

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Наровлянский А.Н.¹, Мезенцева М.В.¹, Суетина И.А.¹, Руссу Л.И.¹, Иванова А.М.¹, Полосков В.В.¹, Измestьева А.В.¹, Оспельникова Т.П.¹, Сарымсаков А.А.², Ершов Ф.И.¹

ЦИТОКИН-РЕГУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОТИВОВИРУСНОГО ПРЕПАРАТА ЦелАгрип В ПЕРЕВИВАЕМЫХ В-КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ЛИМФОМЫ БЕРКИТТА

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

²Институт химии и физики полимеров Академии наук Республики Узбекистан, 100128, г. Ташкент, Узбекистан

Введение. Цитокины, активируемые в ответ на иммуносупрессивные вирусные инфекции, могут прямо или косвенно влиять на неопластическую трансформацию В-клеток. В настоящем исследовании изучали новую субстанцию, разработанную для получения противовирусного лекарственного средства ЦелАгрип (CelAgripus, ЦА), которая проявляет интерферон- (ИФН) и цитокин-индуцирующую активность и, по-видимому, может быть использована в качестве активатора противовирусного иммунитета.

Цель исследования – оценить цитокин-регулирующее действие ЦА в линиях клеток лимфомы Беркитта (ЛБ), латентно инфицированных вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ).

Авторам предстояло изучить ЦА-индуцированную экспрессию генов цитокинов – интерлейкинов (ИЛ) -1 β , -2, -4, -6, -8, -10, -12, -17, -18; ИФН- α , - γ , - β , - λ 1, - λ 2, - λ 3; фактора некроза опухоли α (ФНО α) в нормальных и трансформированных ВЭБ клетках ЛБ.

Материал и методы. Использовали линии клеток фибробластов эмбриона человека (ФЭЧ), Namalva, Daudi, Raji и R3HR-1, на которых изучали препараты ЦА, госсипол-уксусной кислоты (ГУК), натрий-карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ) с помощью методов ОТ-ПЦР и оценки цитотоксичности.

Результаты. Выявлено действие ЦА на экспрессию генов ИФН- λ , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 и ИЛ-10. Направленность цитокинового ответа зависела от вида клеток и дозы препарата.

Обсуждение. При обработке ЦА клеток ЛБ наблюдались активация генной экспрессии ИФН- λ , ИЛ-1 β , -6, -8 и супрессия активности гена ИЛ-10. При действии субстанций Na-КМЦ и ГУК, используемых для синтеза ЦА, выявлено, в основном, подавление экспрессии генов ИФН- β , ИЛ-1 β , ИЛ-10, ИЛ-18 и ФНО α .

Заключение. Субстанция ЦА оказывает новые эффекты по активации экспрессии ряда ключевых цитокиновых генов в перевиваемых линиях клеток ЛБ. Направленность цитокинового ответа зависит от вида клеток и дозы препарата.

Ключевые слова: цитокины; индуктор интерферона; вирус Эпштейна–Барр; лимфома Беркитта; перевиваемые линии клеток; экспрессия генов; полимерная цепная реакция.

Для цитирования: Наровлянский А.Н., Мезенцева М.В., Суетина И.А., Руссу Л.И., Иванова А.М., Полосков В.В., Измestьева А.В., Оспельникова Т.П., Сарымсаков А.А., Ершов Ф.И. Цитокин-регулирующая активность противовирусного препарата ЦелАгрип в перевиваемых В-клеточных линиях лимфомы Беркитта. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(4):165-172. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-165-172>

Информация об авторах:

Наровлянский А.Н., <http://orcid.org/0000-0003-0601-7148>

Мезенцева М.В., <http://orcid.org/0000-0001-7346-5536>

Суетина И.А., <http://orcid.org/0000-0003-2878-0590>

Руссу Л.И., <http://orcid.org/0000-0001-6353-9917>

Иванова А.М., <http://orcid.org/0000-0002-6008-7967>

Полосков В.В., <http://orcid.org/0000-0003-0001-2493>

Измestьева А.В., <http://orcid.org/0000-0002-0035-324X>

Оспельникова Т.П., <http://orcid.org/0000-0002-1580-6096>

Сарымсаков А.А., <http://orcid.org/0000-0003-4562-7280>

Ершов Ф.И., <http://orcid.org/0000-0002-4780-7560>

Для корреспонденции: Наровлянский Александр Наумович, д-р биол. наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории цитокинов НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: narovl@yandex.ru

Narovlyansky A.N.¹, Mezentseva M.V.¹, Suetina I.A.¹, Russu L.I.¹, Ivanova A.M.¹, Poloskov V.V.¹, Izmet'seva A.V.¹, Ospelnikova T.P.¹, Sarymsakov A.A.², Ershov F.I.¹

CYTOKINE-REGULATING ACTIVITY OF ANTI-VIRUS PREPARATION CelAgripus IN BURKITT'S LYMPHOMA STABLE B-CELL LINES

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

²Institute of Polymer Chemistry and Physics Uzbek Academy of Sciences, Tashkent, 100128, Uzbekistan

Introduction. Cytokines activated in response to immunosuppressive viral infections can directly or indirectly affect the neoplastic transformation of B cells. In this study, we studied a new substance designed to produce the antiviral drug CelAgrip (CA, CelAgripus), which exhibits interferon (IFN) and cytokine-inducing activity and, apparently, can be used as an activator of antiviral immunity.

