

УДК 61:578.7

<https://doi.org/10.17816/MAJ623374>

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *MXA*, *OAS1* И *PKR* В ЛЕЙКОЦИТАХ ПАЦИЕНТОВ С ГРИППОЗНОЙ И КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

С.А. Клотченко<sup>1</sup>, Е.А. Романовская-Романько<sup>1</sup>, В.А. Олейник<sup>1, 2</sup>, М.А. Егорова<sup>1</sup>, В.С. Монахова<sup>1</sup>,  
Е.В. Венёв<sup>1, 3</sup>, М.А. Плотникова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, Россия;

<sup>3</sup> Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина, Санкт-Петербург, Россия

**Для цитирования:** Клотченко С.А., Романовская-Романько Е.А., Олейник В.А., Егорова М.А., Монахова В.С., Венёв Е.В., Плотникова М.А. Сравнительное определение уровня экспрессии генов *MxA*, *OAS1* и *PKR* в лейкоцитах пациентов с гриппозной и коронавирусной инфекцией // Медицинский академический журнал. 2023. Т. 23. № 3. С. 65–75. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ623374>

Рукопись получена: 05.10.2023

Рукопись одобрена: 15.11.2023

Опубликована: 30.11.2023

**Обоснование.** Первой линией защиты хозяина против инвазии вирусных патогенов служит врожденный иммунный ответ, наиважнейшее звено которого — система интерферонов. Передача сигналов интерфероном индуцирует в клетке-мишени экспрессию широкого спектра специфических противовирусных белков, так называемых интерферон-стимулируемых генов. Наиболее эффективные интерферон-стимулируемые гены напрямую ингибируют репликацию вирусов РНК-центричным образом посредством деградации вирусной РНК, нарушения ее транспорта, ингибирования вирусной трансляции и т.п.

**Цель** — разработка количественной тест-системы на основе полимеразной цепной реакции для оценки молекулярной регуляции интерферон-стимулируемых генов *MxA*, *OAS1* и *PKR* человека, а также определение экспрессии этих генов в лейкоцитах крови в ответ на инфицирование РНК-содержащими вирусами.

**Материалы и методы.** Исследование проводили с использованием лейкоцитов, выделенных из крови пациентов с лабораторно подтвержденными заболеваниями грипп и COVID-19 на 3–4-й день после манифестации болезни. Для *ex vivo* индукции вирусного инфицирования использовали вирусы гриппа A/California/07/09pdm (H1N1pdm09), B/Malaysia/2506/04 (Викторианской генетической линии), штамм A2 респираторно-синцитиального вируса и вирус SARS-CoV-2 hCoV-19/Russia/SPE-R11-3524V/2020.

**Результаты.** Разработана мультиплексная тест-система на основе полимеразной цепной реакции для оценки экспрессии генов *MxA*, *OAS1* и *PKR*, эффективность амплификации которых составила 101,9, 92,5 и 101,5 % соответственно. Разработанная тест-система была предложена для исследования молекулярной регуляции *MxA*, *OAS1* и *PKR* в лейкоцитах при социально значимых заболеваниях, таких как грипп и COVID-19. Согласно полученным нами результатам у госпитализированных пациентов на 3–4-й день после появления симптомов заболевания уровни экспрессии генов *MxA*, *OAS1* и *PKR* были значимо повышены на системном уровне в лейкоцитах крови. Показано, что стимуляция лейкоцитов, выделенных от здоровых волонтеров, вирусами гриппа А, В и респираторно-синцитиальным вирусом приводила к значимому увеличению уровней мРНК генов *MxA*, *OAS1* и *PKR* через 24 ч после инфицирования. В то же время стимуляция лейкоцитов вирусом SARS-CoV-2 не приводила к изменению экспрессии этих генов.

**Заключение.** Разработанную тест-систему можно использовать для характеристики экспрессии противовирусных эффекторных интерферон-стимулируемых генов, что потенциально поможет в изучении эволюционно выбранных механизмов ускользания вирусов от врожденного иммунного ответа.

**Ключевые слова:** респираторные вирусы; мультиплексная полимеразная цепная реакция; грипп; SARS-CoV-2; лейкоциты; иммунный ответ; интерферон-стимулируемые гены; гены *MxA*, *OAS1*, *PKR*; противовирусное действие.

## COMPARATIVE ANALYSIS OF *MXA*, *OAS1*, *PKR* GENE EXPRESSION LEVELS IN LEUKOCYTES OF PATIENTS WITH INFLUENZA AND CORONAVIRUS INFECTION

Sergey A. Klotchenko<sup>1</sup>, Ekaterina A. Romanovskaya-Romanko<sup>1</sup>, Veronika A. Oleynik<sup>1, 2</sup>, Marya A. Egorova<sup>1</sup>,  
Varvara S. Monakhova<sup>1</sup>, Evgeny V. Venev<sup>1, 3</sup>, Marina A. Plotnikova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg, Russia;

<sup>2</sup> Saint Petersburg State Institute of Technology (Technical University), Saint Petersburg, Russia;

<sup>3</sup> Botkin Clinical Infectious Diseases Hospital, Saint Petersburg, Russia

**For citation:** Klotchenko SA, Romanovskaya-Romanko EA, Oleynik VA, Egorova MA, Monakhova VS, Venev EV, Plotnikova MA. Comparative analysis of *MxA*, *OAS1*, *PKR* gene expression levels in leukocytes of patients with influenza and coronavirus infection. *Medical Academic Journal*. 2023;23(3):65–75. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ623374>

Received: 05.10.2023

Accepted: 15.11.2023

Published: 30.11.2023

### Список сокращений

ISGs — интерферон-стимулируемые гены; ПЦР — полимеразная цепная реакция; ВГА — вирус гриппа А; ВГВ — вирус гриппа В; РСВ — респираторно-синцитиальный вирус.

