

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/332535629>

Signaling TLR/RLR–mechanisms of immunomodulating action of ingavirin and thymogen preparations

Article · April 2019

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-1-60-66

CITATIONS

0

READS

6

5 authors, including:



[Tatiana Mihailovna Sokolova](#)

73 PUBLICATIONS 43 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

СИГНАЛЬНЫЕ TLR/RLR-МЕХАНИЗМЫ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТОВ ИНГАВИРИН И ТИМОГЕН

Т.М. Соколова¹, В.В. Полосков¹, А.Н. Шувалов¹, О.С. Бурова², З.А. Соколова²

¹ФГБУ «НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России;
Россия, 123 098 Москва, ул. Гамалеи, 18;

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115 478 Москва, Каширское ш., 24

Контакты: Татьяна Михайловна Соколова tsokolovavir@mail.ru

Цель работы — изучить препараты ингавирина и тимогена как активаторы сигнальных TLR- и RLR-реакций в чувствительной клеточной модели моноцитов THP-1 и клетках крови доноров.

Материалы и методы. Исследованы препараты ингавирина (имидазолилэтанамид пентандиовой кислоты — 6-[2-(1H-imidazol-4-yl)ethylamino]-5-oxohexanoic acid; «Валента Фармацевтика», Россия) и тимоген (альфа-глутамил-триптофан; «Цитомед», Россия), зарегистрированные в России как лекарственные препараты. Определяли экспрессию генов TLR/RLR-рецепторов под действием препаратов ингавирина 50–300 мкг/мл и тимогена 0,1–5 мкг/мл (24 ч при 37 °С) методом количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. Уровень цитокинов жидкости оценивали с помощью наборов для иммуноферментного анализа (ЗАО «Вектор-Бест», Россия) в культуральной жидкости. Транфекцию малой ингибиторной РНК (миРНК) MAVS проводили с помощью реагента Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Иммунофенотип клеток линии THP-1 определяли проточной цитометрией с мечеными моноклональными антителами FITC CD14 и PE CD34 (BD Biosciences) на приборе FACSCanto II (Becton Dickinson).

Результаты. Впервые показано, что препараты ингавирина (имидазолилэтанамид пентандиовой кислоты) и тимоген (альфа-глутамил-триптофан) — активаторы генов иммунных TLR/RLR-рецепторов и их сигнальных факторов в клеточной линии THP-1 (моноцитарная лейкемия человека) и крови здоровых доноров. В этих клеточных системах препараты ингавирина и тимоген вызывали похожие иммунные реакции и стимулировали экспрессию генов: эндосомальных рецепторов TLR 3, 7, 8, 9, цитоплазматических сенсоров RIG1/MDA5 и сигнальных факторов NFκB1 и MAVS. Индуцированные клетки секретируют воспалительные цитокины TNF-α и IL1-β. Ингавирин в клеточной линии THP-1 вызывал снижение бластных клеток CD34⁺. Активация ингавирином генов MAVS и ко-рецептора B2M главного комплекса гистосовместимости (MHCII) были взаимосвязаны. Транфекция миРНК MAVS снижала уровень гомологичной мРНК и гетерологичной мРНК B2M.

Заключение. Полученные результаты дают основание считать, что противовирусные и иммуномодулирующие свойства препаратов ингавирина и тимогена связаны с активацией группы генов TLR/RLR-сигнальных путей врожденного и адаптивного иммунитета и дифференцировкой предшественников гемопоэтических клеток.

Ключевые слова: ингавирин, тимоген, THP-1, TLR/RLR, MAVS

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-1-00-00

SIGNALING TLR/RLR-MECHANISMS OF IMMUNOMODULATING ACTION OF INGAVIRIN AND THYMOGEN PREPARATIONS

T.M. Sokolova¹, V.V. Poloskov¹, A.N. Shuvalov¹, O.S. Burova², Z.A. Sokolova²

¹N. F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of Russia;
18 Gamalei St., Moscow 123 098, Russia;

²N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115 478, Russia

Objective: to study drugs ingavirin and thymogen as activators of signal TLR and RLR reactions in a sensitive cell model of THP-1 monocytes and blood cells of donors.

Materials and methods. Investigated drugs ingavirin (imidazoleylethanamide pentanedioic acid — 6-[2-(1H-imidazol-4-yl)ethylamino]-5-oxohexanoic acid; Valenta Pharmaceuticals, Russia) and thymogen (alpha-glutamyl-tryptophan; Cytomed, Russia), registered in Russia as medicines. The expression of TLR/RLR receptor genes was determined under the action of ingavirin 50–300 µg/ml and thymogen 0.1–5 µg/ml (24 h, 37 °C) using quantitative RT-PCR. The level of fluid cytokines was determined using ELISA kits (Vector-Best, Russia) in the culture fluid. Transfection of small inhibitory RNA (siRNA) MAVS was performed using the reagent Lipofectamine 2000 (Invitrogen). The immunophenotype of the THP-1 cell line was determined by flow cytometry with labeled monoclonal antibodies FITC CD14 and PE CD34 (BD Biosciences) on a FACSCanto II instrument (Becton Dickinson).