Purpose - is to evaluate the cytokine-regulating effect of CA in Burkitt's lymphoma (LB) cell lines latently infected with the Epstein-Barr virus (EBV).

Objectives: to study the CA-induced expression of the cytokine genes IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-18, IFN- α , IFN- γ , IFN- β , IFN- λ 1, IFN- λ 2, IFN- λ 3, TNF- α in normal and EBV transformed LB cells.

Material and methods. Cell line: the human embryo fibroblasts (HEF), Namalva, Daudi, Raji, P3HR-1. Preparations: CA, gossypol-acetic acid (GAA), sodium carboxymethyl cellulose (Na-CMC). Methods: RT-PCR and methods for assessing cytotoxicity (MTT and Scepter 2.0 Merck cell counter).

Results. The effect of the CA preparation on the expression of IFN- λ , IL-1 β , IL-6, IL-8 and IL-10 genes was revealed.

Discussion. We observed the activation of gene expression of IFN- λ , IL-1 β , IL-6, IL-8 and suppression of IL-10 gene activity when treatment CA of LB cells.

Conclusion. The substance CA has new effects on the activation of the expression of a number of key cytokine genes in stable Burkitt lymphoma cell lines.

Keywords: cytokines; interferon inducer; Epstein-Barr virus; Burkitt's lymphoma; stable cell lines; gene expression; the polymerase chain reaction.

For citation: Narovlyansky A.N., Mezentseva M.V., Suetina I.A., Russu L.I., Ivanova A.M., Poloskov V.V., Izmet'seva A.V., Ospelnikova T.P., Sarymsakov A.A., Ershov F.I. Cytokine-regulating activity of anti-virus preparation CelAgripin in Burkitt's lymphoma stable B-cell lines. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(4):165-172. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-165-172>

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, Russian Federation. E-mail: narovl@yandex.ru

Information about author:

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

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>

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

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

Izmet'seva 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>

Acknowledgments. The work was carried out with the financial support of the «Russian Foundation for Basic Research» on the project (grant) №18-515-41001\18.

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

Received 12 March 2019

Accepted 09 April 2019

Введение

Лимфома Беркитта (ЛБ) относится к гетерогенной группе агрессивных В-клеточных сарком. Ещё в 1964 г. была установлена связь ЛБ и вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) [1]. Использование культур перевиваемых клеток, полученных от больных ЛБ, представляет интерес для исследователей, занимающихся проблемами вирусологии, онкологии, иммунологии и разработкой новых лекарственных препаратов. Известно, что ВЭБ обнаруживается в лимфоцитах крови больных ЛБ, но не выявляется в опухолевых клетках. При этом в полученных из таких опухолей линиях 5–25% клеток продуцировали ВЭБ. В течение последних 20 лет количество вирусов, которые связывают с возникновением лимфом, увеличилось и включает, кроме ВЭБ, Т-клеточный лимфотропный вирус человека 1 (Human T-cell lymphotropic virus 1), вирус иммунодефицита человека (Human immunodeficiency virus 1 и 2) и вирус герпеса человека 8-го типа (Human herpesvirus, HHV8). Эти вирусы могут способствовать развитию лимфом путём прямого воздействия (ВЭБ и ЛБ) или в результате длительной иммуносупрессии (например, HHV8). Предполагается, что цитокинные реакции в ответ на иммуносупрессивные вирусные инфекции могут пря-

мо или косвенно влиять на неопластическую трансформацию В-клеток. При этом цитокины способны стимулировать рост клеток и подавлять апоптоз, что ведёт к усилению инвазии и метастазированию трансформированных клеток. Обнаружены высокие уровни цитокинов – интерлейкинов (ИЛ) -6, -17A, -10 при ЛБ у детей [2]. При мониторинге продукции цитокинов в линиях клеток ЛБ, позитивных по ВЭБ, K.Miyauchi и соавт. [3] выявили продукцию ИЛ-10, интерферон- γ (ИФН- γ), индуцированного белка IP-10/CXCL10, макрофагального хемокина MDC/CCL22, макрофагальных воспалительных белков MIP-1a/CCL3 и MIP-1b/CCL4. Авторы указывают, что латенция ВЭБ, по-видимому, связана с продукцией ИЛ-10, MDC/CCL22 и MIP-1a/CCL3 в клетках ЛБ. ВЭБ экспрессирует ряд гомологов клеточных цитокинов, одним из которых является вирусный ИЛ-10 (вириИЛ-10) [4]. Это позволяет ВЭБ обходить противовирусные ответы организма хозяина и устанавливать латентность. Предполагается, что вириИЛ-10 ВЭБ может супрессировать индуцированные человеческим ИЛ-10 противовоспалительные гены и повышать экспрессию воспалительных генов, и тем самым перекрывать или отменять противовоспалительные эффекты человеческого ИЛ-10 [5].

ИФН и их индукторы – одни из основных препаратов для терапии и профилактики вирусных инфекций [6]. Они используются в течение длительного времени и показали свою эффективность как в подавлении вирусной репродукции, так и в коррекции механизмов врождённого иммунитета [7]. В Институте химии и физики полимеров Академии наук Республики Узбекистан разработана новая субстанция для получения противовирусного лекарственного средства [8]. В качестве полимерной матрицы использованы высокоочищенные формы карбоксиметилцеллюлозы, а в качестве ИФН- и цитокин-индуцирующего агента – природный полифенол госсипол. Препарат ЦелАгрип (CelAgrilus, ЦА) разрешён Минздравом Республики Узбекистан для применения в качестве профилактического и лечебного средства при вирусном гриппе и острых респираторных вирусных инфекциях.

