

Интерферон-регулирующая активность противовирусного лекарственного средства *целагрип* и его влияние на экспрессию генов врожденного иммунитета и образование активных форм кислорода у больных фолликулярной лимфомой

Наровлянский А.Н.¹, Полосков В.В.¹, Иванова А.М.¹, Кравченко С.К.², Бабаева Ф.Э.², Сычевская К.А.², Мезенцева М.В.¹, Суетина И.А.¹, Руссу Л.И.¹, Измestьева А.В.¹, Оспельникова Т.П.¹, Сарымсаков А.А.³, Ершов Ф.И.¹

¹ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, 125167, Москва, Россия;

³Институт химии и физики полимеров Академии наук Республики Узбекистан, 100128, Ташкент, Узбекистан

Введение. Лекарственные средства из группы индукторов интерферона (IFN) «включают» синтез интерферонов 1-го типа (IFN-I) и индуцируют экспрессию IFN-стимулированных генов (ISG), которые регулируют реакции врожденного иммунитета и защищают хозяина от инфекционных агентов и опухолевой патологии. **Цель** исследования – определить роль лекарственного средства (ЛС) *целагрип* (ЦА) в активации генов врожденного иммунитета и влиянии на продукцию активных форм кислорода у больных фолликулярной лимфомой (ФЛ). **Задачи:** изучить интенсивность продукции активных форм кислорода (АФК) и уровень экспрессии генов *IFN-α2*, *IFN-λ1*, *ISG15*, *BCL2*, *P53(TP53)* и *USP18* в ответ на обработку ЦА клеток крови больных ФЛ.

Материал и методы. В исследовании участвовали первичные онкологические пациенты с диагнозом ФЛ и здоровые добровольцы, у которых выполнен кинетический анализ динамики продукции АФК клетками крови и определена экспрессия группы генов методом полимеразной цепной реакции в реальном времени в ответ на обработку ЦА.

Результаты и обсуждение. Выявлено статистически достоверное снижение продукции АФК клетками крови больных ФЛ и здоровых добровольцев в присутствии ЦА ($P < 0,05$). Кратность стимуляции генов *ISG15*, *P53(TP53)* и *USP18* в группе больных ФЛ значительно превышала таковую в группе здоровых добровольцев. При обработке ЦА клеток крови становится возможным разделить больных ФЛ на группы с положительным и отрицательным ответом в соответствии с уровнем экспрессии гена *USP18*.

Выводы. ЦА снижает продукцию АФК и одновременно стимулирует активность генов врожденного иммунитета *ISG15*, *P53(TP53)* и *USP18* в клетках крови больных ФЛ.

Ключевые слова: индуктор интерферона; фолликулярная лимфома; активные формы кислорода; экспрессия генов; интерферон-стимулированные гены.

Для цитирования: Наровлянский А.Н., Полосков В.В., Иванова А.М., Кравченко С.К., Бабаева Ф.Э., Сычевская К.А., Мезенцева М.В., Суетина И.А., Руссу Л.И., Измestьева А.В., Оспельникова Т.П., Сарымсаков А.А., Ершов Ф.И. Интерферон-регулирующая активность противовирусного лекарственного средства *целагрип* и его влияние на экспрессию генов врожденного иммунитета и образование активных форм кислорода у больных фолликулярной лимфомой. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(5): 284-293.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-5-5>

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

Участие авторов: Наровлянский А.Н., Ершов Ф.И., Кравченко С.К., Иванова А.М., Сарымсаков А.А. – формулировка идеи, цели, задач, анализ литературы и экспериментальных данных, обсуждение, написание и оформление; Кравченко С.К., Бабаева Ф.Э., Сычевская К.А. – осуществление клинической части исследований; Полосков В.В., Иванова А.М., Мезенцева М.В., Оспельникова Т.П., Руссу Л.И., Измestьева А.В., Суетина И.А. – экспериментальная работа, статистическая обработка, оформление.

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.

Поступила 28.08.2020

Принята в печать 01.09.2020

Interferon-regulating activity of the *celagrip* antiviral drug and its influence on formation of reactive oxygen species and expression of innate immunity genes in the follicular lymphoma patients

Alexander N. Narovlyansky¹, Vladislav V. Poloskov¹, Alla M. Ivanova¹, Sergej K. Kravchenko², Fatima E. Babayeva², Kseniya A. Sychevskaya², Marina V. Mezentseva¹, Irina A. Suetina¹, Leonid I. Russu¹, Anna V. Izmet's'eva¹, Tatiana P. Ospelnikova¹, Abdushukur A. Sarymsakov³, Feliks I. Ershov¹

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

²National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russia;

³Institute of Polymer Chemistry and Physics, Tashkent, 100128, Uzbekistan

Introduction. Medicines from the group of interferon inducers (IFNs) "switch on" the synthesis of type 1 interferons (IFN-I) and induce the expression of IFN-stimulated genes (ISGs) that regulate innate immunity reactions and protect the host from infectious agents and the tumour pathology.

The **purpose** of the study was to determine the role of the drug *celagrip* (CA) in the activation of innate immunity genes and the effect on the production of reactive oxygen species (ROS) in patients with follicular lymphoma (FL). Objectives: to study the intensity of ROS production and the level of expression of the *IFN-α2*, *IFN-λ1*, *ISG15*, *BCL2*, *P53(TP53)* and *USP18* genes in response to the treatment of blood cells of patients with FL with the preparation of CA.

Material and methods. The study involved primary cancer patients diagnosed with follicular lymphoma (FL) and healthy volunteers. A kinetic analysis of the dynamics of production of reactive oxygen species (ROS) was performed in whose blood cells, and the expression of the group of genes was determined by real-time PCR in response to CA processing.

Results and discussion. ROS production by blood cells of patients with FL and volunteers in the presence of CA significantly decreased ($P < 0.05$). The level of gene expression of *ISG15*, *P53(TP53)* and *USP18* in the group of patients with FL was significantly higher than that in the group of volunteers. When treating blood cells with CA, it becomes possible to divide patients with FL into groups with a positive and negative response in accordance with the level of expression of the *USP18* gene. We divided FL patients into groups with a positive and negative response in accordance with the level of *USP18* gene expression after treatment of blood cells with CA.

Conclusions. The CA drug reduces the production of ROS and simultaneously stimulates the activity of the innate immunity genes *ISG15*, *P53(TP53)* and *USP18* in the blood cells of patients with FL.

Keywords: *interferon inducer; follicular lymphoma, reactive oxygen species; gene expression; interferon-stimulated genes.*

For citation: Narovlyansky A.N., Poloskov V.V., Ivanova A.M., Kravchenko S.K., Sychevskaya K.A., Babaeva F.E., Mezentseva M.V., Suetina I.A., Russu L.I., Izmet's'eva A.V., Ospelnikova T.P., Sarymsakov A.A., Ershov F.I. Interferon-regulating activity of the *celagrip* antiviral drug and its influence on formation of reactive oxygen species and expression of innate immunity genes in the follicular lymphoma patients. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2020; 65(5): 284-293. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-5-5>

For correspondence: Alexander N. Narovlyansky, DBS, 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: narovi@yandex.ru

Information about the authors:

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>

Kravchenko S.K., <https://orcid.org/0000-0002-7721-2074>

Sychevskaya K.A., <https://orcid.org/0000-0001-8053-9724>

Babaeva F.E., <https://orcid.org/0000-0002-5404-9024>

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>

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

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

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

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

Contribution: Narovlyansky A.N., Ershov F.I., Kravchenko S.K., Ivanova A.M., Sarymsakov A.A. – formulation of ideas, goals, objectives, analysis of literature and experimental data, discussion, writing and design; Kravchenko S.K., Babaeva F.E., Sychevskaya K.A. – implementation of the clinical part of research; Poloskov V.V., Ivanova A.M., Mezentseva M.V., Ospelnikova T.P., Russu L.I., Izmet's'eva A.V., Suetina I.A. – experimental work, computer data processing, design.

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.