**BACKGROUND:** The innate immune response, particularly the interferon system, plays a crucial role in defending the host against viral pathogens. Interferon signaling induces the expression of specific antiviral proteins known as interferon-stimulated genes, which inhibit viral replication through various mechanisms.

**AIM:** This study aimed to develop a quantitative PCR system to assess the molecular regulation of human interferon-stimulated genes *MxA*, *OAS1*, and *PKR*, and to determine their expression in blood leukocytes in response to RNA-containing viruses.

**MATERIALS AND METHODS:** Leukocytes were isolated from patients with laboratory-confirmed influenza and COVID-19 infections 3–4 days after symptom onset. *Ex vivo* viral infection was induced using influenza viruses A/California/07/09pdm (H1N1pdm09), B/Malaysia/2506/04 (Vic), strain A2 respiratory syncytial virus, and SARS-CoV-2 HCoV-19/Russia/SPE-R11-3524V/2020.

**RESULTS:** A multiplex qPCR assay was developed for analyzing human *MxA*, *OAS1*, and *PKR* gene expression, with high amplification efficiency. The test system was used to study the molecular regulation of these genes in leukocytes in influenza and COVID-19 patients. The expression levels of *MxA*, *OAS1*, and *PKR* genes were significantly increased in blood leukocytes of hospitalized patients 3–4 days after symptom onset. Stimulation of leukocytes by influenza A, influenza B, and respiratory syncytial virus led to increased mRNA levels of these genes, while stimulation by SARS-CoV-2 did not result in changes in gene expression.

**CONCLUSIONS:** The multiplex test system can be used to characterize the expression of antiviral effector interferon-stimulated genes, aiding in the study of virus evasion from the innate immune response.

**Keywords:** respiratory viruses; multiplex PCR; influenza; SARS-CoV-2; leukocytes; immune response; interferon-stimulated genes, *MxA*, *OAS1*, *PKR*, antiviral effect.

## Обоснование

Первой линией защиты хозяина против инвазии вирусных патогенов служит врожденный иммунный ответ, наиважнейшее звено которого — система интерферонов. Передача сигналов интерфероном индуцирует в клетке-мишени экспрессию широкого спектра специфических противовирусных белков, так называемых интерферон-стимулируемых генов (ISGs).

Наиболее эффективные ISGs напрямую ингибируют репликацию вирусов РНК-центричным образом посредством деградации вирусной РНК, нарушения ее транспорта, ингибирования вирусной трансляции и т. п. [1].

Многочисленные публикации последних лет представили новый взгляд на разнообразие и сложность механизмов, с помощью которых различные ISGs ингибируют вирусы с РНК-геномом [2].

Данное исследование посвящено разработке и созданию мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР), предназначенной для оценки экспрессии таких ISGs, как двухцепочечная РНК-зависимая протеинкиназа R (*PKR*), 2'-5'-олигоденилатсинтетаза (*OAS1*) и белок устойчивости к миксовирусам (*MxA*) в клетках человека.

Экспрессия гена *MxA* контролируется интерферонами I и III типов. *MxA* проявляет прямое противовирусное действие в отношении широкого спектра вирусов [3], напрямую связывая вирусный рибонуклеопротеид и блокируя ядерный импорт вирусных РНК. *PKR* и *OAS1* являются дополнительными (наряду с RIG-1 и MDA5) сенсорами чужеродной двухцепочечной РНК (дцРНК). Связывание с дцРНК активирует *OAS1*, что приводит к синтезу ею 2'-5'-олигоденилатов,

которые, в свою очередь, активируют РНКазу L, участвующую в непосредственном расщеплении цитоплазматических РНК [4]. Аналогично взаимодействие с дцРНК (или другими полианионами) приводит к димеризации и активации *PKR*. Активированная *PKR* подавляет инициацию трансляции посредством фосфорилирования эукариотического фактора инициации 2 (*EIF2AK2*) [5] и действует как преобразователь сигнала для экспрессии провоспалительных генов [6].

Известно, что некоторые вирусы могут манипулировать экспрессией противовирусных ISGs, подавляя клеточный врожденный иммунный ответ. Так, например, подавление вирусом эпидемической диареи свиней PEDV (семейство *Coronaviridae*) экспрессии *PKR*, *OAS1* и *Mx2* на ранних стадиях репродукции в конечном итоге вызывает интенсивную воспалительную реакцию [7]. Известно, что наличие некоторых полиморфизмов в генах *PKR*, *OAS1* и *MxA* ассоциировано с прогрессированием и течением ВИЧ-инфекции [8], гепатита С [9].