Цель настоящей работы – оценка цитокин-регулирующего действия индуктора ИФН ЦелАгрип в линиях клеток ЛБ, латентно инфицированных ВЭБ.

Исследователям предстояло изучить ЦА-индуцированную экспрессию генов цитокинов, а именно: ИЛ-1 β , -2, -4, -6, -8, -10, -12, -17, -18; ИФН- α , - γ , - β , - λ 1, - λ 2, - λ 3 и фактора некроза опухоли α (ФНО α), в нормальных и трансформированных ВЭБ клетках ЛБ.

Материал и методы

Клетки: 1) линия диплоидных фибробластов эмбриона человека (ФЭЧ); 2) перевиваемая линия человеческих клеток ЛБ Namalva, выделенная G. Klein и соавт. [9]; 3) перевиваемая линия человеческих клеток ЛБ Daudi, полученная от биопсии опухоли 16-летнего африканского мальчика Daudi Onyangaj [10]; 4) перевиваемая линия человеческих клеток ЛБ Raji (линия недифференцированных лимфобластоидных клеток В-типа), полученная в 1963 г. R.J.V. Pulvertaft [11] из ЛБ 11-летнего африканского мальчика; 5) перевиваемая линия человеческих клеток ЛБ P3HR-1 была выделена и распространена Y. Ninuma и соавт. [12]. Все линии получены из коллекции культур клеток ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России (лаборатория культур тканей НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского).

Культивирование перевиваемых линий клеток осуществляли в питательной среде Игла ДМЕМ (ООО «Биолот», Санкт-Петербург) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС; Thermo Fisher Scientific Inc., США) в CO₂-инкубаторе при 37 °C и 5% CO₂.

Препараты: 1) субстанция ЦА (НПП «Радикс», Россия) 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}] дотриактанта 1,3,5(28),6,6(27),9(18),10,12(17),13,15-декаена; 2) госсипол-уксусная кислота (ГУК). Молекулярная формула: C₃₂H₃₄O₁₀, 98%, является активным компонентом, извлечённым

из семян хлопчатника. ГУК использовали в качестве исходного сырья для синтеза субстанции ЦА; 3) натрий-карбоксиметилцеллюлоза (Na-КМЦ) – натриевая соль целлюлозогликолевой кислоты. Эмпирическая формула [C₆H₇O₂(OH)_{3-x}(OCH₂COONa)_x]_n. Na-КМЦ использовали в качестве исходного сырья для синтеза субстанции ЦА. Все изученные в работе препараты предоставлены Институтом химии и физики полимеров Академии наук Республики Узбекистан.

Подготовка образцов для исследований. ЦА исследовали на клетках для определения цитотоксичности в исходной концентрации 200 мг/мл. Образцы Na-КМЦ и ГУК были разведены в среде для суспензионных культур до концентрации 10 мг/мл и 20 мг/мл, соответственно. Все 3 препарата были профильтрованы через фильтр 0,45 мкм и внесены в лунки 96-луночной планшеты через 24 ч после посадки клеток, титровали в двукратных разведениях от 1/2 до 1/1024 и инкубировали с клетками в течение 24 ч в CO₂-термостате при 37 °C. Эксперименты выполняли с тремя повторами.

Количественная оценка цитотоксичности препаратов с использованием МТТ-тестирования [13]. Использовали стандартный метод МТТ (3[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия, Sigma, США). Восстановленные клетками МТТ-реагент является показателем жизнеспособности клеток в изучаемой культуре, что позволяет количественно оценить гибель клеток, под воздействием тестируемого препарата. Жизнеспособность клеток оценивали по интенсивности окраски раствора, т.е. измеряя оптическую плотность при длине волны 545 нм фотометра «Immunochem 2100» (США). Эксперименты проводили с тремя повторами. Цитотоксичными считали препараты при снижении показателей ОП более чем на 50%.

Количественная оценка цитотоксичности препаратов с использованием портативного счётчика клеток Scepter 2.0 (Merck Millipore). Анализировали популяции перевиваемых суспензионных линий клеток по размеру и клеточному объёму в соответствии с инструкцией к прибору при обработке различными концентрациями ЦА.

Культивирование клеток для исследования цитонного спектра. Исследуемые перевиваемые линии клеток пересевали в 6-луночные плашки в объёме 2 мл. Через 24 ч культивирования в лунки вносили образцы в следующих конечных концентрациях: ЦА – 5 мг/мл, 0,5 мг/мл, 0,05 мг/мл; Na-КМЦ – 0,5 мг/мл и 0,05 мг/мл; ГУК – 0,2 мг/мл и 0,02 мг/мл.

Для выделения РНК применяли коммерческие тест-системы на магнитных частицах «Кровь – Выделение ДНК/РНК» («ООО Силекс», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Для удаления из пробы нуклеиновых кислот нежелательного типа использовали соответствующую нуклеазу. Экспрессию генов определяли с использованием полуколичественного метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Образцы кДНК нормировали по контрольному гену GAPDH, кодирующему

глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназу. ПЦР проводили на амплификаторе «Терцик». Амплификаты ДНК анализировали электрофорезом в 2,5% агарозном геле с бромистым этидием. Для идентификации нуклеотидных последовательностей использовали маркер для электрофореза фирмы «Promega», США. Детекцию соответствующих ДНК-продуктов проводили с использованием трансиллюминатора при длине волны 254 нм.