Received 28 August 2020

Accepted 01 September 2020

Введение

Лекарственные средства (ЛС) из группы индукторов интерферона (IFN) «включают» синтез интерферонов 1-го типа (IFN-I) и вызывают экспрессию IFN-стимулированных генов (*ISG*), которые регулируют реакции врожденного иммунитета и защищают хозяина от инфекционных агентов и опухолевой патологии [1–3].

Установлено, что стимулированный IFN продукт гена 15 (*ISG15*) представляет собой убиквитин-подобный белок, который в процессе, называемом ISGylation, ковалентно связывается с целевыми белками через каскад ферментов. Кроме того, *ISG15* существует в свободной форме как внутриклеточный и как секретлируемый белок [4]. Большинство функций *ISG15* и ISGylation связаны с ответом на патоген, а также с участием в ряде ключевых клеточных процессов: трансляции белка, реорганизации цитоскелета, секреции экзосом, аутофагии, поддержании стабильности генома и предупреждении развития злокачественных новообразований [5, 6]. С функционированием *ISG15* тесно связана убиквитин-специфическая протеаза 18 (*USP18*), которая противодействует ISGylation и к тому же является критическим отрицательным регулятором IFN-ответа [7]. *USP18* индуцируется при окислительном стрессе и защищает клетки от окислительного стресс-индуцированного апоптоза, по-видимому, через регулирование P53 и каспазы 3 [8].

Активные формы кислорода (АФК) образуются в различных клеточных компартментах и играют важную роль в сигнальных путях. Избыточный уровень АФК приводит к развитию ряда патологий, в том числе злокачественных новообразований, сердечно-сосудистых, нейродегенеративных и метаболических нарушений. Окислительный стресс может способствовать возникновению опухоли, ее прогрессированию и сопротивлению терапии через повреждение ДНК, перепрограммирование клеточного метаболизма и передачу сигналов. Повышенная продукция АФК может также вызывать гибель опухолевых клеток [9].

Нами ранее было показано [10], что новое противовирусное ЛС *целагрип* [*«celagrip»* (ЦА)], которое разрешено Минздравом Республики Узбекистан (РУ) в качестве профилактического и лечебного средства при гриппе и ОРВИ [11], может регулировать экспрессию генов ряда цитокинов в клетках лимфомы Бёркитта (ЛБ) – IFN- λ , интерлейкинов (IL)-1 β , -6, -8 и -10. Также нами была обнаружена взаимосвязь IFN-индуцирующего действия ЦА с экспрессией гена *ISG15* и продукцией АФК в перевиваемых культурах клеток ЛБ, продуцирующих и не продуцирующих антигены вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) [12]. Однако исследования в вышеуказанных работах были проведены только с использованием перевиваемых линий клеток. В настоящей работе изучено действие IFN-индуцирующего ЛС ЦА на экспрессию ряда генов врожденного иммунитета и продукцию АФК в клетках крови больных фолликулярной лимфомой (ФЛ).

Цель исследования – определить роль ЦА в активации генов врожденного иммунитета и влиянии на продукцию АФК у больных ФЛ. Задачи: изучить интенсивность продукции АФК и уровень экспрессии генов *IFN- α 2*, *IFN- λ 1*, *ISG15*, *BCL2*, *P53(TP53)* и *USP18* в ответ на обработку ЦА клеток крови больных ФЛ.

Материал и методы

В исследовании принимали участие 14 первичных онкологических пациентов 32–72 лет (4 мужчины и 10 женщин), ранее не получавших лечение. Диагноз: ФЛ 1–2 цитологических типов у 9 и 3А/Б – у 5 пациентов, с обширным вовлечением в патологический процесс различных лимфоузлов, костей, костного мозга.

Параллельно была сформирована группа сравнения относительно здоровых добровольцев без онкологических заболеваний, 3 мужчины и 2 женщины 18–24 лет. У всех здоровых добровольцев и больных изучили уровень спонтанной продукции АФК и продукцию АФК в присутствии ЦА при концентрациях в реакционной смеси 0,5 и 0,05 мг/мл, а также определяли уровень экспрессии генов *IFN- α 2*, *IFN- λ 1*, *ISG15*, *BCL2*, *P53(TP53)* и *USP18*.

Взятие крови: кровь больных ФЛ и здоровых добровольцев в стерильных условиях забирали из локтевой вены утром натощак в вакуумную пробирку (V = 5 мл) с гепарином натрия для хемилюминесцентного метода и с цитратом натрия для проведения обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ). Все исследования выполняли в день забора крови.

Соблюдение этических стандартов. Всех пациентов обследовали после поступления в стационар согласно правовым аспектам оказания медицинской помощи с получением от них информированного письменного согласия. Больные проходили обследование и лечение в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России в отделении интенсивной высокодозной химиотерапии гемобластозов с круглосуточным и дневным стационарами.

Препарат. ЦА является натриевой солью сополимера (1→4)-6-0-карбоксиметил- β -D-глюкозы, (1→4)- β -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 [23,3,2,2¹⁶O^{5,28}O^{9,18}O^{12,17}] дотриактоната 1,3,5(28),6,6(27),9(18),10,12(17),13,15-декаена; препарат предоставлен Институтом химии и физики полимеров Академии наук Республики Узбекистан.

Определение уровня экспрессии генов *IFN- α 2*, *IFN- λ 1*, *ISG15*, *BCL2*, *P53(TP53)* и *USP18*. Цельную кровь больных ФЛ ($n = 14$) и добровольцев ($n = 5$) разводили в 3 раза в среде RPMI-1640 с глютамином, содержащей 10% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота и антибиотики. Разведенную кровь разливали по 1,8 мл и добавляли по 200 мкл ЦА с расчётом получения конечных концентраций 0,5 и 0,05 мг/мл, в контрольный образец добавляли 200 мкл

среды RPMI-1640. Пробы инкубировали в термостате в течение 2 ч. Затем образцы центрифугировали при 1000 об./мин 10 мин. Осадки лизировали с помощью лизирующего буфера из набора «РНК-экстран» от компании «Синтол».

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) [13], IFN- α 2, BCL2 [14], IFN- λ 1, ISG15 [15], USP18 [16], глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH) [17]. Синтез олигонуклеотидов осуществлён фирмой «Синтол» (Россия).

Выделение РНК. Суммарную РНК выделяли с помощью готового набора для выделения РНК «РНК-экстран» от компании «Синтол».

Реакция ОТ. Реакцию ставили с помощью готового набора для проведения ОТ компании «Синтол» с универсальным праймером random 6 согласно инструкции по применению. Полученные кДНК хранили при -70°C .

ОТ-ПЦР-PV проводили на амплификаторе CFX-96, как описано ранее [12]. Обработка данных амплификации выполнена в программе CFX Manager Software Gene expression analysis (Bio-Rad, США) в автоматическом режиме. Определены стандартные отклонения величин $\text{Cq} \pm \text{SD}$ логарифмической фазы и изменения уровней в опытных пробах ($\Delta\text{Cq} \pm \text{SD}$). Ген «домашнего хозяйства» GAPDH был использован как стабильный референс-нормализатор генной экспрессии. Изменения генной активности ($2\Delta\Delta\text{Cq}$) оценивали относительно контроля (контрольного образца), принятого равным 1. Специфичность ДНК-продуктов устанавливали по Т-плавления.

Кинетический анализ динамики продукции АФК клетками крови у больных ФЛ и здоровых добровольцев проводили хемилюминесцентным методом [18] в присутствии люминола (конечное разведение в реакции $5,6 \times 10^{-4}$ M). Постановку реакции проводили в 96-луночных планшетах в объеме 200 мкл/луночку. В каждом постановочном варианте проводили не менее 3 повторов, из которых рассчитывали средний показатель. Оценку спонтанной и индуцированной ЦА хемилюминесценции осуществляли в течение 90 мин при температуре 37°C на приборе Synergy H1 (BioTek, USA). При измерении учитывали максимальные показатели спонтанной и индуцированной интенсивности свечения (I), а также площадь (S) под кривой динамики свечения за период наблюдения. Для определения интенсивности продукции АФК в каждом временном периоде определяли индекс активации (activation index – AI) в соответствии с формулой: $\text{AI(I)} = I_{\text{опыт}} / I_{\text{спон}}$ или $\text{AI(S)} = S_{\text{опыт}} / S_{\text{спон}}$.