В этой связи идентификация и характеристика эффекторных ISGs прямого противовирусного действия потенциально могут раскрыть эволюционно выбранные механизмы защиты от патогенов, которые можно имитировать или которыми можно манипулировать для создания новых методов лечения.

**Цель исследования** — разработка количественной ПЦР-системы для оценки молекулярной регуляции ISGs *MxA*, *OAS1* и *PKR* человека, а также определение экспрессии этих генов в лейкоцитах крови в ответ на инфицирование РНК-содержащими вирусами.

## Материалы и методы

В исследовании приняли участие 14 здоровых доноров, 14 пациентов с гриппом A/H3N2 (эпидемический сезон 2018/2019 гг.) и 14 пациентов с пневмонией, вызванной вирусом SARS-CoV-2, находившихся на лечении в клинической инфекционной больнице им. С.П. Боткина (Санкт-Петербург, Россия) в апреле–мае 2020 г. У пациентов были отмечены следующие симптомы как наиболее яркие клинические проявления: лихорадка, интоксикация (слабость, головная боль, мышечные боли) и/или катарально-респираторный синдром (заложенность носа, насморк, боль в горле, кашель, боль в груди). Включение пациентов в группы A/H3N2 и SARS-CoV-2 проводили на основании положительных результатов диагностики методом ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией, на соответствующие патогены в назофарингеальных мазках с использованием сертифицированных наборов компании «Амплисенс».

Кровь для выделения лейкоцитов отбирали у пациентов на 3–4-й день после появления первых клинических симптомов в вакуумные пробирки с гепарином натрия. Затем в новую пробирку добавляли 8 мл крови, разбавленной DPBS до объема 12 мл, избегая перемешивания, затем добавляли 9 мл реактива Lymphosep (BioWest, #L05600-500, США) и центрифугировали при 400 g в течение 20 мин. Непрозрачную интерфазу с лейкоцитами отбирали и дважды промывали в растворе 2 % фетальной сыворотки FBS (Gibco, США), приготовленной на питательной среде RPMI-1640 (ООО «БиолоТ», Россия).

Используемые в работе вирусные штаммы были получены из коллекции вирусов и клеточных культур ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. Для заражения использовали штаммы вируса гриппа A/California/07/09pdm (H1N1pdm09), вируса гриппа B/Malaysia/2506/04 (Викторианская линия), респираторно-синцитиальный вирус (PCV) штамм A2 и коронавирус hCoV-19/Russia/SPE-RII-3524V/2020 (GISAID ID EPI\_ISL\_415710). Для стимуляции вирусы гриппа накапливали в 10–11-дневных развивающихся куриных эмбрионах, PCV и SARS-CoV-2 — на культурах клеток Hep2 и Vero соответственно. Манипуляции с SARS-CoV-2 проводили в лаборатории биобезопасности уровня BSL-3. Титры вирусов были определены на пермиссивных системах, используемых для накопления. Стимуляцию лейкоцитов, выделенных от здоровых доноров, проводили вирусами в дозах 0,5 (в случае SARS-CoV-2), 1 при вирусах гриппа А и В (ВГА и ВГВ) и 1,5 (PCV)  $\text{moi}$ , добавленных в объеме

100 мкл вирусной суспензии на  $1,4 \cdot 10^6$  лейкоцитов в 100 мкл среды RPMI-1640. После инкубации в течение 1 ч (контакт вируса осуществляли в бессывороточной среде) при 37 °C и 5 %  $\text{CO}_2$  к клеткам вносили среду с добавлением FBS до конечной концентрации 10 %. Анализ паттернов экспрессии ISGs проводили через 24 ч.

Тотальную РНК экстрагировали из клеток реагентом TRIzol (Invitrogen) в соответствии с инструкцией производителя. Качество и концентрацию полученной РНК проверяли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). По значению A260/A280 (в норме  $\geq 1,9$ ) определяли степень чистоты выделенной РНК.

Для удаления геномной ДНК, которой могут быть контаминированы препараты тотальной РНК после выделения препаратом TRIzol, проводили обработку ДНКазой. Все этапы инкубации проводили с использованием набора RQ1 RNase-Free DNase (Promega, США) строго в соответствии с инструкцией производителя. В реакцию брали 1 мкг тотальной РНК.

Для реакции обратной транскрипции использовали 1 мкг РНК (непосредственно после обработки ДНКазой). Для синтеза комплементарной ДНК (кДНК) была необходима реакционная смесь с РНК-зависимой ДНК-полимеразой вируса лейкемии мышей Молони (М-MLV обратной транскриптазы). К РНК добавляли 0,5 мкг олиго-(dT)<sub>16</sub> праймеров и воду до конечного объема 10 мкл. Полученную смесь инкубировали 5 мин при 70 °C для отжига праймеров, затем ее переносили в лед на 2–3 мин. Далее к 10 мкл пробы добавляли 15 мкл смеси по протоколу для обратной транскрипции (М-MLV 1 мкл, dNTP 1,5 мкл, 7,5 мкл воды). В каждый образец с РНК добавляли приготовленную смесь и инкубировали 1 ч при 42 °C, инаktivация проходила 5 мин при 65 °C. Для постановки реакции обратной транскрипции использовали реактивы компании «Биолабмикс» (Новосибирск).