В работе были использованы пары праймеров для следующих цитокинов: ИЛ-1 β , -2, -4, -6, -8, -10, -12, -17, -18; ИФН- α , - γ , - β , - λ 1, - λ 2, - λ 3; ФНО α [14].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel.

Результаты

На начальном этапе исследований определяли *in vitro* токсические (субтоксические) и эффективные концентрации ЦА. Для клеток ФЭЧ, Raji и Namalva препарат проявлял токсичность при концентрациях ≥ 25 мг/мл. А при добавлении ЦА к клеткам P3HR-1 и Daudi наблюдалась их деструкция при концентрациях препарата $\geq 12,5$ мг/мл. Для анализа роли исходных субстанций, используемых для синтеза ЦА, были проведены эксперименты по определению цитотоксичности Na-КМЦ и ГУК. Эти субстанции более токсичны для клеток, чем ЦА. При изучении влияния субтоксических концентраций ЦА (50 мг/мл) на перевиваемые линии клеток ЛБ выявлено уменьшение объёма, диаметра и количества жизнеспособных клеток. Обработка культур клеток нетоксичными концентрациями препарата (например, 5 мг/мл) не влияла на жизнеспособность исследуемых клеток. На основании полученных данных для дальнейшей работы были отобраны концентрации препаратов, не проявлявшие токсических свойств (для ЦА – 5, 0,5 и 0,05 мг/мл; для Na-КМЦ – 0,5 и 0,05 мг/мл и ГУК – 0,2 и 0,02 мг/мл).

В табл. 1 приведены данные по экспрессии широкого спектра генов ИФН и цитокинов при действии ЦА в перевиваемых клетках ЛБ и ФЭЧ. Во всех изученных линиях клеток наблюдали конститутивную экспрессию генов ИФН I типа (ИФН- α и - β), ИЛ-18 и ФНО α , которая сохранялась при действии ЦА. В то же время даже при индукции ЦА отсутствовала активность генов ИФН II типа (ИФН- γ) и ИЛ-2, -4, -12, -17. Активность генов ИФН типа III (λ -1, λ -2, λ -3) не выявлялась в линиях клеток Daudi и Raji, а также при их обработке препаратом. В клетках P3HR-1 наблюдалась спонтанная экспрессия гена ИФН λ -1, которая подавлялась при обработке ЦА, но при этом происходила индукция активности гена ИФН λ -3. А в клетках Namalva, наоборот, наблюдали подавление активности гена ИФН λ -3 при действии препарата.

Отдельно следует рассмотреть изменения в активации генов ИЛ-1 β , -6, -8 и -10. Из данных, суммированных в табл. 1, следует: 1) в нормальных диплоидных клетках человека, а также в клетках Daudi и Raji не выявлялась мРНК ИЛ-1 β ; 2) в клетках P3HR-1

и Namalva, необработанных ЦА, также отсутствовала экспрессия этого гена, но при обработке клеток препаратом во всех использованных концентрациях обнаруживалась экспрессия мРНК ИЛ-1 β ; 3) мРНК ИЛ-6 не определялась в двух клеточных линиях (Daudi и Raji), а в линии P3HR-1 выявлялась конститутивная активность этого гена, которая не изменялась при обработке ЦА; 4) в линии клеток Namalva активация этого гена выявлялась только при обработке препаратом в концентрациях 0,05 и 5 мг/мл; 5) ген ИЛ-8 активировался при действии ЦА во всех использованных концентрациях в трёх линиях клеток – P3HR-1, Raji и ФЭЧ; 6) отсутствовал синтез мРНК ИЛ-8 в клетках Daudi; 7) в клетках Namalva, в которых конститутивно выявлялась экспрессия гена ИЛ-8, при действии ЦА в концентрации 0,05 мг/мл активность гена ИЛ-8 не обнаружена.

При обработке ЦА в линии ФЭЧ обнаружена экспрессия гена ИЛ-10, а в клетках Raji конститутивно выявляемый синтез мРНК ИЛ-10 подавлялся. В клетках Daudi и Namalva также конститутивно выявлялась активность гена ИЛ-10 и при обработке ЦА наблюдалась супрессия активности в концентрации 5 мг/мл (для Daudi) и 0,5 мг/мл (для Namalva). В клетках P3HR-1 экспрессия гена ИЛ-10 не обнаруживалась.

В табл. 2 приведены результаты изучения способности исходных для синтеза ЦА соединений – Na-КМЦ и ГУК, стимулировать экспрессию генов цитокинов в этих же линиях клеток. В ФЭЧ выявлено влияние Na-КМЦ только на подавление экспрессии генов ИЛ-18 и ФНО α ; ГУК подавляла генную активность ИЛ-1 β , ИЛ-8 и ФНО α . В клетках Daudi и P3HR-1 не обнаружено изменений в спектре цитокинов, только в линии клеток P3HR-1 при введении ГУК в концентрации 0,02 мг/мл наблюдали подавление экспрессии генов ИФН- β и ФНО α . В линии клеток Raji Na-КМЦ подавляла экспрессию генов ИЛ-18 и ФНО α ; отмечены отсутствие генной экспрессии ИЛ-10 и активация гена ИЛ-8 как при обработке этих клеток Na-КМЦ, так и ГУК. В культуре клеток Namalva Na-КМЦ супрессировал генную экспрессию ИЛ-1 β , ИЛ-10 и ФНО α , а ГУК – ИЛ-1 β и -10.