Results. For the first time, it has been shown that ingavirin (imidazolethyanamide) and thymogen (dipeptide Glu-Trp) preparations are activators of the immune TLR/RLR receptors and their signaling factors genes in the cultures of monocytic leukemia THP-1 and blood of healthy donors. In these cellular systems, ingavirin and thymogen preparations elicited similar immune responses and stimulated the expression of genes: endosomal TLR3/7/8/9 receptors, RIG1/MDA5 cytoplasmic sensors and NFκB1 and MAVS signaling factors. Induced cells secrete inflammatory cytokines of TNF-α and IL1-β. Ingavirin in THP-1 cell culture monocytes caused a decrease in CD34⁺ blast cells. Activation the genes of MAVS and co-receptor B2M of the main histocompatibility complex (MHCII) by ingavirin were interrelated. Transfection of siRNA MAVS reduced the level of homologous mRNA MAVS and heterologous mRNA B2M.

Conclusion. The results obtained suggest that the antiviral and immunomodulating properties of the drugs ingavirin and thymogen are associated with the activation of a group of TLR/RLR signaling pathways of the innate and adaptive immunity and the differentiation of hematopoietic cell precursors.

Key words: ingavirin, timogen, THP-1, blood, TLR/RLR, MAVS

Введение

TLRs и RLRs являются семейством сигнальных рецепторов врожденного иммунитета, которые были открыты как структуры, распознающие патогены [1, 2]. В дальнейшем было показано участие этих рецепторов в клеточной дифференцировке [3]. Рецепторы TLR 3, 7, 8, 9 локализованы в эндосомах, и их специфические агонисты известны. TLR3 взаимодействуют с двуспиральными РНК (дсРНК), TLR7/8 – с односпиральными РНК (осРНК) и TLR9 – с CpG-олигонуклеотидами. Внутриклеточные дсРНК и осРНК также узнаются хеликазами RIG-I и MDA5, которые взаимодействуют с митохондриальным сигнальным белком MAVS. RIG-зависимый путь активации генов воспалительных цитокинов и интерферона (ИФН) осуществляется с участием транскрипционных факторов NFκB1 и IRF3 и 7 [4].

В ряде публикаций описаны лечебные эффекты отечественных препаратов ингавирин (дикарбамин) и тимоген при вирусных и онкологических заболеваниях [5–7]. Для дальнейшего продвижения отечественных препаратов ингавирин и тимоген в клинику необходимо углубленное изучение механизмов их действия на сигнальные реакции TLRs и RLRs – рецепторов врожденного иммунитета.

Ингавирин по химической структуре, как и зарубежный препарат имиквимод, относится к группе имидазолхинолинов [8, 9]. На основе имидазольных соединений синтезирован ряд медицинских препаратов, которые обладают противоопухолевой активностью и являются агонистами родственных рецепторов TLR 7, 8, 9 [10]. Изучение препарата ингавирин как TLR-агониста в клетках крови доноров показало стимуляцию им гена рецептора TLR7 и генов ИФН-зависимых белков Mx1 и OAS1 [11]. В условиях гриппозной инфекции ингавирин повышал чувствительность клеток к ИФН типа 1 [12] и влиял на ядерный транспорт и свойства вирусного нуклеопротеина [13].

В последнее время появились сообщения о пептидах тимуса как регуляторах генной экспрессии [14]. Гормон тимозин-α₁ известен как эффективный

иммунный регулятор и агонист рецепторов TLR9 и TLR2 [15]. В комбинации с цитокинами и химиотерапией гормон применяется в онкологии [16]. Другой гормон, тималин, является регулятором воспалительных реакций у мышей и сигнальных реакций макрофагов [17]. Иммунобиологические активности дипептида тимогена во многом напоминают выявленные у гормона тимозина-α₁ [18]. Тимоген стимулирует пролиферацию и дифференцировку Т-лимфоцитов, усиливает активность нейтрофилов, моноцитов и NK-клеток, проявляет гемостимулирующие эффекты и позитивно влияет на развитие клеток костного мозга [19]. Иммуностимулирующее действие ингавирина и тимогена в дендритных клетках и макрофагах осуществляется с участием TLR-сигнальных реакций и проявляется усилением их противоопухолевой киллерной активности [15, 20].

Цель работы – изучить препараты ингавирин и тимоген как активаторы сигнальных TLR- и RLR-реакций в чувствительной клеточной модели моноцитов THP-1 [21]. Сопоставлены эффекты в клетках линии THP-1 моноцитарного лейкоза и клетках крови здоровых доноров. Результаты с ингавирином и тимогеном дополняют информацию о препаратах ИФН и ИФН-индукторов как активаторах TLR/RLR-генов, вызывающих дифференцировку моноцитов THP-1 [22].