Статистическую обработку результатов проводили непараметрическим методом с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2010 (14.0.6024.10000) и статистической программы BioStat (версия 7). Различия в группах оценивали по U-критерию Манна–Уитни, а также согласно серийному критерию Вальда–Вольфовица для двух независимых выборок; $P < 0,05$.

Результаты

Продукция АФК клетками крови больных ФЛ и здоровых добровольцев.

Сравнили продукцию АФК клетками крови больных ФЛ и здоровых добровольцев по показателям I и S в присутствии ЦА в двух концентрациях (0,5 и 0,05 мг/мл). Выявили статистически достоверное снижение показателей AI(I) и AI(S) (рис. 1) у больных ФЛ по сравнению с добровольцами ($P < 0,05$).

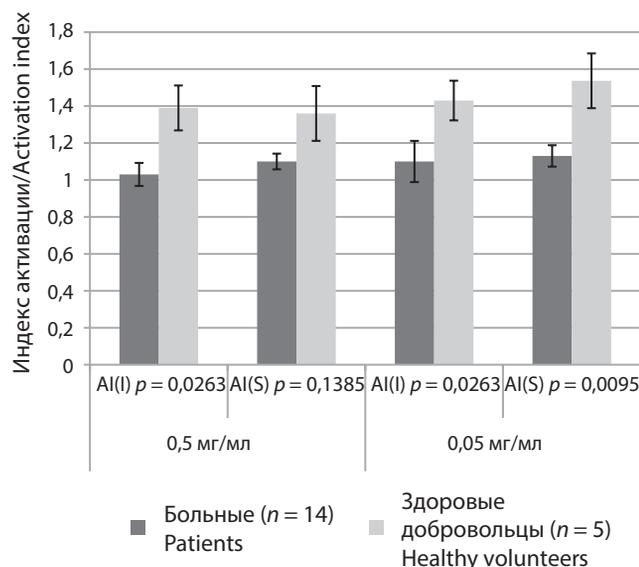


Рис. 1. Продукция АФК клетками крови больных ФЛ ($n = 14$) и здоровых добровольцев ($n = 5$) по показателям AI(I) и AI(S) в присутствии ЦА за период измерения ($t = 90$ мин). Выявлено статистически достоверное снижение AI(I) и AI(S) при обработке ЦА (0,5 и 0,05 мг/мл) клеток крови больных ФЛ по сравнению со здоровыми добровольцами ($P < 0,05$). Оценку спонтанной и индуцированной ЦА хемилюминесценции осуществляли на приборе Synergy H1 (BioTek, USA). AI определяли в соответствии с формулой $\text{AI(I)} = I_{\text{опыт}} / I_{\text{спон}}$ или $\text{AI(S)} = S_{\text{опыт}} / S_{\text{спон}}$, где I – максимальные показатели спонтанной и индуцированной интенсивности свечения; S – площадь под кривой динамики спонтанного и индуцированного свечения за период наблюдения.

По оси абсцисс – обозначение показателей и концентрации лекарственного средства *целагрип*; по оси ординат – значение индекса активации. АФК – активные формы кислорода; ФЛ – фолликулярная лимфома; AI – индекс активации; ЦА – *целагрип*.

Fig. 1. Production of ROS by blood cells of patients with FL ($n = 14$) and healthy volunteers ($n = 5$) by the indicators of AI (I) and AI (S) in the presence of the CA for the measurement period ($t = 90$ min). A statistically significant decrease in the AI (I) and AI (S) indices was revealed during the treatment with CA (0.5 and 0.05 mg/ml) of blood cells of patients with FL compared with healthy volunteers ($P < 0.05$). Evaluation of spontaneous and induced CA chemiluminescence was carried out using a Synergy H1 device (BioTek, USA). The AI was determined in accordance with the formula $\text{AI (I)} = I_{\text{expert}} / I_{\text{spon}}$ or $\text{AI (S)} = S_{\text{expert}} / S_{\text{spon}}$, where I are the maximum indices of spontaneous and induced luminescence intensity; S is the area under the curve of the dynamics of spontaneous and induced luminescence over the observation period. On X-axis – designation of indicators and concentration of the CA; on Y-axis the value of the activation index. ROS – Reactive Oxygen Species; FL – Follicular Lymphoma; AI – activation index; CA – *celastrol*.

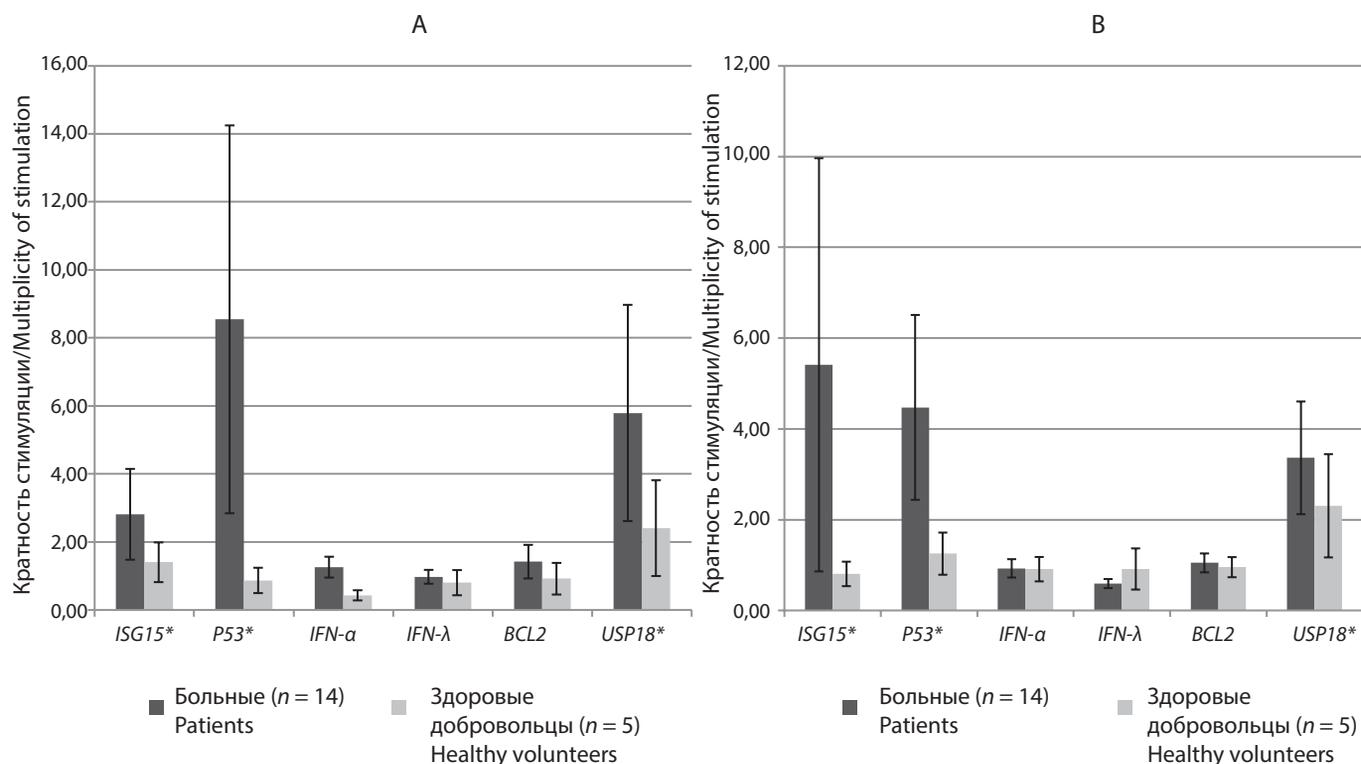


Рис. 2. Действие ЦА на экспрессию генов *IFN-α2*, *IFN-λ1*, *ISG15*, *BCL2*, *P53(TP53)* и *USP18* у больных ФЛ ($n = 14$) и здоровых добровольцев ($n = 5$). Экспрессию генов определяли с помощью ОТ-ПЦР-РВ, как описано в разделе «Материал и методы».