ПЦР в реальном времени проводили с использованием готового набора BioMaster HS-qPCR (2×) (Биолабмикс), куда вносили 1–2 мкл кДНК. Праймеры и олигонуклеотидные зонды были синтезированы компанией «ДНК-Синтез» (Москва). Реакцию проводили в объеме 25 мкл, содержащем от 6,25 до 12,5 пмоль прямого и обратного праймеров и TaqMan зонда. Для проведения ПЦР использовали двухступенчатый температурный профиль: первичная денатурация 95 °C в течение 5 мин, далее 40 двухступенчатых циклов: денатурация 95 °C — 10 с, отжиг праймеров и элонгация цепи 61 °C — 30 с. Амплификацию проводили в термоциклере CFX96 Touch (Bio-Rad). Детекцию осуществляли по росту флуоресценции, наличие

неспецифических продуктов оценивали электрофоретическим разделением продуктов в агарозном геле.

Эффективность амплификации генов рассчитывали по углу наклона стандартной кривой. Для каждого из трех ампликонов *MxA*, *OAS1* и *PKR* приготовили серию 10-кратных разведений и провели ПЦР с использованием одного набора специфических праймеров и зондов (моноплексный формат) или их смеси (мультиплексный формат). Для полученных линейных функций ( $y = \alpha \cdot x + b$ ), отражающих зависимость цикла ПЦР от логарифма разведения образца, были определены углы наклона  $\alpha$ . Далее эффективность рассчитывали по формуле  $E(\%) = (E - 1) \cdot 100 \%$ . Варьированием концентраций праймеров и олигонуклеотидных зондов в ПЦР максимально выравнивали эффективности амплификаций генов интереса в мультиплексном формате.

При постановке мультиплексной ПЦР амплификацию всех генов *MxA*, *OAS1* и *PKR* проводили одновременно в одной пробирке. При этом в пробу ПЦР, содержащую ДНК-зависимую ДНК-полимеразу и прилагаемый к ней буфер, также добавляли все подобранные пары праймеров и олигонуклеотидные зонды, специфически выявляющие заявленные гены. Конечные концентрации праймеров и зондов, содержащиеся в пробе при проведении мультиплексной ПЦР, составляли: hMxA\_F 250 нМ, hMxA\_R 250 нМ, hMxA\_O 100 нМ, hOAS1\_F 500 нМ, hOAS1\_R 500 нМ, hOAS1\_O 200 нМ, hPKR\_F 500 нМ, hPKR\_R 500 нМ, hPKR\_O 200 нМ.

Расчет относительной экспрессии генов проводили по методу  $\Delta\Delta Ct$ , используя *GAPDH* в качестве нормировочного гена. Относительный уровень экспрессии генов рассчитывали по индуктивной формуле  $R = 2^{-[\Delta\Delta Ct]}$ . Все вычисления

осуществляли с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel. Оценку статистической достоверности различий проводили при помощи компьютерной программы GraphPadPrism 6.

## Результаты

Первоначально был проведен дизайн праймеров и олигонуклеотидных зондов, специфически выявляющих матричную РНК (мРНК) генов *MxA*, *OAS1*, *PKR* (субъединицы EIF2AK2) человека. Оригинальные последовательности (см. таблицу) были подобраны к белок-кодирующей области генов таким образом, чтобы праймеры были разделены областью интрона, температуры их плавления были схожи, а длины ампликонов, образующихся в процессе ПЦР, не превышали 300 п.н. В качестве эндогенного контроля, используемого для нормировки, был предложен ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *GAPDH*, ПЦР-система для определения которого была разработана авторами ранее [10].

Подобранные праймеры выявляют все представленные в базе данных NCBI транскрипционные варианты мРНК исследуемых генов: 3 — *MxA*, 4 — *OAS1* и 3 — *PKR*.

Для реализации мультиплексного формата ПЦР в разрабатываемой тест-системе предполагалось использовать TaqMan-зонды, содержащие различные флуоресцентные метки (FAM, ROX и CY5) на 5'-конце. Эффективность амплификации специфических продуктов с использованием разных флуорофоров была дополнительно исследована с использованием зонда, выбранного к гену *MxA* человека. Для этого были заказаны пять олигонуклеотидных зондов, специфически выявляющих ген *MxA* человека, идентичных

Таблица / Table

Подобранные праймеры и TaqMan-зонды для определения экспрессии генов *MxA*, *OAS1* и *PKR*