Материалы и методы

Препараты. Ингавирин (имидазолилэтанамида пентандиовой кислоты) – 6-[2-(1H-Imidazol-4-yl)ethylamino]-5-oxohexanoic acid, капсулы 90 мг, «Валента Фармацевтика» (Россия). Тимоген (альфа-глутамил-триптофан), ампула 100 мкг/мл, ЗАО «Медико-биологический научно-производственный комплекс «Цитомед» (Россия). Зарегистрированы в России как лекарственные препараты. Препараты исследованы в концентрациях, не оказывающих влияния на жизнеспособность клеток: ингавирин – 50–300 мкг/мл, тимоген – 0,1–5 мкг/мл. Время инкубации клеток с препаратами – 24 ч при 37 °С.

Клеточные культуры. Кровь здоровых доноров разводили в 3–5 раз в среде RPMI-1640 с глутамином, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и антибиотики. Клетки линии ТНР-1 (острый моноцитарный лейкоз, ATCC cat. No. TIB-202) культивировали в среде RPMI-1640 с глутамином и 10 % ЭТС, пересевы суспензии клеток делали в концентрации 200 тыс./мл на 2–3-и сутки.

Трансфекция малой ингибиторной РНК (миРНК) MAVS в клетки ТНР-1. Использовали структуру миРНК MAVS, изученную в экспериментах на специфичность и опубликованную ранее [23]. Плюс-нить 5'-uugcugaagacaagaccuaa-3'tt и комплементарная минус-нить 3'-ttaacgacuuucuguaau-5' длиной в 21 нуклеотид. Олигорибонуклеотиды синтезированы фирмой «Синтол» (Россия). Комплексование плюс- и минус-нитей РНК делали методикой гибридизации [24].

Трансфекцию миРНК MAVS проводили с помощью реагента Lipofectamine 2000 (Invitrogen, cat. No. 1254160) согласно протоколу производителя в редуцированной питательной среде Opti-MEM (cat. No. 31985-062). Смешивали 200 мкл миРНК ~ 0,5 ОЕ/мл и Lipofectamine в отношении 1:1 в среде Opti-MEM и оставляли на 5 мин при 20 °С. В контроле вместо миРНК использовали 200 мкл среды Opti-MEM. К подготовленным пробам добавляли клетки ТНР-1 в количестве 2 мл с концентрацией 10^6 /мл и инкубировали 24 ч при 37 °С. Затем контрольные и трансфицированные миРНК клетки осаждали, отмывали и в концентрации 5×10^5 /мл обрабатывали препаратом ингаверин в среде RPMI-1640 с 5 % ЭТС. Жизнеспособность клеток составляла 80–90 % по окраске трипановым синим.

Количественный анализ мРНК. Суммарную РНК выделяли из опытных и контрольных клеток с реагентом PureZol (Bio-Rad, США) и обрабатывали ДНКазой для удаления примесей ДНК (набор RNA-free, Ambion, США). Реакцию обратной транскрипции (ОТ) ставили с универсальными праймерами random и олиго (dT)₁₅ в объеме 30 мкл при 42 °С 1 ч. Смешивали 5 мкл РНК с 2 мкл праймеров (1 ОЕ/мл) и нагревали 5 мин при 90 °С. К РНК добавляли 23 мкл реакционной смеси, содержащей 4 вида dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) по 500 мкМ, фермент обратную транскриптазу (RT MMLV) 300 ед, ингибитор РНКазы (RNAsin) 50 ед (все реактивы фирмы Promega, США). Реакцию ОТ останавливали нагреванием проб до 95 °С.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) проводили на амплификаторе CFX-96 с готовой 2-кратной смесью SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, США) в микропробирках 0,2 мл. Смешивали 2 мкл специфических пар праймеров (прямой и обратный) с 3 мкл кДНК

(разведения 2–100 раз) и 5 мкл 2-кратной смеси SsoFast EvaGreen Supermix. Каждая проба исследовалась в 3 повторах. Программа ПЦР: 96 °С 2 мин (1 цикл), далее 50–55 циклов 94 °С 10 с, 55–60 °С 20 с, 72 °С 30 с. Программа плавления в конечной точке 65–95 °С, шаг 0,5 °С 10 с. Количество ДНК-амплификатов оценивали по пороговым циклам (Cq). Обработка данных амплификации выполнена в программе CFX Manager Software «Gene expression analysis» (Bio-Rad, США) в автоматическом режиме. Определены стандартные отклонения и изменения уровней в опытных пробах (дельта Cq \pm SD) относительно контроля. Достоверность различий в сравниваемых группах оценена с применением критерия Стьюдента ($p < 0,05$).