Обсуждение

В результате изучения цитотоксичности субстанции ЦА и исходных для её синтеза соединений установлено, что по сравнению с ГУК, которая проявляет значительно более выраженную токсичность на диплоидных и трансформированных клетках, ЦА практически не токсичен для диплоидных фибробластов и линий клеток ЛБ при концентрациях до 12,5 мг/мл. Это согласуется с классическими работами по снижению токсичности биологически активных соединений при их модификации путём ковалентного соединения с полимерными молекулами [15]. При исследовании цитокинового профиля на основании анализа генной экспрессии методом ОТ-ПЦР в изучаемых линиях клеток мы не выявили активности генов ИФН II типа (ИФН- γ) и ИЛ-2, -4, -12, -17 даже при индукции ЦА. Но при этом во всех изученных линиях клеток

Таблица 1

Экспрессия генов интерферонов и цитокинов при действии препарата ЦелАгрии в перевиваемых клетках лимфомы Беркитта и фибробластах эмбриона человека

Клетки/ Концентрация ЦА, мг/мл	ИФН-α	ИФН-γ	ИФН-β	λ-1	λ-2	λ-3	ИЛ-1β	ИЛ-2	ИЛ-4	ИЛ-6	ИЛ-8	ИЛ-10	ИЛ-12	ИЛ-17	ИЛ-18	ФНОα	GAPDH
P3HR 5,0	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P3HR 0,5	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P3HR 0,05	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P3HR контр.	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
Daudi 5,0	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Daudi 0,5	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
Daudi 0,05	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
Daudi контр.	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
Raji 5,0	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Raji 0,5	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Raji 0,05	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Raji контр.	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
Namalva 5,0	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
Namalva 0,5	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Namalva 0,05	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+
Namalva контр.	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
ФЭЧ 5,0	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
ФЭЧ 0,5	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
ФЭЧ 0,05	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
ФЭЧ контр.	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+

Примечание. Здесь и в табл. 2: экспрессию генов цитокинов определяли с использованием полуколичественного метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией; «+» – наличие активности; «-» – отсутствие активности, контр – контрольные линии клеток без обработки препаратом; GAPDH – контрольный ген, кодирующий глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназу, по которому нормировали образцы кДНК.

наблюдали конститутивную экспрессию генов ИФН-I типа I (ИФН-α и -β), ИЛ-18 и ФНОα, которая сохранялась также при действии препарата ЦА. Ранее, в работах сообщалось о спонтанной продукции ИФН I типа в лимфобластоидных линиях клеток человека [16]. Позже эффект конститутивной экспрессии ИФН I типа и передачи сигналов в состоянии покоя (без индуцирующего агента) был обнаружен в клетках человека и мыши, включая макрофаги и В-клетки [17]. Тем не менее этот эффект до конца не исследован [18]. Предполагается, что конститутивный ИФН поддерживает экспрессию компонентов передачи сигналов ИФН I типа и базальный уровень активности генов, связанных с иммунитетом, для обеспечения быстрого ответа на вирусную инфекцию [19]. Известно также, что ряд цитокинов ФНОα, ИЛ-1β, -4, -6, -7, -8, -10 и -13 и/или их генов конститутивно экспрессируются в различных количествах, например, при В-клеточном хроническом лимфобластном лейкозе (В-CLL) [20]. Считается, что ФНОα влияет на генез лимфомы посредством усиления воспалительных и антиапоптотических сигналов, возможно, через путь NF-κB [21]. Кроме того, было обнаружено, что ФНОα, ФНО-R1 и ФНО-R2 повышены у пациентов с неходжкинскими лимфомами (НХЛ), и что уровни ФНО, ФНО-R1

и ФНО-R2 в плазме крови представляют собой ценные прогностические маркеры [22]. Исследования также показали, что ФНОα может взаимодействовать с другими цитокинами, такими как ИЛ-6, -10 и -2 *in vivo*, для увеличения пролиферации клеток НХЛ [23]. Конститутивная экспрессия мРНК ИЛ-18 – провоспалительного цитокина, участвующего в Th1-иммунном ответе, была обнаружена во многих типах клеток, включая купферовские клетки, моноциты, остеобласты, мононуклеары периферической крови, кератиноциты, дендритные клетки, астроциты, микроглиальные клетки, панкреатические β-клетки. Однако только макрофаги и дендритные клетки секретировали функциональный ИЛ-18 [24]. мРНК ИЛ-18, как и мРНК рецепторов ИЛ-18 (ИЛ-18Rα и -18Rβ), конститутивно и убиквитарно экспрессируется в В-клеточных линиях человека, но при этом не происходит секреции функционирующего белка [25]. Таким образом, конститутивная или спонтанная экспрессия цитокинов в нормальных и в трансформированных клетках не редкое событие. Однако механизмы такой экспрессии до сих пор не поняты.

Для анализа экспрессии генов, связанных с активностью препарата, прежде всего представляют интерес гены, чья активность изменялась при обработке

Таблица 2
Экспрессия генов интерферонов и цитокинов при действии натрий-карбоксиметилцеллюлозы (NaКМЦ) и госсипол-уксусной кислоты (ГУК) в перевиваемых клетках лимфомы Беркигга и фибробластах эмбриона человека

Культура/концентрация, мг/мл	ИФН-α	ИФН-γ	ИФН-β	λ-1	λ-2	λ-3	ИЛ-1β	ИЛ-2	ИЛ-4	ИЛ-6	ИЛ-8	ИЛ-10	ИЛ-12	ИЛ-17	ИЛ-18	ФНОα	GARDH
P3HR1 NaКМЦ 0,5	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
P3HR1 ГУК 0,02	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
P3HR1 контр.	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Daudi NaКМЦ 0,5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Daudi ГУК 0,02	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Daudi контр.	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Raji NaКМЦ 0,05	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Raji ГУК 0,2	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Raji контр.	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
Namalva NaКМЦ 0,05	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Namalva ГУК 0,02	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Namalva контр.	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
ФЭЧ NaКМЦ 0,5	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
ФЭЧ ГУК 0,02	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
ФЭЧ контр.	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+

ЦА клеток ЛБ, а именно генная экспрессия цитокинов ИЛ-1β, -6, -8 и -10.