А. КС генов *ISG15* (КС 2,81), *P53(TP53)* (КС 8,55), *USP18* (КС 5,79) в группе больных ФЛ достоверно превышала КС генов *ISG15* (КС 1,40), *P53(TP53)* (КС 0,87), *USP18* (2,41) в группе здоровых добровольцев при обработке клеток крови ЦА в концентрации 0,5 мг/мл (* $P < 0,005$ согласно критерию серий Вальда–Вольфовица).

В. КС генов *ISG15* (КС 5,41), *P53(TP53)* (КС 4,47), *USP18* (КС 3,36) в группе больных ФЛ достоверно превышала КС генов *ISG15* (КС 0,81), *P53(TP53)* (КС 1,25), *USP18* (2,31) в группе здоровых добровольцев при обработке клеток крови ЦА в концентрации 0,05 мг/мл (* $P < 0,005$ согласно критерию серий Вальда–Вольфовица).

По оси ординат показана кратность стимуляции генов. По оси абсцисс – название генов интерферонов (IFN) и сигнальных молекул. КС генов *IFN-α2*, *BCL2*, *IFN-λ1* при обработке клеток крови ЦА как у больных ФЛ, так и у здоровых добровольцев не является значимой. ФЛ – фолликулярная лимфома; ЦА – *celagrip*; КС – кратность стимуляции; *IFN-α2* – альфа-2-интерферон; *IFN-λ1* – лямбда-1-интерферон; *ISG15* – ИФН-стимулируемый ген 15; *BCL2* – регулятор апоптоза Bcl-2 (B-cell lymphoma 2); *P53(TP53)* – ген-супрессор (TP53) опухолей; *USP18* – ген, кодирующий убиквитин-специфическую пептидазу 18; ОТ-ПЦР-РВ – обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция в режиме реального времени; *статистически достоверные значения.

Fig. 2. The effect of CA on the expression of genes *IFN-α2*, *IFN-λ1*, *ISG15*, *BCL2*, *P53(TP53)* and *USP18* in patients with FL ($n = 14$) and healthy volunteers ($n = 5$). Gene expression was determined by Real-Time qRT-PCR as described in the Material and Methods section.

A. MoS of genes *ISG15* (2.81), *P53(TP53)* (8.55), *USP18* (5.79) in the group of FL patients significantly exceeded MoS of genes *ISG15* (1.40), *P53(TP53)* (0.87), *USP18* (2.41) in a group of healthy volunteers when treating blood cells with CA at a concentration of 0.5 mg/ml (* $P < 0.005$ according to the criterion series of Wald–Wolfowitz).

B. MoS of genes *ISG15* (5.41), *P53(TP53)* (4.47), *USP18* (3.36) in the group of FL patients significantly exceeded MoS of genes *ISG15* (0.81), *P53(TP53)* (1.25), *USP18* (2.31) in a group of healthy volunteers when treating blood cells with CA at a concentration of 0.05 mg/ml (* $P < 0.005$ according to the criterion series of Wald–Wolfowitz).

Y-axis shows the multiplicity of gene stimulation. X-axis shows the names of the interferon genes and signaling molecules. FL – Follicular Lymphoma; CA – *celagrip*; MoS – Multiplicity of Stimulation; *IFN-α2* – Alfa-2-Interferon; *IFN-λ1* – Lambda-1-Interferon; *ISG15* – Interferon-stimulated gene 15; *BCL2* – apoptosis regulator (B-cell lymphoma 2); *P53(TP53)* – a tumor suppression, gene that codes for a protein that regulates the cell cycle; *USP18* – a Protein Coding gene of Ubiquitin Specific Peptidase 18; Real-Time qRT-PCR – Real-Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; *statistically reliable values.

Экспрессия группы генов интерферона и сигнальных молекул *IFN-α2*, *IFN-λ1*, *ISG15*, *BCL2*, *P53(TP53)* и *USP18*. При сравнении генной экспрессии в группах больных ФЛ и добровольцев были выявлены различные уровни стимуляции при обработке ЦА (рис. 2 А, В). Как видно на рис. 2, кратность стимуляции (КС) генов *ISG15* (КС 2,81 и 5,41), *P53(TP53)* (КС 8,55 и 4,47), *USP18* (КС 5,79 и 3,36) в группе больных ФЛ достоверно превышала КС *ISG15* (КС 1,40 и 0,81), *P53(TP53)* (КС 0,87 и 1,25), *USP18* (2,41 и 2,31) в группе здоровых добровольцев при обработке клеток крови ЦА в концен-

трации 0,5 или 0,05 мг/мл соответственно ($P < 0,005$ согласно критерию серий Вальда–Вольфовица).

При этом не обнаруживается значимой КС генов *IFN-α2*, *BCL2*, *IFN-λ1* при обработке клеток крови ЦА как у больных ФЛ, так и у здоровых добровольцев. КС генов *IFN-α2*, *BCL2*, *IFN-λ1* в ответ на действие ЦА находилась на уровне экспрессии генов в контрольной группе без обработки ЦА (то есть фактически стимуляция отсутствовала), поэтому мы считали такую КС незначимой, и данная группа генов далее не рассматривалась.

