10.1038/nri.2016.147>
  28. Der S.D., Zhou A., Williams B.R., Silverman R.H. Identification of genes differentially regulated by interferon  $\alpha$ ,  $\beta$ , or  $\gamma$  using oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998; 95(26): 15623-8. DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15623>
  29. Chang J., Renne R., Dittmer D., Ganem D. Inflammatory cytokines and the reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic replication. *Virology*. 2000; 266(1): 17-25. DOI: <http://doi.org/10.1006/viro.1999.0077>
  30. Zhang D., Zhang D.E. Interferon-stimulated gene 15 and the protein ISGylation system. *J. Interferon Cytokine Res.* 2011; 31(1): 119-30. DOI: <http://doi.org/10.1089/jir.2010.0110>
  31. Dos Santos P.F., Mansur D.S. Beyond ISGylation: Functions of free intracellular and extracellular ISG15. *J. Interferon Cytokine Res.* 2017; 37(6): 246-53. DOI: <http://doi.org/10.1089/jir.2016.0103>
  32. Albert M., Bécares M., Falqui M., Fernández-Lozano C., Guerra S. ISG15, a small molecule with huge implications: regulation of mitochondrial homeostasis. *Viruses*. 2018; 10(11): pii E629. DOI: <http://doi.org/10.3390/v10110629>
  33. Wang J., Nagy N., Masucci M.G. The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 upregulates the cellular antioxidant defense to enable B-cell growth transformation and immortalization. *Oncogene*. 2020; 39(3): 603-6. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41388-019-1003-3>
  34. Villarroya-Beltri C., Guerra S., Sánchez-Madri F. ISGylation – a key to lock the cell gates for preventing the spread of threats. *J. Cell Sci.* 2017; 130(18): 2961-9. DOI: <http://doi.org/10.1242/jcs.205468>
  35. Sen G.C., Sarkar S.N. The interferon-stimulated genes: targets of direct signaling by interferons, double-stranded RNA, and viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2007; 316: 233-50. DOI: [http://doi.org/10.1007/978-3-540-71329-6\\_12](http://doi.org/10.1007/978-3-540-71329-6_12)
  36. Park J.H., Yang S.W., Park J.M., Ka S.H., Kim J.H., Kong Y.Y., et al. Positive feedback regulation of p53 transactivity by DNA damage-induced ISG15 modification. *Nat. Commun.* 2016; 7: 12513. DOI: <http://doi.org/10.1038/ncomms12513>
  37. Hummer B.T., Li X.L., Hassel B.A. Role for p53 in gene induction by double-stranded RNA. *J. Virol.* 2001; 75(16): 7774-7. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.75.16.7774-7777.2001>
  38. Liu C., Chang R., Yao X., Qiao W.T., Geng Y.Q. ISG15 expression in response to double-stranded RNA or LPS in cultured fetal bovine lung (FBL) cells. *Vet. Res. Commun.* 2009; 33(7): 723-33. DOI: <http://doi.org/10.1007/s11259-009-9221-8>
  39. Chairatvit K., Wongnoppavich A., Choonate S. Up-regulation of interferon-stimulated gene15 and its conjugates by tumor necrosis factor-alpha via type I interferon-dependent and -independent pathways. *Mol. Cell. Biochem.* 2012; 368(1-2): 195-201. DOI: <http://doi.org/10.1007/s11010-012-1360-5>
  40. Liu F., Gao X., Wang J., Gao C., Li X., Li X., et al. Transcriptome sequencing to identify transcription factor regulatory network and alternative splicing in endothelial cells under VEGF stimulation. *J. Mol. Neurosci.* 2016; 58(2): 170-7. DOI: <http://doi.org/10.1007/s12031-015-0653-z>
  41. Doyle S.E., Vaidya S.A., O'Connell R., Dadgostar H., Dempsey P.W., Wu T.T., et al. IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity*. 2002; 17(3): 251-63. DOI: [http://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00390-4](http://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00390-4)
  42. Taylor J.L., D'Cunha J., Tom P., O'Brien W.J., Borden E.C. Production of ISG-15, an interferon-inducible protein, in human corneal cells. *J. Interferon Cytokine Res.* 1996; 16(11): 937-40. DOI: <http://doi.org/10.1089/jir.1996.16.937>
  43. Park J.H., Yang S.W., Park J.M., Ka S.H., Kim J.H., Kong Y.Y., et al. Positive feedback regulation of p53 transactivity by DNA damage-induced ISG15 modification. *Nat. Commun.* 2016; 7: 12513. DOI: <http://doi.org/10.1038/ncomms12513>
  44. Nakka V.P., Lang B.T., Lenschow D.J., Zhang D.E., Dempsey R.J., Vemuganti R. Increased cerebral protein ISGylation after focal ischemia is neuroprotective. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2011; 31(12): 2375-84. DOI: <http://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.103>
  45. Lou Z., Wei J., Riethman H., Baur J.A., Voglauer R., Shay J.W., et al. Telomere length regulates ISG15 expression in human cells. *Aging (Albany NY)*. 2009; 1(7): 608-21. DOI: <http://doi.org/10.18632/aging.100066>
  46. Kiessling A., Hogrefe C., Erb S., Bobach C., Fuessel S., Wessjohann L., et al. Expression, regulation and function of the ISGylation system in prostate cancer. *Oncogene*. 2009; 28(28): 2606-20. DOI: <http://doi.org/10.1038/onc.2009.115>
  47. Li C., Wang J., Zhang H., Zhu M., Chen F., Hu Y., et al. Interferon-stimulated gene 15 (ISG15) is a trigger for tumorigenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2014; 5(18): 8429-41. DOI: <http://doi.org/10.18632/oncotarget.2316>
  48. Wood L.M., Pan Z.K., Seavey M.M., Muthukumar G., Paterson Y. The ubiquitin-like protein, ISG15, is a novel tumor-associated antigen for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 2012; 61(5): 689-700. DOI: <http://doi.org/10.1007/s00262-011-1129-9>