Провоспалительный цитокин ИЛ-1β экспрессируется в различных тканях и является важным медиатором воспалительного ответа, участвует в регуляции пролиферации клеток, дифференцировке и апоптозе [26]. Среди изученных клеток ЛБ индукцию экспрессии этого гена в ответ на ЦА мы наблюдали только в двух линиях – P3HR-1 и Namalva. Вполне возможно, что обработка ЦА таких лимфомных клеток приводит к активации апоптоза и блокированию пролиферации.

ИЛ-6 участвует в воспалении и созревании В-клеток. Белок, кодируемый геном ИЛ-6, является эндогенным пирогеном и индуцирует лихорадочные состояния у инфекционных больных и людей с аутоиммунными заболеваниями [27]. В случае злокачественной трансформации предполагается, что ИЛ-6 играет важную роль в регуляции опухолевого микроокружения, прогрессии злокачественных клеток и их метастазирования [28]. В клетках Daudi и Raji мы не обнаружили активности гена ИЛ-6. Однако его экспрессия наблюдалась в культуре клеток P3HR-1 и сохранялась при обработке ЦА. Интересно, что в линии клеток Namalva, спонтанно продуцирующей ИФН I типа, не обнаруживалась экспрессия гена ИЛ-6, но при действии препарата происходила его активация.

ИЛ-8 является нейтрофил-специфическим хемотактическим фактором и относится к семейству СХС хемокинов. Продуцируется различными клетками (моноциты, макрофаги, нейтрофилы, лимфоциты, эндотелиальные и эпителиальные клетки) после стимуляции ИЛ-1α, -1β, -17, ФНОα, или толл-подобными рецепторами. Известно, что основной функцией ИЛ-8 является привлечение нейтрофилов к месту инфекции или повреждения [29]. Кроме того, ИЛ-8 как провоспалительный хемокин и ангиогенный фактор связан с различными воспалительными реакциями и, как оказалось, с прогрессированием опухолей [30]. При немелкоклеточной карциноме лёгкого ИЛ-8 сверхэкспрессируется под влиянием протоонкогена KRAS и усиливает стромальный ответ, вызывая воспаление и ангиогенез, которые связаны с пролиферацией опухоли и отрицательно коррелируют с выживанием пациентов [31]. Кроме того, ряд исследований доказывает роль ИЛ-8 в качестве диагностического маркера НХЛ [32]. Повышение уровней экспрессии ИЛ-4, -1 и -8 было обнаружено также при лимфомах MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) [33]. В нашем исследовании различных перевиваемых линий клеток ЛБ было обнаружено, что экспрессия гена ИЛ-8 под действием ЦА активировалась как в клетках P3HR-1 и Raji, так и в диплоидных клетках ФЭЧ. Оценка возможной роли ЦА в качестве аттрактанта нейтрофилов, моноцитов и макрофагов нуждается в дополнительных исследованиях.

Плейотропные эффекты ИЛ-10 связаны в основном с иммунорегуляцией и воспалением. ИЛ-10 хорошо известен как фактор ингибиции синтеза цитокинов (CSIF) [34]. Он продуцируется активированными иммунными клетками, подавляет экспрессию Th1 цито-

кинов, ингибирует продукцию провоспалительных цитокинов ИФН- γ , ФНО, ИЛ-1 β и -6, МНС антигенов II класса, повышает продукцию антител, пролиферацию и выживание В-клеток, регулирует JAK-STAT сигнальный путь [35]. В настоящее время признана и поддерживается проонкогенная роль ИЛ-10, основанная на его иммуносупрессивных свойствах. Тем не менее установлено, что ВЭБ как один из основных агентов В-клеточной опухолевой трансформации продуцирует собственный вирусный ИЛ-10 (вирИЛ-10), который является гомологом ИЛ-10 человека, с помощью которого подавляется продукция ИФН и усиливаются пролиферация и дифференцировка В-клеток. Предполагается, что, как уже упоминалось ранее, подавление посредством вирИЛ-10 противовоспалительных генов, индуцированных ИЛ-10 человека, с одновременной стимуляцией экспрессии воспалительных генов может отменять противовоспалительные эффекты ИЛ-10 человека [5]. До сих пор не установлена общая роль ИЛ-10 при раке [36]. Известны различные и противоречивые эффекты ИЛ-10, приводящие к опухолевому росту или регрессии опухолей, что может быть связано и с существованием вирусных цитокиновых аналогов. При изучении действия ЦА на активацию гена ИЛ-10 нами было показано, что препарат индуцировал экспрессию в диплоидных ФЭЧ и подавлял его активность в клетках Raji (в широком диапазоне концентраций), Namalva (при концентрации 0,5 мг/мл) и Daudi (5 мг/мл). Не обнаружено действия препарата в клетках P3HR-1. Учитывая, что исследуемые клетки ЛБ являются ВЭБ-трансформированными, вполне можно предположить избирательное действие препарата в качестве индуктора ИЛ-10 в нормальных диплоидных клетках и в качестве супрессора, возможно, присутствующего вирИЛ-10. Однако для доказательства этого предположения необходимо дифференцировать активность генов ИЛ-10 и вирИЛ-10.