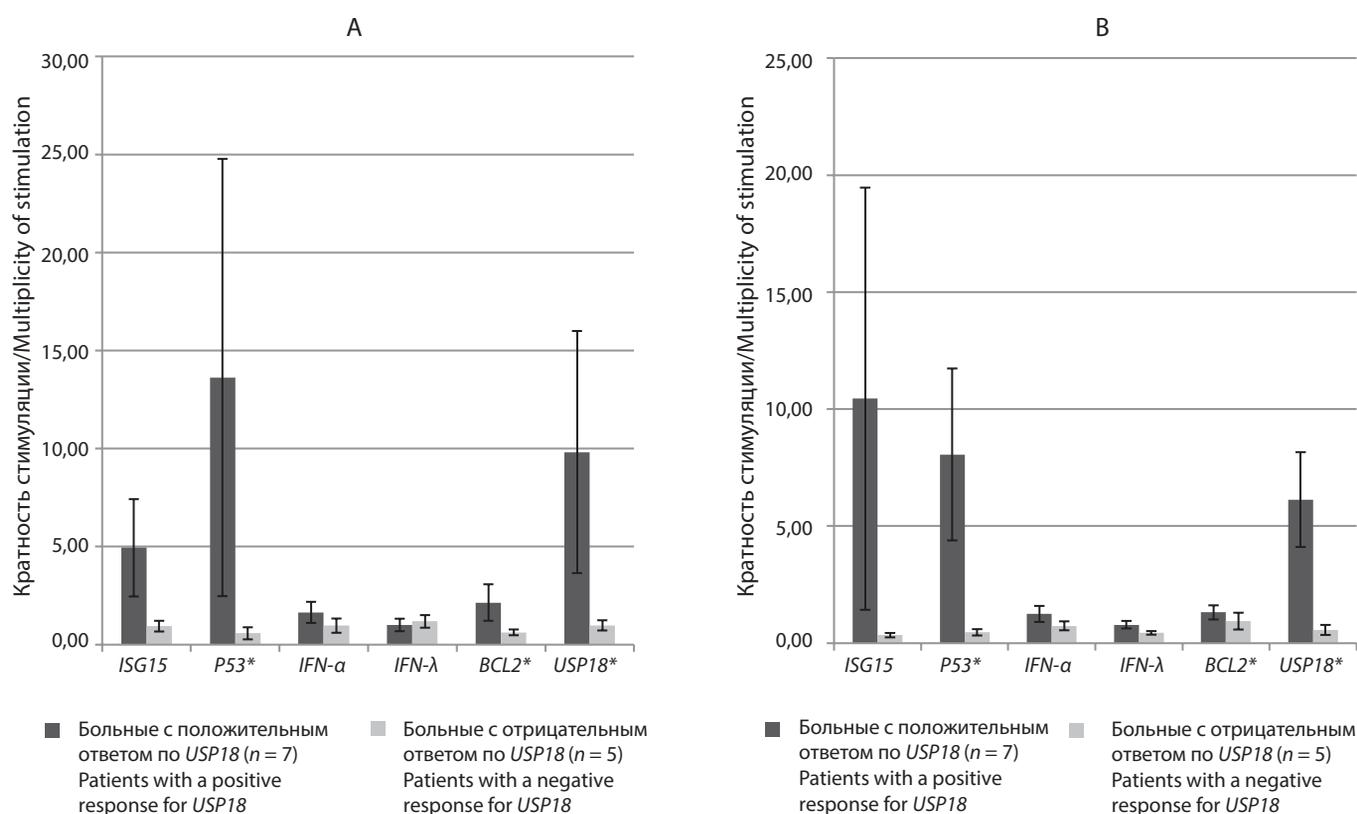


Рис. 3. Действие ЦА на экспрессию генов *IFN-α2*, *IFN-λ1*, *ISG15*, *BCL2*, *P53(TP53)* и *USP18* в клетках крови больных ФЛ, распределенных в соответствии с положительным ($n = 7$) и отрицательным ($n = 5$) *USP18*-ответом. Генную экспрессию анализировали с помощью ОТ-ПЦР-РВ, как описано в разделе «Материал и методы».

А. Обработка клеток крови ЦА в концентрации 0,5 мг/мл. Сравнение КС генов в клетках крови больных ФЛ с положительным и отрицательным ответом по *USP18*: КС по гену *USP18* 9,82 против 0,98; $*P = 0,0058$; КС по гену *ISG15* 4,94 против 0,94; $P = 0,4649$; КС по гену *P53(TP53)* 13,62 против 0,58; $*P = 0,0424$.

В. Обработка клеток крови ЦА в концентрации 0,05 мг/мл. Сравнение КС генов в клетках крови больных ФЛ с положительным и отрицательным ответом по *USP18*: КС по гену *USP18* 6,14 против 0,57; $*P = 0,0045$; КС по гену *ISG15* 10,45 против 0,34; $P = 0,1229$; КС по гену *P53(TP53)* 8,07 против 0,47; $*P = 0,0284$.

По оси ординат показана КС генов. По оси абсцисс – название генов интерферонов и сигнальных молекул. Статистическая обработка согласно U-критерию Манна–Уитни; ФЛ – фолликулярная лимфома; ЦА – целагрип; КС – кратность стимуляции; *IFN-α2* – альфа 2-интерферон; *IFN-λ1* – лямбда-1-интерферон; *ISG15* – ИФН-стимулированный ген 15; *BCL2* – регулятор апоптоза Bcl-2 (B-cell lymphoma 2); *P53(TP53)* – ген-супрессор (*TP53*) опухолей; *USP18* – ген, кодирующий убиквитин-специфическую пептидазу 18; ОТ-ПЦР-РВ – обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция в режиме реального времени; *статистически достоверные значения.

Fig. 3. The effect of CA on the expression of genes *IFN-α2*, *IFN-λ1*, *ISG15*, *BCL2*, *P53 (TP53)* and *USP18* genes in the blood cells of FL patients, distributed according to positive ($n = 7$) and negative ($n = 5$) *USP18* responses. Gene expression was determined by Real-Time qRT-PCR as described in the Material and Methods section.

A. Treatment of blood cells with CA at a concentration of 0.5 mg/ml. Comparison of MoS genes in blood cells of FL patients with *USP18*-positive and *USP18*-negative responses: MoS for the *USP18* gene is 9.82 versus 0.98; $P = 0.0058$; MoS for the *ISG15* gene 4.94 versus 0.94; $P = 0.4649$; MoS for gene *P53(TP53)* 13.62 versus 0.58; $P = 0.0424$.

B. Treatment of blood cells with CA at a concentration of 0.05 mg / ml. Comparison of MoS genes in blood cells of FL patients with *USP18*-positive and *USP18*-negative responses: MoS for the *USP18* gene is 6.14 versus 0.57; $P = 0.0045$; MoS for the *ISG15* gene is 10.45 versus 0.34; $P = 0.1229$; MoS for gene *P53(TP53)* is 8.07 против 0.47; $P = 0.0284$.

Y-axis shows the multiplicity of gene stimulation. X-axis shows the names of the interferon genes and signaling molecules. Statistical processing according to the Mann–Whitney U-test; FL – Follicular Lymphoma; CA – celagrip; MoS – Multiplicity of Stimulation; *IFN-α2* – Alfa-2-Interferon; *IFN-λ1* – Lambda-1-Interferon; *ISG15* – Interferon-stimulated gene 15; *BCL2* – apoptosis regulator (B-cell lymphoma 2); *P53(TP53)* – a tumor suppression, gene that codes for a protein that regulates the cell cycle; *USP18* – a Protein Coding gene of Ubiquitin Specific Peptidase 18; Real-Time qRT-PCR – Real-Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; * statistically reliable values.

Сравнение кратности стимуляции ЦА генов врожденного иммунитета в клетках крови больных ФЛ, распределенных в соответствии с положительным ($n = 7$) и отрицательным ($n = 5$) *USP18*-ответом. В таблице представлены группы больных ФЛ и здоровых добровольцев, различающихся по КС гена *USP18* в ответ на обработку клеток крови ЦА. При КС

>2 больных считали чувствительными к действию ЦА, при КС <2 – не чувствительными к действию ЦА.

Как показано на рис. 3, при обработке клеток крови ЦА у больных ФЛ с положительным ответом по сравнению с больными с отрицательным ответом по гену *USP18* (КС 9,82 против 0,98; $P = 0,0058$, при обработке ЦА 0,5 мг/мл – рис. 3, А и КС 6,14 про-

Распределение больных фолликулярной лимфомой (ФЛ) и здоровых добровольцев по кратности стимуляции гена *USP18* в ответ на обработку клеток крови ЦА

Distribution of patients with follicular lymphoma (FL) and healthy volunteers according to the multiplicity of *USP18* gene stimulation in response to the treatment of blood cells with CA

№ п/п	Группа Group	Число больных/здоровых The number of patients / healthy	Кратность стимуляции гена <i>USP18</i> <i>USP18</i> gene stimulation ratio
1	Больные ФЛ, чувствительные к действию ЦА Patients with FL sensitive to CA	7	> 2
2	Больные ФЛ, не чувствительные к действию ЦА Patients with FL, not sensitive to the action of CA	5	< 2
3	Здоровые добровольцы, чувствительные к действию ЦА Healthy volunteers sensitive to CA	2	> 2
4	Здоровые добровольцы, не чувствительные к действию ЦА Healthy volunteers, not sensitive to the action of CA	3	< 2

тив 0,57; $P = 0,0045$, при обработке ЦА 0,05 мг/мл – рис. 3, В) также наблюдается высокая КС генов *ISG15* (КС 4,94 против 0,94; $P = 0,4649$ при обработке ЦА 0,5 мг/мл – рис. 3, А и КС 10,45 против 0,34; $P = 0,1229$, при обработке ЦА 0,05 мг/мл – рис. 3, В) и *P53(TP53)* (КС 13,62 против 0,58; $P = 0,0424$ при обработке ЦА 0,5 мг/мл – рис. 3, А и КС 8,07 против 0,47; $P = 0,0284$ при обработке ЦА 0,05 мг/мл – рис. 3, В). При этом не отмечено достоверных изменений КС в отношении добровольцев с положительным ответом по гену *USP18* по сравнению с добровольцами с отрицательным ответом по тому же гену (данные не показаны). КС генов *IFN-α2*, *BCL2*, *IFN-λ1* при обработке клеток крови ЦА как у больных ФЛ, так и у здоровых добровольцев не является значимой.