Selected primers and TaqMan probes for *MxA*, *OAS1*, and *PKR* genes expression analysis

| Ген         | мРНК                                                           | Название праймера | Подобранные праймеры (5'-3')         | Длина продукта ПЦР, п.н. |
|-------------|----------------------------------------------------------------|-------------------|--------------------------------------|--------------------------|
| <i>MxA</i>  | NM_001144925.2<br>NM_002462.5<br>NM_001178046.3                | qH-MxA_F          | GAGACAATCGTGAAACAGCAAATCA            | 105                      |
|             |                                                                | qH-MxA_R          | TATCGAAACATCTGTGAAAGCAAGC            |                          |
|             |                                                                | qH-MxA_O          | FAM-CACTGGAAGAGCCGGCTGTGGATATG-BHQ2  |                          |
| <i>OAS1</i> | NM_016816.4<br>NM_002534.3<br>NM_001032409.3<br>NM_001320151.2 | qH-OAS1_F         | CCAAGGTGGTAAAGGGTGGCT                | 200                      |
|             |                                                                | qH-OAS1_R         | CTGGACCTCAAACCTCACGGAAA              |                          |
|             |                                                                | qH-OAS1_O         | ROX-AGGCCGATCTGACGCTGACCTGGTTGT-BHQ3 |                          |
| <i>PKR</i>  | NM_002759.3<br>NM_001135652.2<br>NM_001135651.3                | qH-PKR_F          | GAAAGCGAACAAGGAGTAAGG                | 175                      |
|             |                                                                | qH-PKR_R          | CCATCCCGTAGGTCTGTGAAA                |                          |
|             |                                                                | qH-PKR_O          | Cy5-AGCCCCAAAGCGTAGAGGTCCACTTCC-BHQ1 |                          |

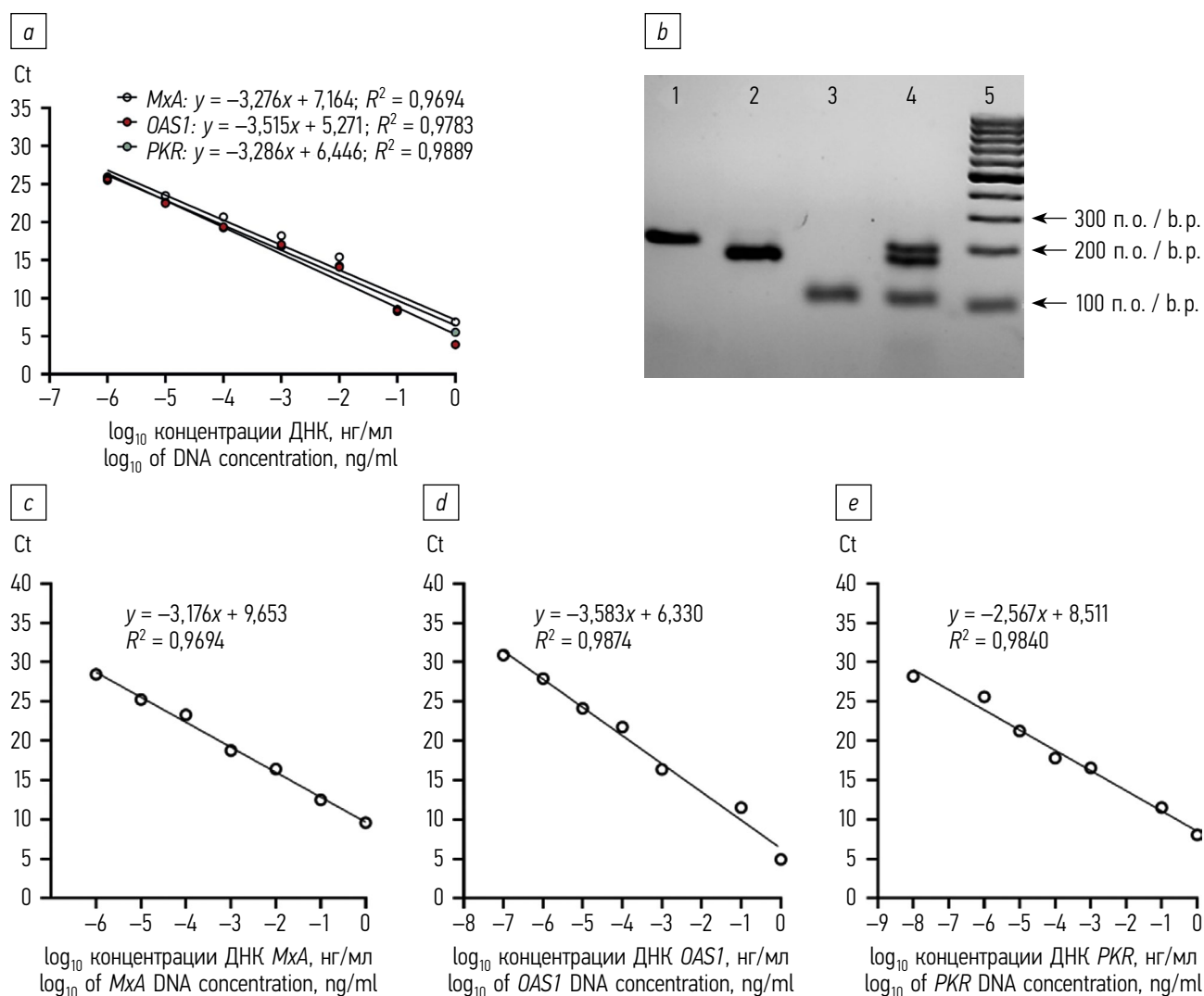


по нуклеотидной последовательности и отличающихся только флуоресцентными метками и гасителями, содержащимися на 5'- и 3'-концах соответственно. Согласно полученным кривым роста (результаты представлены в Приложении, рис. 1), флуорофоры мало влияли на скорость накопления специфического продукта. Во всех рассмотренных реакциях специфический продукт детектировали на 20–21-м пороговом цикле ПЦР, что соответствует погрешности метода, равной  $\pm$  цикл.