Таким образом, в перевиваемых линиях клеток ЛБ выявлено воздействие ЦА на экспрессию генов ИФН- λ , ИЛ-1 β , -6, -8 и -10. Направленность воздействия зависела от вида клеток и дозы препарата.

Возникает вопрос о вкладе структурных частей молекулы ЦА в регуляцию цитокиновых генов. На этих же линиях клеток мы изучали экспрессию генов цитокинов исходных для синтеза ЦА соединений – На-КМЦ и ГУК. В фибробластах эмбриона человека На-КМЦ практически не влияла на изменение экспрессии цитокиновых генов. Отмечено только подавление экспрессии ИЛ-18 и ФНО α , при этом ГУК подавляла генную активность ИЛ-1 β , ИЛ-8 и ФНО α . В клетках ЛБ Daudi и P3HR-1 мы также не обнаружили значимых изменений в спектре цитокинов, только в линии клеток P3HR-1 при обработке ГУК в концентрации 0,02 мг/мл наблюдали подавление экспрессии генов ИФН- β и ФНО α . В линии клеток Raji На-КМЦ так же, как и в культуре ФЭЧ, подавляла экспрессию ИЛ-18 и ФНО α . Кроме того, отмечены подавление генной экспрессии ИЛ-10 и активация гена ИЛ-8 как при обработке этих клеток На-КМЦ, так и ГУК. Наконец, в

культуре клеток Namalva На-КМЦ подавлял генную экспрессию ИЛ-1 β , ИЛ-10 и ФНО α , а ГУК – ИЛ-1 β и ИЛ-10.

Заключение

В перевиваемых линиях клеток ЛБ выявлено действие ЦА на экспрессию генов ИФН- λ , ИЛ-1 β , -6, -8 и -10. Направленность цитокинового ответа зависела от вида клеток и дозы препарата.

Если при обработке ЦА клеток ЛБ мы наблюдали, в основном, активацию генной экспрессии ИФН- λ , ИЛ-1 β , -6, -8 и супрессию активности гена ИЛ-10, то при действии На-КМЦ и ГУК выявлено подавление экспрессии генов ИФН- β , ИЛ-1 β , -10, -18 и ФНО α . Таким образом, при создании синтетической молекулы ЦА мы получили новый эффект по активации экспрессии ряда ключевых генов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке «Российского фонда фундаментальных исследований» по проекту (гранту) № 18-515-41001\18.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-5, 9-12, 14, 16-36 см. REFERENCES)

- 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. *Иммуноterapia: руководство для врачей*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2018: 123-47.
- Атаханов А.А., Сарымсаков А.А., Рашидова С.Ш. *Наносистемы целлюлозы и серебра: синтез, структура и свойства*. Ташкент; 2016.
- Хабриев Р.У., ред. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*. М.: Медицина; 2005.
- Платэ Н.А., Васильев А.Е. *Физиологически активные полимеры*. М.: Химия; 1986.

REFERENCES

- Epstein M.A. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet*. 1964; 1(7335): 702-3. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(64\)91524-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(64)91524-7)
- Ndede I., Mining S.K., Patel K., Wanjala F.M., Chumba D., Tenge C. Cytokines associated with Burkitt's lymphoma in western Kenya. *BMC Res. Notes*. 2017; 10(1): 519. Doi: <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2841-0>
- Miyachi K., Urano E., Yoshiyama H., Komano J. Cytokine signatures of transformed B cells with distinct Epstein-Barr virus latencies as a potential diagnostic tool for B cell lymphoma. *Cancer Sci*. 2011; 102(6): 1236-41. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.01924.x>
- Liu Y., de Waal Malefyt R., Briere F., Parham C., Bridon J.M., Banchereau J., et al. The EBV IL-10 homologue is a selective agonist with impaired binding to the IL-10 receptor. *J. Immunol*. 1997; 158(2): 604-13.
- Jog N.R., Chakravarty E.F., Guthridge J.M., Judith A., James J.A. Epstein Barr Virus Interleukin 10 Suppresses Anti-inflammatory Phenotype in Human Monocytes. *Front. Immunol*. 2018; 9: 2198. Doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02198>
- 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)
- Ershov F.I., Narovlyanskiy A.N. Interferons and interferon induc-tors. In: Khaitov R.M., Ataullakhanov R.I., Shul'zhenko A.E., eds. *Immunotherapy: A Guide for Doctors [Иммуноterapia: rukovod-*