Обсуждение

В ранее проведенных исследованиях на клеточных культурах, продуцирующих и не продуцирующих антигены ВЭБ, была обнаружена взаимосвязь между генерацией АФК и экспрессией генов врожденного иммунитета *ISG15* и *TP53* при воздействии ЛС ЦА. Данные свидетельствовали о возможном выявлении с помощью ЦА IFN-опосредованных ответов генов врожденного иммунитета при онкопатологии, которые могли бы быть связаны с продукцией АФК. Для проверки этого предположения нами проведены исследования на группе больных ФЛ и сравнительной группе здоровых добровольцев. При этом исследовали ряд генов врожденного иммунитета *IFNα*, *IFNλ*, *ISG15*, *P53(TP53)*, *BCL2* и *USP18*. Полученные данные свидетельствовали о способности противовирусного ЛС ЦА в клетках крови больных ФЛ влиять на образование АФК и экспрессию ряда генов врожденного иммунитета. Показано, что достоверно снижается продукция АФК у больных ФЛ по сравнению со здоровыми добровольцами и возрастает уровень экспрессии генов *USP18*, *ISG15* и *P53(TP53)* при обработке ЦА в концентрациях 0,5 и 0,05 мг/мл.

Известно, что АФК образуются как естественные побочные продукты нормальной клеточной активности [19, 20]. Повышение уровня АФК нарушает гомеостаз, структуру и функции клеток и приводит к окисли-

тельному стрессу. Смещение клеточного окислительно-восстановительного баланса является фактором риска развития различных патологий [21]. АФК могут вызывать нарушения в ДНК-последовательности, делеции, мутации, генные перестройки, приводящие к включению апоптозных сигналов, последующей гибели клеток или инактивации генов-супрессоров опухоли либо к активации протоонкогенов. Напротив, антиканцерогенные средства могут ингибировать образование АФК, окислительное повреждение ДНК, приводя к снижению апоптоза [22]. В нашем исследовании ЦА подавлял образование АФК у больных ФЛ. ФЛ, как хорошо известно, это индолентная лимфома с хорошим ответом на лечение, длительными ремиссиями заболевания и медленным прогрессированием. Медиана выживаемости 80% больных при современном лечении составляет более 15 лет. Тем не менее примерно 20% пациентов составляют прогностически неблагоприятную группу: заболевание рецидивирует в ранние сроки, в течение 1–2 лет от достижения первой ремиссии. Оксидативный стресс, мутации *TP53* и транслокации *MYC*, *Bcl-2* и *Bcl-6* при многих новообразованиях связываются с этиологией и плохим прогнозом [23]. Известно, что риск возникновения неходжкинской лимфомы связан с воспалением, а один из возможных механизмов может включать окислительный стресс, поскольку АФК могут генерировать провоспалительные сигналы [24]. По-видимому, ЦА, подавляя генерацию АФК, у некоторых больных может способствовать снижению продукции провоспалительных цитокинов. Например, при обработке ЦА клеток крови больных ФЛ мы наблюдали (предварительные данные) подавление продукции IL-1 и IL-6 у 3 из 10 больных, у которых выявлялось снижение образования АФК, у остальных наблюдались разнонаправленные изменения.

Одним из ключевых компонентов врожденного иммунного ответа является активация сигнальных путей IFN 1-го типа, которые индуцируются при вирусной инфекции и при развитии рака. IFN 1-го типа как участвует в антивирусном ответе, так и подавляет пролиферацию клеток и способствует апоптозу [25]. *ISG15* индуцируется при действии IFN 1-го типа [26, 27] при вирусной инфекции [28, 29], и может функциониро-

вать как онкогенный белок в случае нарушения регуляции ISG15 [30, 31] и/или как белок-супрессор опухоли [32–34]. Как говорилось выше, ISG15 является убиквитин-подобным белком и осуществляет ISGylation. Было показано, что ISGylation может происходить котрансляционно на вновь синтезированных белках без явной специфичности к мишени [35]. ISGylation является обратимой реакцией, и основным ISG15-деконъюгирующим ферментом *in vivo* считается USP18/UBP43 [36]. Недавние исследования показали, что USP18 может выступать в качестве онкогена при различных видах рака [37]. Известно также [38], что нокдаун USP18 может привести к снижению жизнеспособности клеток и увеличению апоптотической гибели клеток при окислительном стрессе. Показано, что ISGylation P53 играет критическую роль в ингибировании роста клеток и, следовательно, в подавлении развития опухоли в условиях повреждения ДНК [39].

Учитывая, что активность продукта гена USP18 связывается с подавлением ферментативной активности ISG15 и супрессией интерферонового ответа, мы сгруппировали больных ФЛ и здоровых добровольцев по уровню стимуляции гена USP18 на обработку ЦА. Такое разделение было обосновано тем, что как больные ФЛ, так и здоровые добровольцы либо отвечали, либо не отвечали активацией гена USP18 на обработку ЦА (см. табл. 1). Например, у больного 2 с высокой КС по гену USP18 в ответ на обработку ЦА (КС 46,6 и 10,3 при обработке ЦА в концентрациях 0,5 и 0,05 мг/мл соответственно) наблюдали также высокую КС экспрессии генов ISG15 (КС 15,6 и 64,5 при обработке ЦА в концентрациях 0,5 и 0,05 мг/мл соответственно) и P53(TP53) (КС 80,3 и 25,3 при обработке ЦА в концентрациях 0,5 и 0,05 мг/мл соответственно). В то же время у больного 3, у которого не определялась экспрессия гена USP18 в ответ на обработку ЦА (КС 0,6 и 0,7 при обработке ЦА в концентрациях 0,5 и 0,05 мг/мл соответственно), также отсутствовала экспрессия остальных исследованных генов (КС по генам ISG15, P53(TP53), IFN- α , IFN- λ , BCL2 находилась в пределах значений 0,01–1,4). Мы выдвинули рабочую гипотезу, что высокая КС гена USP18 может свидетельствовать о подавлении пути проведения ИФН-сигнала, поскольку известно, что USP18 функционирует также как критический отрицательный регулятор ИФН ответа и отменяет вызванную продуктом гена ISG15 ISGylation, которая может стимулировать белок P53 и каспазу-3 и тем самым способствовать апоптозу [8, 36]. В таком случае ЦА, по-видимому, может являться детектирующим агентом, на основании применения которого могут быть определены активность генов врожденного иммунитета и возможность связать их с прогностическими параметрами течения антивирусного или противоопухолевого процесса. Перспективность такого подхода покажут дальнейшие исследования.

Выводы

1. При сравнении продукции АФК клетками крови больных ФЛ и здоровых добровольцев в присутствии

ЦА выявлено статистически достоверное снижение показателей AI(I) и AI(S) у больных ФЛ по сравнению с добровольцами ($P < 0,05$).

2. КС генов ISG15, P53(TP53) и USP18 в группе больных ФЛ значительно превышала таковую в группе добровольцев ($P < 0,005$). Не обнаруживается значимой КС генов IFN- $\alpha 2$, BCL2, IFN- $\lambda 1$ при обработке клеток крови ЦА как у больных ФЛ, так и у здоровых добровольцев.

3. При обработке клеток крови ЦА у больных ФЛ с положительным ответом по гену USP18 также наблюдается высокая КС генов ISG15 и P53(TP53) по сравнению с больными с отрицательным ответом по этому гену.

4. ЦА снижает продукцию АФК и одновременно стимулирует активность генов врожденного иммунитета ISG15, P53(TP53) и USP18 в клетках крови больных ФЛ.