В качестве матрицы для оптимизации условий мультиплексной ПЦР были использованы

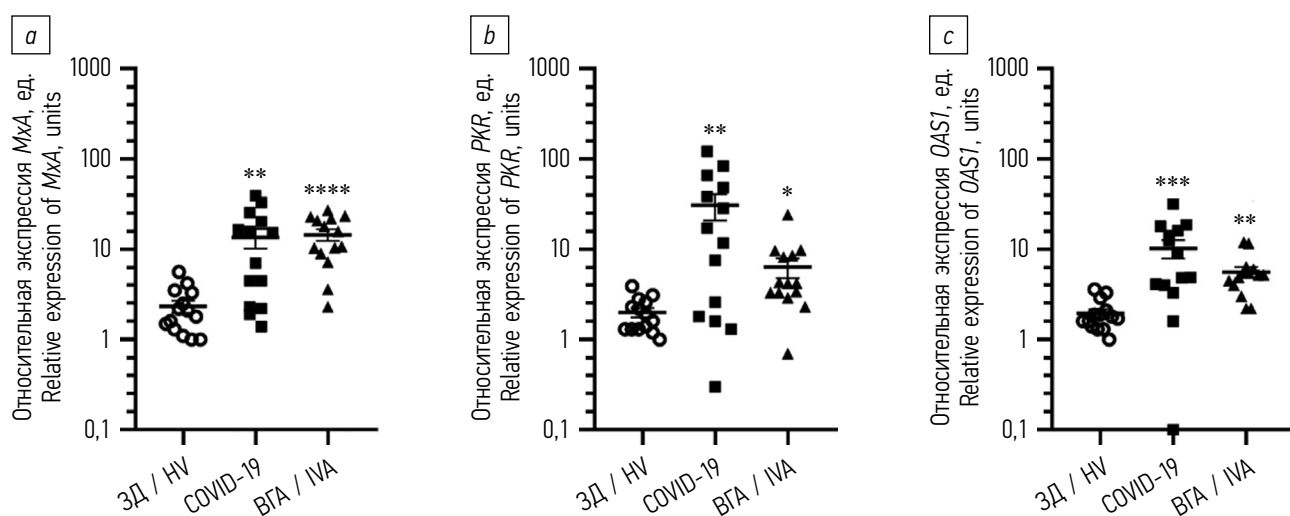
образцы кДНК, полученные методом обратной транскрипции препаратов тотальной РНК, выделенных из клеток A549, инфицированных ВГА. Критериями оптимизации были скорость накопления продуктов амплификации согласно кривой роста флуоресценции (Приложение, рис. 2) и отсутствие неспецифических ампликонов при анализе продуктов ПЦР электрофоретическим разделением в агарозном геле.

Для мультиплексной ПЦР было предложено использовать следующий температурный профиль: первичная денатурация 95 °С — 5 мин; далее 40 двухступенчатых циклов: 1) денатурация



**Рис. 1.** Расчет эффективностей ПЦР в моноплексном и мультиплексном форматах: *a* — мультиплексная амплификация генов *MxA*, *OAS1* и *PKR* (одновременная детекция в одной пробирке); *b* — разделение продуктов ПЦР в агарозном геле: 1 — *OAS1*, 2 — *PKR*, 3 — *MxA*, 4 — одновременная амплификация трех генов в мультиплексной ПЦР, 5 — маркер длин, 100 bp (Fermentas); *c* — стандартная калибровочная кривая, полученная для гена *MxA* в моноплексном формате ПЦР; *d* — стандартная калибровочная кривая, полученная для гена *OAS1* в моноплексном формате ПЦР; *e* — стандартная калибровочная кривая, полученная для гена *PKR* в моноплексном формате ПЦР

**Fig. 1.** Determination of PCR efficiencies in monoplex and multiplex approaches: *a* — multiplex amplification of *MxA*, *OAS1*, and *PKR* genes (simultaneous detection in one tube); *b* — separation of PCR products using agarose gel electrophoresis: 1 — *OAS1*, 2 — *PKR*, 3 — *MxA*, 4 — simultaneous amplification of three genes in multiplex PCR, 5 — DNA Ladder, 100 bp (Fermentas); *c* — standard curve for *MxA* gene in monoplex approach; *d* — standard curve for the *OAS1* gene in monoplex approach; *e* — standard curve for the *PKR* gene in monoplex approach