Пары праймеров к исследованным видам мРНК рецепторов TLRs и RLRs и мРНК MAVS и B2M опубликованы нами ранее [11].

Уровень цитокинов в культуральной жидкости определяли с помощью наборов для иммуноферментного анализа (ИФА) (ЗАО «Вектор-Бест», Россия) согласно прилагаемой инструкции. Измерение оптической плотности и расчет средних концентраций 2 повторных образцов в пг/мл выполнены на микропланшетном фотометре модели Anthos 2010 в программе ADAP+ (Biochrom, Великобритания).

Иммунофенотип клеток линии ТНР-1, инкубированных с ингаверином 24 ч при 37 °С, определяли проточной цитометрией с мечеными моноклональными антителами FITC CD14 и PE CD34 (BD Biosciences) на приборе FACSCanto II (Becton Dickinson) в лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДитО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Результаты и обсуждение

Обнаружение у антивирусных и иммуномодулирующих препаратов свойств агонистов рецепторов TLRs и RLRs объясняют проявляемые ими биологические активности. Наши исследования выполнены на клетках линии моноцитарного лейкоза ТНР-1, чувствительных к агонистам рецепторов врожденного иммунитета [21], с имидазольным (ингаверин) и пептидным (timoген) препаратами. Оба препарата разрешены для клинического применения.

По нашим данным, ингаверин (100 и 300 мкг/мл) и тимоген (1 и 5 мкг/мл) стимулировали экспрессию генов эндосомальных рецепторов TLR 3, 7, 8, 9 в моноцитах ТНР-1 и в клетках крови (рис. 1). Препараты действовали на родственные рецепторы избирательно. В моноцитах ТНР-1 преобладала активация гена TLR8, а в клетках крови – активация гена TLR7. Эти рецепторы имеют близкую химическую структуру и распознают осРНК и имидазольные соединения [24, 25]. Уровни индукции генной активности были