ЛИТЕРАТУРА

- Schneider W.M., Chevillotte M.D., Rice C.M. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu. Rev. Immunol.* 2014; 32: 513–45. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120231>
- Ершов Ф.И., Киселев О.И. *Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств)*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2005.
- 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.
- Iglesias-Guimaraes V., Ahrends T., de Vries E., Knobeloch K.P., Volkov A., Borst J. IFN-stimulated gene 15 IS an Alarmin that boosts the CTL response via an innate, NK Cell-dependent route. *J Immunol.* 2020; 204(8): 2110–21. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1901410>
- Zhao C., Collins M.N., Hsiang T.-Y., Krug R.M. Interferon-induced ISG15 pathway: an ongoing virus-host battle. *Trends Microbiol.* 2013; 21(4): 181–6. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.01.005>
- Peng Y.C., Lenschow D.J. ISG15 in antiviral immunity and beyond. *Nat. Rev. Microbiol.* 2018; 16(7): 423–39. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0020-5>
- Fernández D.J., Hess S., Knobeloch K.P. Strategies to target ISG15 and USP18 toward therapeutic applications. *Front. Chem.* 2020; 7: 923. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00923>
- Keng Po Lai, Cheung A.H.Y., Tse W.K.F. Deubiquitinase Usp18 prevents cellular apoptosis from oxidative stress in liver cells. *Cell Biol. Int.* 2017; 41(8): 914–21. <https://doi.org/10.1002/cbin.10799>
- Alfadda A.A., Sallam R.M. Reactive oxygen species in health and disease. *J. Biomed. Res. Int.* 2012; 2012: 936486. <https://doi.org/10.1155/2012/936486>
- 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 ЦелАгрип в перевиваемых В-клеточных линиях лимфомы Бёркитта. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(4): 165–72. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-165-172>
- Атаханов А.А., Сарымсаков А.А., Рашидова С.Ш. *Наносистемы целлюлозы и серебра: синтез, структура и свойства*. Ташкент; 2016.
- Наровлянский А.Н., Полосков В.В., Иванова А.М., Мезенцева М.В., Суетина И.А., Руссу Л.И. 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. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-87-94>
- Шувапов 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. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-7-18>

14. Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Колодяжная Л.В., Оспельникова Т.П., Ершов Ф.И. Механизмы действия препарата «Кагоцел» в клетках человека. Сообщение I. Регуляция транскрипции генов системы интерферона и апоптоза. В кн.: Ершов Ф.И., Наровлянский А.Н., ред. *Сборник научных трудов «Интерферон-2011»*. М.; 2012: 389-401.
15. 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 альфа-2 из бактериальных и растительных продуцентов. *Российский биотерапевтический журнал*. 2013; 12(3): 39–44.
16. Hashemi S.M.A., Sarvari J., Fattahi M.R., Dowran R., Ramezani A., Hosseini S.Y. Comparison of ISG15, IL28B and USP18 mRNA levels in peripheral blood mononuclear cells of chronic hepatitis B virus infected patients and healthy individuals. *Gastroenterol. Hepatol. Bed Bench*. 2019; 12(1): 38–45.
17. 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144441>
18. Федоров Г.Н., Леонов С.Д. Особенности хемилюминесценции цельной разведенной крови. Математическая морфология. *Электронный математический и медико-биологический журнал*. 2007; 6(4).
19. Snezhkina A.V., Kudryavtseva A.V., Kardymon O.I., Savva-teeva M.V., Melnikova N.V., Krasnov G.S., et al. ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells. *Oxid. Med. Cell Longev*. 2019; 2019: 6175804. <https://doi.org/10.1155/2019/6175804>
20. Zhang J., Wang X., Vikash V., et al. ROS and ROS-mediated cellular signaling. *Oxid. Med. Cell Longev*. 2016; 2016: 4350965. <https://doi.org/10.1155/2016/4350965>
21. Brieger, K., Schiavonea S., Miller F.J., Krause K.H. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med. Wkly*. 2012; 142: w13659. <https://doi.org/10.4414/smww.2012.13659>
22. Pourahmad J., Salimi A., Seydi E. Role of oxygen free radicals in cancer development and treatment, free radicals and diseases, Rizwan Ahmad, 2016. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/64787> Available at: <https://www.intechopen.com/books/free-radicals-and-diseases/role-of-oxygen-free-radicals-in-cancer-development-and-treatment>
23. Peroja P. Oxidative stress in diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma, and TP53 mutations and translocations of MYC, Bcl-2 and Bcl-6 in diffuse large B-cell lymphoma. Available at: <http://jultika.oulu.fi/files/isbn9789526218595.pdf>
24. Lightfoot T.J., Skibola C.F., Smith A.G., Forrest M.S., Adamson P.J., Morgan G.J., et al. Polymorphisms in the oxidative stress genes, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 2006; 91(9): 1222–7.
25. Young J.J., Yoo H.M., Chung C.H. ISG15 and immune diseases. *Biochim. Biophys. Acta*. 2010; 1802(5): 485–96. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.02.006>
26. Farrell P.J., Broeze R.J., Lengyel P.L. Accumulation of an mRNA and protein in interferon-treated Ehrlich ascites tumour cells. *Nature*. 1979; 279(5713): 523–5. <https://doi.org/10.1038/279523a0>
27. Haas A.L., Ahrens P., Bright P.M., Ankel H. Interferon induces a 15-kilodalton protein exhibiting marked homology to ubiquitin. *J. Biol. Chem*. 1987; 262(23): 11315–23.
28. Yuan W., Krug R.M. Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein. *EMBO J*. 2001; 20(3): 362–71. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.3.362>
29. Nielsch U., Pine R., Zimmer S.G., Babiss L.E. Induced expression of the endogenous beta interferon gene in adenovirus type 5-transformed rat fibroblasts. *J. Virol*. 1992; 66(4): 1884–90. <https://doi.org/10.1128/jvi.66.4.1884-1890.1992>
30. Andersen J.B., Aaboe M., Borden E.C., Goloubeva O.G., Hassel B.A., Orntoft T.F. Stage-associated overexpression of the ubiquitin-like protein, ISG15, in bladder cancer. *Br. J. Cancer*. 2006; 94(10): 1465–71. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603099>
31. Desai S.D., Haas A.L., Wood L.M., Tsai Y.C., Pestka S., Rubin E.H., et al. Elevated expression of ISG15 in tumor cells interferes with the ubiquitin/26S proteasome pathway. *Cancer Res*. 2006; 66(2): 921–8. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-05-1123>
32. Andersen J.B., Hassel B.A. The interferon regulated ubiquitin-like protein, ISG15, in tumorigenesis: friend or foe? *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006; 17:411-421. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2006.10.001>
33. Kitareewan S., Pitha-Rowe I., Sekula D., Lowrey C.H., Nemeth M.J., Golub T.R. et al. UBE1L is a retinoid target that triggers PML/RARalpha degradation and apoptosis in acute promyelocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002; 99(6): 3806–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.052011299>
34. Zhao C., Denison C., Huibregtse J.M., Gygi S., Krug R.M. Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005; 102(29): 10200–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504754102>
35. Durfee L.A., Lyon N., Seo K., Huibregtse J.M. The ISG15 conjugation system broadly targets newly synthesized proteins: implications for the antiviral function of ISG15. *Mol. Cell*. 2010; 38(5): 722–32. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.002>
36. Malakhov M.P., Malakhova O.A., Kim K.I., Ritchie K.J., Zhang D.E. UBP43 (USP18) specifically removes ISG15 from conjugated proteins. *J. Biol. Chem*. 2002; 277(12): 9976–81. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109078200>
37. Tan Y., Zhou G., Wang X., Chen W., Gao H. USP18 promotes breast cancer growth by upregulating EGFR and activating the AKT/Skp2 pathway. *Int. J. Oncol*. 2018; 53(1): 371–83. <https://doi.org/10.3892/ijco.2018.4387>
38. Lai K.P., Cheung A.H.Y., Tse W.K.F. Deubiquitinase Usp18 prevents cellular apoptosis from oxidative stress in liver cells. *Cell Biol. Int*. 2017; 41(8): 914–21. <https://doi.org/10.1002/cbin.10799>
39. 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. <https://doi.org/10.1038/ncomms12513>