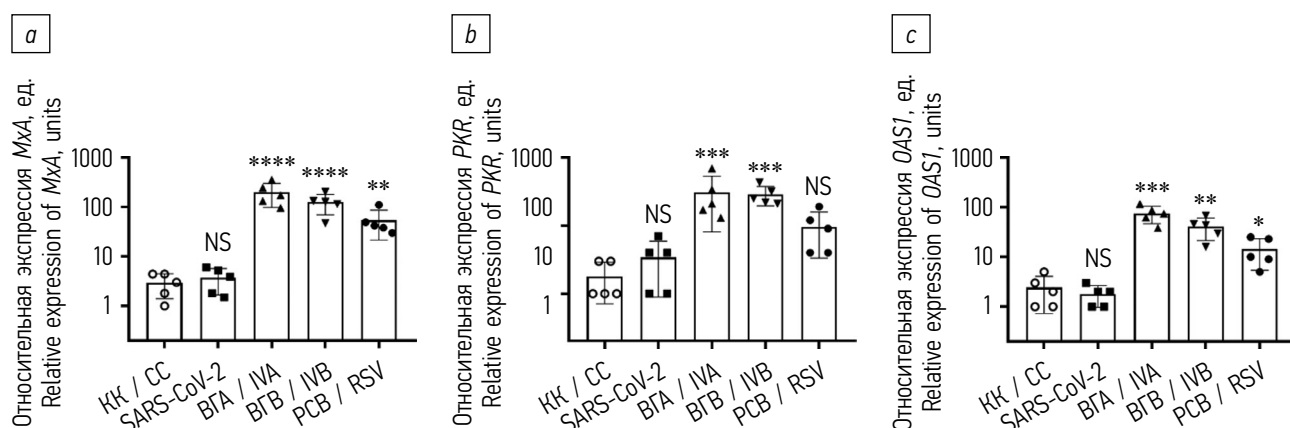
**Рис. 2.** Относительная экспрессия генов *MxA*, *OAS1* и *PKR* в лейкоцитах пациентов с инфекцией вирусом гриппа А (ВГА), новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) и у здоровых добровольцев (ЗД). Достоверность различий экспрессии у групп инфицированных людей по сравнению с группой здоровых добровольцев определяли с использованием непараметрического критерия Краскела – Уоллиса с поправкой Даннетта для множественного сравнения: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$

**Fig. 2.** Relative expression of *MxA*, *OAS1*, and *PKR* genes in leukocytes of patients with influenza infection A (IVA), coronavirus disease (COVID-19), and in healthy volunteers (HV). Statistical significance was determined for groups of infected people compared with a group of healthy volunteers by Kruskal–Wallis test (with pairwise Dunnett’s multiple comparisons test): \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$

95 °C — 10 с; 2) отжиг праймеров и элонгация цепи 61 °C — 30 с.

Для корректного проведения относительного количественного анализа экспрессии ISGs в мультиплексном формате значения эффективностей амплификации соответствующих кДНК должны быть идентичными или максимально прибли-

женными друг к другу. Поэтому далее при подобранных оптимальных условиях были рассчитаны эффективности проводимых ПЦР в моноплексном и мультиплексном форматах (рис. 1). Расчет проводили по углу наклона кривой, полученной в результате постановки ПЦР с серией последовательных разведений подготовленных ампликонов.



**Рис. 3.** Изменение экспрессии генов *MxA* (a), *OAS1* (b) и *PKR* (c) в лейкоцитах, полученных от здоровых добровольцев, в ответ на *in vitro* стимуляцию лейкоцитов вирусами гриппа А (ВГА), В (ВГВ), коронавирусом SARS-CoV-2 и респираторно-синцитиальным вирусом (РСВ) по сравнению с неинфицированными клетками (КК). Достоверность различий в группах, стимулированных вирусами, относительно группы контрольных клеток определяли с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) для парных образцов с коррекцией Холма – Шидака: \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$ ; \*\*\* —  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* —  $p < 0,0001$ ; NS — non-significant, различия недостоверны

**Fig. 3.** Patterns expression of *MxA* (a), *OAS1* (b) and *PKR* (c) genes in leukocytes (from healthy volunteers) in response to *in vitro* stimulation of leukocytes by influenza viruses A (IVA), B (IVB), SARS-CoV-2, and respiratory syncytial virus (RSV) compared to uninfected cells (CC). Statistical significance was determined using single-factor analysis of variance (ANOVA) for paired samples with Holm–Sidak correction for groups stimulated by viruses relative to control cells group: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ; NS is non-significant, the differences are not reliable

Рассчитанные эффективности амплификации трех генов *MxA*, *OAS1* и *PKR* при проведении мультиплексной ПЦР составили: 101,9, 92,5, 101,5 % (рис. 1, *a*) соответственно. Такие эффективности были получены оптимизацией концентраций праймеров и зондов (представлены в разделе «Материалы и методы»). Согласно результатам электрофоретического разделения продуктов мультиплексной и моноплексных ПЦР в агарозном геле в ходе реакции не формируется нежелательных неспецифических продуктов (рис. 1, *b*).

С использованием разработанной тест-системы были оценены уровни экспрессии генов *MxA*, *OAS1* и *PKR* в лейкоцитах, выделенных из крови пациентов с диагностированным гриппом и COVID-19, а также в лейкоцитах, полученных от здоровых доноров. Лабораторное подтверждение диагнозов было выполнено ранее идентификацией соответствующих этиологических агентов (их генетического материала) в назофарингеальных мазках методом ОТ-ПЦР. Лейкоциты были получены из периферической крови госпитализированных пациентов на 3–4-й день от начала заболевания.

Как видно из представленных на рис. 2 результатов, экспрессия мРНК генов *MxA*, *OAS1* и *PKR* в белых клетках крови у инфицированных людей была значимо повышена на 3–4-й день после манифестации заболевания по сравнению со здоровыми добровольцами. Интересно отметить, что экспрессия анализируемых генов в образцах, полученных от пациентов с COVID-19, была более дисперсна. Так, уровни экспрессии *MxA* и *PKR* примерно у 4–5 человек (из 14) были сопоставимы с контрольными пробами.