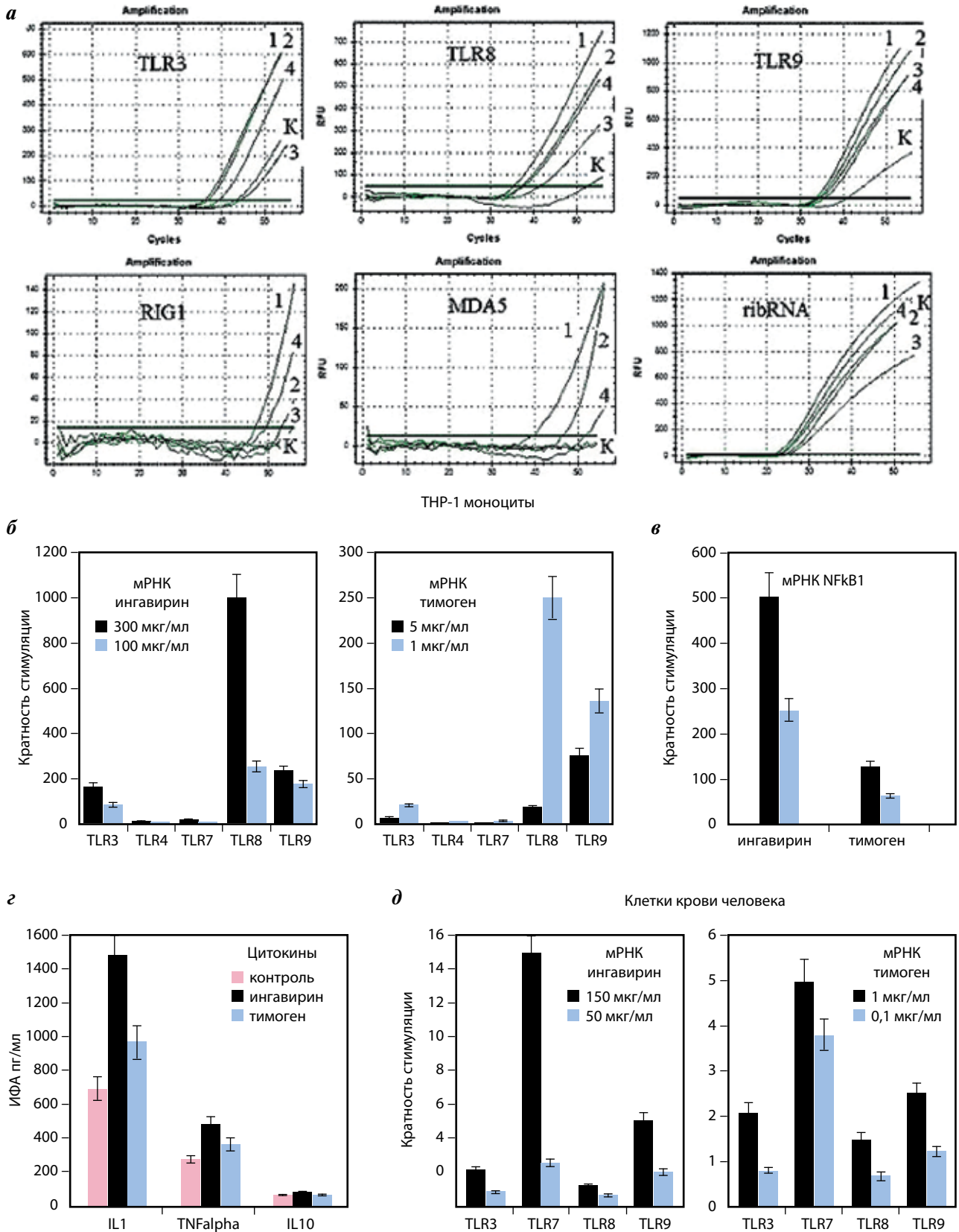


Рис. 1. Стимуляция ингавирином и тимогеном экспрессии генов и продукции цитокинов в моноцитах THP-1 (а–г) и клетках крови (д). Кривые накопления специфических ДНК-амплификатов (циклы амплификации *C_q*) (а). Кратность стимуляции активности генов TLRs (б, г) и фактора NFκB1 (в). Секреция цитокинов клетками под действием препаратов (г)

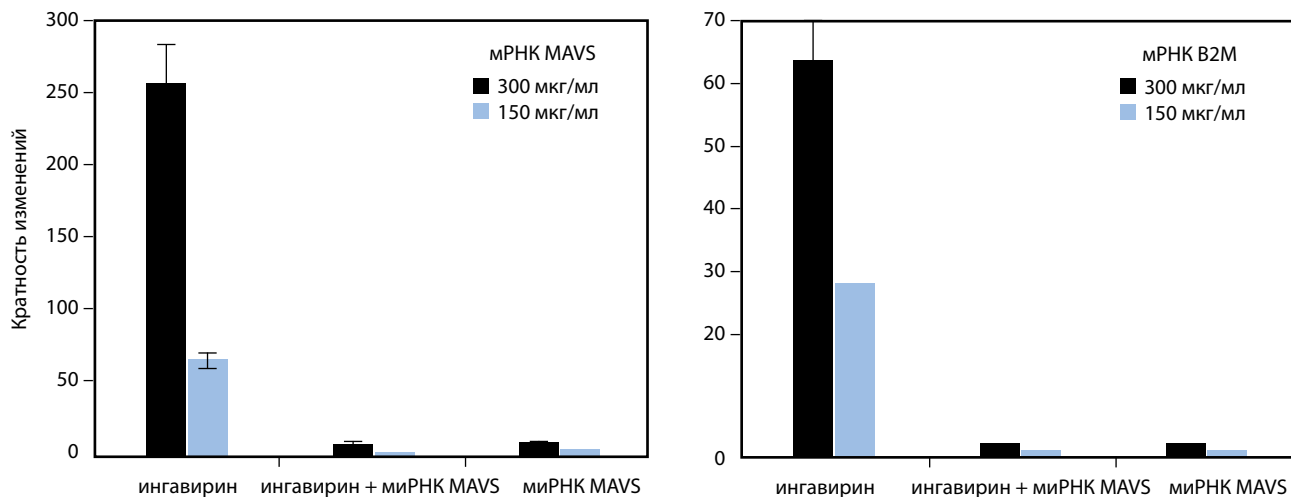


Рис. 2. Уровни мРНК MAVS и мРНК B2M в ТНР-1 моноцитах, индуцированных ингавирином и трансфицированных миРНК MAVS. Использовали опубликованную структуру миРНК MAVS [23], которую получили гибридизацией комплементарных нуклеотидов [24]. Трансфекцию миРНК MAVS проводили с помощью реагента Lipofectamine 2000 (Invitrogen) согласно инструкции. Трансфицированные миРНК клетки (5×10^5 /мл) обрабатывали препаратом ингавирин 24 ч при 37 °С

значительно выше в моноцитах ТНР-1 по сравнению с клетками крови доноров. Это подтверждает, что моноциты ТНР-1 являются чувствительной моделью для оценки TLR- и RLR-реакций иммунитета. Индуцирующие эффекты ингавирина были сильнее, чем тимогена, в обоих типах клеток. В клетках линии ТНР-1 конститутивная экспрессия генов хеликаз RIG1 и MDA5 не выявлялась (по данным ПЦР Cq >55). Ингавирин и тимоген стимулировали гены цитоплазматических хеликаз RIG1 и MDA5 и фактора транскрипции NFκB1 в дозовой зависимости (см. рис. 1, в). Увеличивалась секреция клетками воспалительных цитокинов TNF-α и IL1-β (см. рис. 1, з). Методом ИФА не обнаружено индукции ИФН-α и ИФН-γ, хотя на генном уровне ингавирин повышал уровни ИФН-зависимых белков MxA и OAS1 в клетках крови [11]. Возможно, это объясняется более низкой чувствительностью метода ИФА по сравнению с ПЦР или нарушением процессинга этих мРНК в клетках линии моноцитарного лейкоза ТНР-1. Таким образом, препараты ингавирин и тимоген в моноцитах ТНР-1 и клетках крови оказались похожими по профилям индукции генов рецепторов TLR/RLR и воспалительных цитокинов.