REFERENCES

1. Schneider W.M., Chevillotte M.D., Rice C.M. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu. Rev. Immunol*. 2014; 32: 513–45. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120231>
2. 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)
3. Ershov F.I., Narovlyanskiy A.N. Interferons and inducers of interferons. In: Khaitov R.M., Ataulkhanov R.I., Shul'zhenko A.E., eds. *Immunotherapy: A Guide for Doctors [Иммунотерапия: руководство для врачей]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2018: 123–47. (in Russian)
4. Iglesias-Guimaraes V., Ahrends T., de Vries E., Knobloch K-P., Volkov A., Borst J. IFN-stimulated gene 15 IS an Alarmin that boosts the CTL response via an innate, NK Cell-dependent route. *J Immunol*. 2020; 204(8): 2110–21. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1901410>
5. Zhao C., Collins M.N., Hsiang T.-Y., Krug R.M. Interferon-induced ISG15 pathway: an ongoing virus-host battle. *Trends Microbiol*. 2013; 21(4): 181–6. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.01.005>
6. Perng Y.C., Lenschow D.J. ISG15 in antiviral immunity and beyond. *Nat. Rev. Microbiol*. 2018; 16(7): 423–39. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0020-5>
7. Fernández D.J., Hess S., Knobloch K.P. Strategies to target ISG15 and USP18 toward therapeutic applications. *Front. Chem*. 2020; 7: 923. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00923>
8. Keng Po Lai, Cheung A.H.Y., Tse W.K.F. Deubiquitinase Usp18 prevents cellular apoptosis from oxidative stress in liver cells. *Cell Biol. Int*. 2017; 41(8): 914–21. <https://doi.org/10.1002/cbin.10799>
9. Alfadda A.A., Sallam R.M. Reactive oxygen species in health and disease. *J. Biomed. Res. Int*. 2012; 2012: 936486. <https://doi.org/10.1155/2012/936486>
10. 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 Celagriplus in Burkitt's lymphoma stable B-cell lines. *Voprosy virusologii*. 2019; 64(4): 165–72. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-165-172> (in Russian)

11. Atakhanov A.A., Sarymsakov A.A., Rashidova S.Sh. *Nanosystems of Cellulose and Silver: Synthesis, Structure and Properties [Nanosistemy tsellyulozy i serebra: sintez, struktura i svoystva]*. Tashkent; 2016. (in Russian)
12. Narovlyanskiy A.N., Poloskov V.V., Ivanova A.M., Mezentseva M.V., Suetina I.A., Russu L.I., 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 lymphoma cell cultures. *Voprosy virusologii*. 2020; 65(2): 87–94. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-87-94> (in Russian)
13. Shuvalov A.N., Sokolova T.M., Shapoval I.M., Ershov F.I. Modulation of cellular gene transcription by drug "immu-nomax": activation of interferon and interleukine genes. *Immunologiya*. 2014; 35(1): 16–20. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-7-18> (in Russian)
14. 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. *Collection of Proceedings «Interferon-2011» [Sbornik nauchnykh trudov «Interferon-2011»]*. Moscow; 2012: 389–401. (in Russian)
15. 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)
16. Hashemi S.M.A., Sarvari J., Fattahi M.R., Dowran R., Ramezani A., Hosseini S.Y. Comparison of ISG15, IL28B and USP18 mRNA levels in peripheral blood mononuclear cells of chronic hepatitis B virus infected patients and healthy individuals. *Gastroenterol. Hepatol. Bed Bench*. 2019; 12(1): 38–45.
17. 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144441>
18. Fedorov G.N., Leonov S.D. Features of chemiluminescence of whole diluted blood. Mathematical morphology. *Elektronnyy matematicheskiy i medikobiologicheskiy zhurnal*. 2007; 6(4). (in Russian)
19. Snezhkina A.V., Kudryavtseva A.V., Kardymon O.I., Savvateeva M.V., Melnikova N.V., Krasnov G.S., et al. ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells. *Oxid. Med. Cell Longev*. 2019; 2019: 6175804. <https://doi.org/10.1155/2019/6175804>
20. Zhang J., Wang X., Vikash V., et al. ROS and ROS-mediated cellular signaling. *Oxid. Med. Cell Longev*. 2016; 2016: 4350965. <https://doi.org/10.1155/2016/4350965>
21. Brieger, K., Schiavonea S., Miller F.J., Krausea K.H. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med. Wkly*. 2012; 142: w13659. <https://doi.org/10.4414/smww.2012.13659>
22. Pourahmad J., Salimi A., Seydi E. Role of oxygen free radicals in cancer development and treatment, free radicals and diseases, Rizwan Ahmad, 2016. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/64787> Available at: <https://www.intechopen.com/books/free-radicals-and-diseases/role-of-oxygen-free-radicals-in-cancer-development-and-treatment>
23. Peroja P. Oxidative stress in diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma, and TP53 mutations and translocations of MYC, Bcl-2 and Bcl-6 in diffuse large B-cell lymphoma. Available at: <http://jultika.oulu.fi/files/isbn9789526218595.pdf>
24. Lightfoot T.J., Skibola C.F., Smith A.G., Forrest M.S., Adamson P.J., Morgan G.J., et al. Polymorphisms in the oxidative stress genes, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 2006; 91(9): 1222–7.
25. Young J.J., Yoo H.M., Chung C.H. ISG15 and immune diseases. *Biochim. Biophys. Acta*. 2010; 1802(5): 485–96. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.02.006>
26. Farrell P.J., Broeze R.J., Lengyel P.L. Accumulation of an mRNA and protein in interferon-treated Ehrlich ascites tumour cells. *Nature*. 1979; 279(5713): 523–5. <https://doi.org/10.1038/279523a0>
27. Haas A.L., Ahrens P., Bright P.M., Ankel H. Interferon induces a 15-kilodalton protein exhibiting marked homology to ubiquitin. *J. Biol. Chem*. 1987; 262(23): 11315–23.
28. Yuan W., Krug R.M. Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein. *EMBO J*. 2001; 20(3): 362–71. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.3.362>
29. Nielsch U., Pine R., Zimmer S.G., Babiss L.E. Induced expression of the endogenous beta interferon gene in adenovirus type 5-transformed rat fibroblasts. *J. Virol*. 1992; 66(4): 1884–90. <https://doi.org/10.1128/jvi.66.4.1884-1890.1992>
30. Andersen J.B., Aaboe M., Borden E.C., Goloubeva O.G., Hassel B.A., Orntoft T.F. Stage-associated overexpression of the ubiquitin-like protein, ISG15, in bladder cancer. *Br. J. Cancer*. 2006; 94(10): 1465–71. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603099>
31. Desai S.D., Haas A.L., Wood L.M., Tsai Y.C., Pestka S., Rubin E.H., et al. Elevated expression of ISG15 in tumor cells interferes with the ubiquitin/26S proteasome pathway. *Cancer Res*. 2006; 66(2): 921–8. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-05-1123>
32. Andersen J.B., Hassel B.A. The interferon regulated ubiquitin-like protein, ISG15, in tumorigenesis: friend or foe? *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006; 17:411–421. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2006.10.001>
33. Kitareewan S., Pitha-Rowe I., Sekula D., Lowrey C.H., Nemeth M.J., Golub T.R. et al. UBE1L is a retinoid target that triggers PML/RARalpha degradation and apoptosis in acute promyelocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002; 99(6): 3806–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.052011299>
34. Zhao C., Denison C., Huibregtse J.M., Gygi S., Krug R.M. Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005; 102(29): 10200–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504754102>
35. Durfee L.A., Lyon N., Seo K., Huibregtse J.M. The ISG15 conjugation system broadly targets newly synthesized proteins: implications for the antiviral function of ISG15. *Mol. Cell*. 2010; 38(5): 722–32. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.002>
36. Malakhov M.P., Malakhova O.A., Kim K.I., Ritchie K.J., Zhang D.E. UBP43 (USP18) specifically removes ISG15 from conjugated proteins. *J. Biol. Chem*. 2002; 277(12): 9976–81. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109078200>
37. Tan Y., Zhou G., Wang X., Chen W., Gao H. USP18 promotes breast cancer growth by upregulating EGFR and activating the AKT/Skp2 pathway. *Int. J. Oncol*. 2018; 53(1): 371–83. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4387>
38. Lai K.P., Cheung A.H.Y., Tse W.K.F. Deubiquitinase Usp18 prevents cellular apoptosis from oxidative stress in liver cells. *Cell Biol. Int*. 2017; 41(8): 914–21. <https://doi.org/10.1002/cbin.10799>
39. 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. <https://doi.org/10.1038/ncomms12513>