- stvo dlya vrachey]. Moscow: GEOTAR-Media; 2018: 123-47. (in Russian)
8. 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)
 9. Klein G., Dombos L., Gothoskar B. Sensitivity of Epstein-Barr virus (EBV) producer and non-producer human lymphoblastoid cell lines to superinfection with EBV. *Int. J. Cancer*. 1972; 10(1): 44-57. Doi: <https://doi.org/10.1002/ijc.2910100108>
 10. 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.
 11. Pulvertaft R.J.V., Cantab M.D. Cytology of Burkitt's tumour (African lymphoma). *Lancet*. 1964; 283(7327): 238-40. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(64\)92345-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(64)92345-1)
 12. 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.
 13. Khabriev R.U., ed. *Manual on Experimental (Preclinical) Study of New Pharmacological Substances [Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv]*. Moscow: Meditsina; 2005. (in Russian)
 14. PrimerBank. PCR Primers for Gene Expression Detection and Quantification. Available at: <https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank>
 15. Plate N.A., Vasil'ev A.E. *Physiologically Active Polymers [Fiziologicheski aktivnye polimery]*. Moscow: Khimiya; 1986. (in Russian)
 16. Pickering L.A., Kronenberg L.H., Stewart W.E. Spontaneous production of human interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1980; 77(10): 5938-42. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.77.10.5938>
 17. Mostafavi S., Yoshida H., Moodley D., LeBoite H., Rothamel K., Raj T., et al. Parsing the interferon transcriptional network and its disease associations. *Cell*. 2016; 164(3): 564-78. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.032>
 18. Sarhan J., Liu B.C., Muendlein H.I., Weindel C.G., Irina Smirnova I., Tang A.Y., et al. Constitutive interferon signaling maintains critical threshold of MLKL expression to license necroptosis. *Cell Death Differ*. 2019; 26(2): 332-47. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0122-7>
 19. Abt M.C., Osborne L.C., Monticelli L.A., Doering T.A., Alenghat T., Sonnenberg G.F., et al. Commensal bacteria calibrate the activation threshold of innate antiviral immunity. *Immunity*. 2012; 37(1): 158-70. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.04.011>
 20. van Kooten C., Rensink I., Aarden L., van Oers R. Cytokines and Intracellular Signals Involved in the Regulation of B-CLL Proliferation. *Leuk. Lymphoma*. 1993; 12(1-2): 27-33. Doi: <https://doi.org/10.3109/10428199309059568>
 21. Purdue M.P., Lan Q., Krickler A., Grulich A.E., Vajdic C.M., Turner J. Polymorphisms in immune function genes and risk of non-Hodgkin Lymphoma: findings from the New South Wales non-Hodgkin Lymphoma Study. *Carcinogenesis*. 2007; 28(3): 704-12. Doi: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl200>
 22. Warzocha K., Salles G., Bienvenu J., Bastion Y., Dumontet C., Renard N., et al. Tumor necrosis factor ligand-receptor system can predict treatment outcome in lymphoma patients. *J. Clin. Oncol*. 1997; 15(2): 499-508. Doi: <https://doi.org/10.1200/JCO.1997.15.2.499>
 23. Tian T., Wang M., Ma D. TNF- α , a good or bad factor in hematological diseases? *Stem Cell Investig*. 2014; 1: 12. Doi: <https://doi.org/10.3978/j.issn.2306-9759.2014.04.02>
 24. Gardella S., Andrei C., Costigliolo S., Poggi A., Zocchi M.R., Rubartelli A. Interleukin-18 synthesis and secretion by dendritic cells are modulated by interaction with antigen-specific T-cells. *J. Leukoc. Biol*. 1999; 66(2): 237-41.
 25. Lorey S.L., Huang Y.C., Sharna V. Constitutive expression of Interleukin-18 and Interleukin-18 receptor mRNA in tumour derived human B-cell lines. *Clin. Exp. Immunol*. 2004; 136(3): 456-62. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02465.x>
 26. IL1B interleukin 1 beta (Homo sapiens (human)); Gene ID: 3553. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3553>
 27. IL6 interleukin 6 Homo sapiens (human); Gene ID: 3569. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3569>
 28. Anestakis D., Petanidis S., Kalyvas S., Nday C.M., Tsave O., Kioseoglou E., et al. Mechanisms and Applications of Interleukins in Cancer Immunotherapy. *Int. J. Mol. Sci*. 2015; 16(1): 1691-710. Doi: <https://doi.org/10.3390/ijms16011691>
 29. Akdis M., Aab A., Altunbulakli C., Azkur K. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. *JACI*. 2016; 138(4): 984-1010. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.06.033>
 30. Waugh D.J., Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res*. 2008; 14(21): 6735-41. Doi: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-07-4843>
 31. Sunaga N., Kaira K., Tomizawa Y., Shimizu K., Imai H., Takahashi G., et al. Clinicopathological and prognostic significance of interleukin-8 expression and its relationship to KRAS mutation in lung adenocarcinoma. *Br. J. Cancer*. 2014; 110(8): 2047-53. Doi: <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.110>
 32. Lee H.L., Eom H.S., Yun T., Kim H.J., Park W.S., Nam B.H., et al. Serum and urine levels of interleukin-8 in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Cytokine*. 2008; 43(1): 71-5. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.04.004>
 33. Miyata-Takata T., Takata K., Toji T., Goto N., Kasahara S., Takahashi T., et al. Elevation of serum interleukins 8, 4, and 1 β levels in patients with gastrointestinal low-grade B-cell lymphoma. *Sci. Rep*. 2015; 5:18434. Doi: <https://doi.org/10.1038/srep18434>
 34. Wikipedia, The Free Encyclopedia. IL10. Available at: https://en.wikipedia.org/wiki/Interleukin_10
 35. Sabat R., Grütz G., Warszawska K., Kirsch S., Witte E., Wolk K., et al. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010; 21(5): 331-44. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2010.09.002>
 36. Berti F.C.B., de Oliveira K.B. IL-10 in cancer: Just a classical immunosuppressive factor or also an immunostimulating one? *AIMS Allergy Immunol*. 2018; 2(2): 88-97. Doi: <https://doi.org/10.3934/Allergy.2018.2.88>

Получена 12.03.19

Принята в печать 09.04.19