Под действием ингавирина в дозе 300 мкг/мл через 24 ч инкубации количество CD34⁺ клеток в линии ТНР-1 снижалось на 10 %. Это согласуется с результатами авторов, показавших, что воздействие агонистов на рецепторы TLR7 и TLR8 индуцирует дифференцировку миелоидных предшественников клеток костного мозга CD34⁺ [26].

Полученные результаты дают основание считать, что противовирусные и иммуномодулирующие свойства

препаратов ингавирин и тимоген обусловлены активацией сигнальных TLR- и RLR-реакций врожденного иммунитета, несмотря на отличия в химической структуре. Стимуляция конститутивной активности генов сигнальных рецепторов препаратами ингавирин и тимоген была показана нами ранее в клетках ТНР-1 с препаратами ИФН и ИФН-индукторов [22]. Активация реакций врожденного иммунитета важна для активации реакций адаптивного иммунитета в дендритных клетках и макрофагах.

Сигнальные реакции цитоплазматических сенсоров RIG1 и MDA5 осуществляются с участием митохондриального сигнального фактора MAVS [27]. MAVS активирует транскрипционные факторы NFκB1 и IRF3, взаимодействующие с промоторами генов цитокинов [28]. Ингавирин стимулировал экспрессию генов MAVS и B2M в клетках ТНР-1 (рис. 2). Трансфекция миРНК MAVS в активированных клетках ТНР-1 вызывала подавление уровня гомологичной мРНК. Это подтверждает существование механизма РНК-интерференции в клетках миелоидного лейкоза [24].

Такой же ингибиторный эффект наблюдался и в случае гетерологичной мРНК B2M (см. рис. 2). Это указывает на участие сигнального механизма MAVS в активации гена ко-рецептора МНСII адаптивного иммунитета.

Агонисты рецептора TLR7 (имидазолхинолины) ко-локализованы в дендритных клетках с белками комплекса МНСII в эндоплазматической сети [29]. Индукция ко-рецептора B2M МНСII рассматривается как маркер активации дендритных клеток. Препарат имиквимод превращает плазматические

дендритные клетки в эффекторные опухолевые киллеры [20]. Гормон тимозин активирует Т-клеточный ответ дендритных клеток с участием TLR-рецепторов [15]. Поэтому дальнейшее изучение сигнальных реакций антигенпрезентирующих клеток на препараты ингавирин и тимоген необходимо. Сигнальные реакции родственных рецепторов TLR7 и TLR8 имеют особое значение для дифференцировки клеток при остром миелоидном лейкозе [30]. Агонист рецептора TLR8 (резиквимод) активировал сигнальный каскад MyD88/p38 и подавлял рост опухоли у мышей.

Заключение

Полученные результаты дают основание считать, что противовирусные и иммуномодулирующие свойства препаратов ингавирин и тимоген связаны с активацией одной группы генов сигнальных рецепторов врожденного иммунитета, несмотря на отличия в хи-

мической структуре. Индукция определенных TLR- и RLR-сигнальных путей вызывает дифференцировку предшественников гемопоэтических клеток и активацию реакций адаптивного иммунитета в дендритных клетках и макрофагах. Поэтому наши данные о препаратах ингавирин и тимоген как эффективных стимуляторах генов эндосомальных рецепторов TLR 3, 7, 8, 9 и цитоплазматических сенсоров RIG1 и MDA5 в клетках линии ТНР-1 важны для их дальнейшего эффективного применения. Впервые показано, что ингавирин стимулирует экспрессию генов митохондриального фактора MAVS и гена ко-рецептора МНСII В2М в моноцитах ТНР-1. Это подтверждает взаимосвязь реакций врожденного и адаптивного иммунитета, осуществляемую на транскрипционном уровне. Все вышесказанное дает основания полагать, что отечественные препараты ингавирин и тимоген найдут более широкое клиническое применение при разных формах лейкозов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Pandey S., Singh S., Anang V. et al. Pattern recognition receptors in cancer progression and metastasis. *Cancer Growth Metastasis* 2015;8:25–34. DOI: 0.4137/CGM.S24314. PMID: 26279628.
- Lester S.N., Li K. Toll-like receptors in antiviral innate immunity. *J Mol Biol* 2014;426(6):1246–64. DOI: 10.1016/j.jmb.2013.11.024. PMID: 24316048.
- Cannova J., Breslin S.J.P., Zhang J. Toll-like receptor signaling in hematopoietic homeostasis and the pathogenesis of hematologic diseases. *Front Med* 2015;9(3):288–303. DOI: 10.1007/s11684-015-0412-0. PMID: 26297301.
- Kawai T., Akira S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann. NY Acad. Sci.* 2008;1143:1–20. DOI: 10.1196/annals.1443.020. PMID: 19076341.
- Колобухина Л.В., Меркулова Л.Н., Щелканов М.Ю. и др. Эффективность Ингавирина в лечении гриппа у взрослых. *Терапевтический архив* 2009;(3):51–3. [Kolobukhina L.V., Merkulova L.N., Schelkanov M.Yu. et al. Efficacy of Ingavirin in influenza treatment in adults. *Terapevtichesky arkhiv = Therapeutic Archive* 2009;(3):51–3. (In Russ.)].
- Зарубаев В.В., Беляевская С.В., Сироткин А.К. и др. Влияние Ингавирина *in vitro* и *in vivo* на ультраструктуру и инфекционность вируса гриппа. *Вопросы вирусологии* 2011;56(5):21–5. [ZarubaeV.V., Belyaevskaya S.V., Sirotkin A.K. et al. In vitro and in vivo effects of Ingavirin on the ultrastructure and infectivity of influenza virus. *Voprosy virusologii = Problems of Virology* 2011;56(5):21–5. (In Russ.)].
- Небольсин В.Е., Жданов В.В., Жуков Г.Н. и др. Механизмы протективного эффекта Дикарбамина на системе крови при лечении цитостатиками. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2011;3(150):343–7. [Nebolsin V.E., Zhdanov V.V., Zhukov G.N. et al. Mechanisms of protective effect of Dicarbamin on the blood system in cytostatic treatment. *Bulleten experimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2011;3(150):343–7. (In Russ.)]. DOI: 10.1007/s10517-011-1138-x.
- Schön M.P., Schön M. Imiquimod: mode of action. *Br J Dermatol* 2007;157 Suppl 2:8–13. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2007.08265.x. PMID: 18067624.
- Бозрова С.В., Левицкий В.Л., Недоспасов С.А., Друцкая М.С. Имиквимод: биохимические механизмы иммуномодулирующей и противовоспалительной активности. *Биомедицинская химия* 2013;3(59):249–66. [Bozrova S.V., Levitsky V.L., Nedospasov S.A., Drutskaia M.S. Imiquimod: the biochemical mechanisms of immunomodulatory and anti-inflammatory activity. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry* 2013;3(59):249–66. (In Russ.)].
- Patil S.A., Patil S.A., Patil R., Hashizume R. Imidazoquinolines: recent developments in anticancer activity. *Mini Rev Med Chem* 2016;16(4):309–22. PMID: 26675675.
- Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Полосков В.В., Ершов Ф.И. Стимуляция генов сигнальной трансдукции препаратами Ридостин, Циклоферон и Ингавирин. *Цитокины и воспаление* 2015;(2):26–34. [Sokolova T.M., Shuvalov A.N., Poloskov V.V., Ershov F.I. Stimulation of signaling transduction gene expression with drugs Ridostin, Cycloferon and Ingavirin. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation* 2015;(2):26–34. (In Russ.)].
- Ашахер Т., Крохин А., Кузнецова И. и др. Влияние препарата Ингавирин (имидазолилэтанамид пентадиовой кислоты) на интерфероновый статус клеток в условиях вирусной инфекции. *Эпидемиология и инфекционные болезни* 2016;21(4):196–205. [Aschacher T., Krokhin A., Kuznetsova I. et al. Effect of the preparation Ingavirin® (imidazolyl ethanamide pentandioic acid) on the interferon status of cells under conditions of viral infection. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases* 2016;21(4):196–205. (In Russ.)]. DOI: 10.18821/1560-9529-2016-21-4-196-205.

13. Семенова Н.П., Прокудина Е.Н., Львов Д.К., Небольсин В.Е. Влияние противовирусного препарата Ингавирин® на внутриклеточные преобразования и импорт в ядро нуклеокапсидного белка вируса гриппа. *Вопросы вирусологии* 2010;55(5):17–20. [Semenova N.P., Prokudina E.N., Lvov D.K., Nebolsin V.E. Effect of the antiviral drug Ingavirin® on intracellular transformations and import into the nucleus of influenza A virus nucleocapsid protein. *Voprosy virusologii = Problems of Virology* 2010;55(5):17–20. (In Russ.)].
14. Khavinson V.Kh., Lin'kova N.S., Tarnovskaya S.I. Short peptides regulate gene expression. *Bull Exp Biol Med* 2016;162(2):288–92. DOI: 10.1007/s10517-016-3596-7. PMID: 27909961.
15. Romani L., Bistoni F., Montagnoli C. et al. Thymosin alpha1: an endogenous regulator of inflammation, immunity, and tolerance. *Ann NY Acad Sci* 2007;1112:326–38. DOI: 10.1196/annals.1415.002. PMID: 17495242.
16. Garaci E., Pica F., Sinibaldi-Vallebona P. et al. Thymosin alpha(1) in combination with cytokines and chemotherapy for the treatment of cancer. *Int Immunopharmacol* 2003;3(8):1145–50. DOI: 10.1016/S1567-5769(03)00053-5. PMID: 12860169.
17. Lunin S.M., Novoselova E.G. Thymus hormones as prospective anti-inflammatory agents. *Expert Opin Ther Targets* 2010;14(8):775–86. DOI: 10.1517/1472822.2010.499127. PMID: 20536297.
18. Morozov V.G., Khavinson V.K. Natural and synthetic thymic peptides as therapeutics for immune dysfunction. *Int J Immunopharmacol* 1997;19(9–10):501–5. PMID: 9637345.
19. Deigin V., Ksenofontova O., Khrushchev A. et al. Chemical platform for the preparation of synthetic orally active peptidomimetics with hemoregulating activity. *ChemMed Chem* 2016;11(18):1974–7. DOI: 10.1002/cmdc.201600157. PMID: 27457274.
20. Drobits B., Holcman M., Amberg N. et al. Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells. *J Clin Invest* 2012;122(2):575–85. DOI: 10.1172/JCI61034. PMID: 22251703.
21. Chanput W., Mes J.J., Wichers H.J. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol* 2014;23(1):37–45. DOI: 10.1016/j.intimp.2014.08.002. PMID: 25130606.
22. Соколова Т.М., Полосков В.В., Бурова О.С. и др. Действие интерферонов и ИФН-индукторов на экспрессию генов TLR/RLR-рецепторов и дифференцировку опухолевых линий клеток ТНР-1 и НСТ-116. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(3):28–33. [Sokolova T.M., Poloskov V.V., Burova O.S. et al. Action interferons and IFN-inductors on TLR/RLRs genes expression and differentiation of tumor cell lines THP-1 and HCN-116. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2016;15(3):28–33. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-28-33.
23. Cheng G., Zhong J., Chung J., Chisari F.V. Double-stranded DNA and double-stranded RNA induce a common antiviral signaling pathway in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(21):9035–40. DOI: 10.1073/pnas.0703285104. PMID: 17517627.
24. Cioca D.P., Aoki Y., Kiyosawa K. RNA interference is a functional pathway with therapeutic potential in human myeloid leukemia cell lines. *Cancer Gene Ther* 2003;10(2):125–33. DOI: 10.1038/sj.cgt.7700544. PMID: 12536201.
25. Diebold S.S., Kaisho T., Hemmi H. et al. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 2004;303:1529–31. DOI: 10.1126/science.1093616. PMID: 14976261.
26. Sioud M., Floisand Y., Forfang L., Lund-Johansen F. Signaling through toll-like receptor 7/8 induces the differentiation of human bone marrow CD34+ progenitor cells along the myeloid lineage. *J Mol Biol* 2006;364(5):945–54. DOI: 10.1016/j.jmb.2006.09.054. PMID: 17049554.
27. Loo Y.M., Gale M.Jr. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 2011;34(5):680–92. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.05.003. PMID: 21616437.
28. Seth R.B., Sun L., Ea C.K., Chen Z.J. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 2005;122(5):669–82. DOI: 10.1016/j.cell.2005.08.012. PMID: 16125763.
29. Russo C., Cornella-Taracido I., Galli-Stampino L. et al. Small molecule Toll-like receptor 7 agonists localize to the MHC class II loading compartment of human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 2011;117(21):5683–91. DOI: 10.1182/blood-2010-12-328138. PMID: 21487111.
30. Ignatz-Hoover J.J., Wang H., Moreton S.A. et al. The role of TLR8 signaling in acute myeloid leukemia differentiation. *Leukemia* 2015;29(4):918–26. DOI: 10.1038/leu.2014.293. PMID: 25283842.

ORCID авторов/ORCID of authors

Т.М. Соколова/T.M. Sokolova: <https://orcid.org/0000-0003-0957-4513>

В.В. Полосков/V.V. Poloskov: <https://orcid.org/0000-0003-0001-2493>

А.Н. Шувалов/A.N. Shuvalov: <https://orcid.org/0000-0003-0972-9001>

О.С. Бурова/O.S. Burova: <https://orcid.org/0000-0001-88-97-01-72>

З.А. Соколова/Z.A. Sokolova: <https://orcid.org/0000-0003-4755-5313>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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