Дополнительно мы исследовали уровни мРНК генов *MxA*, *OAS1* и *PKR* при стимуляции лейкоцитов РНК-содержащими вирусами (рис. 3). Примечательно, что через 24 ч после инфицирования уровни экспрессии исследуемых генов при стимуляции вирусом SARS-CoV-2 не отличались от уровней в контрольных нестимулированных клетках. В то же время *in vitro* стимуляция клеток ВГА, ВГВ и РСВ приводила к значимому повышению экспрессии *MxA* и *OAS1*, а также к увеличению *PKR* (в случае РСВ, несмотря на недостоверность отличий, также наблюдается тенденция к увеличению экспрессии).

## Обсуждение

Совместное определение уровня экспрессии генов *MxA*, *OAS1* и *PKR* позволяет определить уровень активации врожденной иммунной системы организма и оценить продуктивность интерферон-опосредованного противовирусного ответа. Особенную актуальность данная оценка приобретает при анализе патогенеза острых респиратор-

ных вирусных инфекций, способных к спекуляции иммунным ответом. Наиболее чувствительным и специфичным методом определения уровня экспрессии генов является ПЦР в реальном времени. В данной работе была предложена, разработана и валидирована мультиплексная тест-система, которая позволяет в одном образце одновременно измерять экспрессию трех ISGs, обладающих прямым противовирусным действием.

Разработанная тест-система была предложена для исследования молекулярной регуляции *MxA*, *OAS1* и *PKR* в лейкоцитах при социально значимых инфекциях, таких как грипп и COVID-19. Согласно полученным нами результатам у госпитализированных пациентов на 3–4-й день после появления симптомов заболевания уровни экспрессии генов *MxA*, *OAS1* и *PKR* были значимо повышены на системном уровне в лейкоцитах крови. Индукция этих генов обусловлена JAK/STAT внутриклеточной системой сигнальной трансдукции, активируемой системой интерферона I и III типов, которые формируют первую линию защиты против вирусных инфекций у млекопитающих [11, 12]. Так, многочисленные клинические исследования подтвердили, что экспрессия белка *MxA* в периферической крови является чувствительным и специфическим маркером вирусных инфекций [13]. Тем не менее нас заинтересовал тот факт, что у пациентов с COVID-19 значения экспрессии генов *PKR* и *MxA* были распределены достаточно дисперсно. Примерно для 4–6 пациентов с COVID-19 (примерно треть исследуемых) измеренные уровни мРНК этих генов были сопоставимы с уровнями у неинфицированных добровольцев. Известно, что опосредованное вирусом подавление раннего интерферонового ответа в очаге инфекции и несбалансированная активация иммунных сигнальных сетей регулируют чрезмерный воспалительный иммунный ответ при тяжелом течении COVID-19 [14, 15]. Все исследуемые нами пациенты были госпитализированы в состоянии средней тяжести, летальных исходов не наблюдалось; однако они получали соответствующую терапию, что могло повлиять на дисперсность полученных нами результатов.

Следующим этапом нашей работы было исследование вирус-индуцированной экспрессии генов *MxA*, *OAS1* и *PKR* в лейкоцитах в ответ на стимуляцию их респираторными вирусами. Следует отметить, что используемые в работе лейкоциты были выделены и получены от здоровых волонтеров в период до 2018 г., то есть используемые нами образцы были абсолютно наивны в отношении появившейся в 2019 г. новой коронавирусной инфекции (но не гриппа). Полученные нами результаты свидетельствовали о том, что через 24 ч после инфицирования

SARS-CoV-2 не индуцировал экспрессию *MxA*, *OAS1* и *PKR* в лейкоцитах, в то время как ВГА, ВГВ и РСВ закономерно вызывали повышение уровней мРНК этих генов. Первым нашим предположением было то, что используемый нами вирус SARS-CoV-2 не способен инфицировать лейкоциты. Инфекционность вируса была доказана нами методом обратного титрования (данные не представлены) на перmissive культуре клеток.

В работе J. Kazmierski и соавт. [16] было заявлено о неспособности продуктивной инфекции SARS-CoV и SARS-CoV-2 в лейкоцитах человека ввиду отсутствия на поверхности последних рецептора ACE2, который коронавирусы используют для инвазии [17–19]. Тем не менее показано, что прямая стимуляция моноцитов SARS-CoV-2 сопровождается сильной индукцией ISGs, несмотря на отсутствие обнаруживаемой продуктивной инфекции [16]. В литературе также показано [20], что инфекция SARS-CoV-2 в клетках Calu-3 сопровождалась динамической активацией транскрипции цитокинов IL6, CXCL8, CXCL10, TNF- $\alpha$ , IL1B, а также интерферон-индуцированных факторов вирусной рестрикции, таких как *OAS1* и *Mx1*. Важно отметить, что в первые 24 ч значения экспрессии мРНК *OAS1* и *Mx1* не отличались от контрольных и достигали максимальных значений через 56–60 ч после инфицирования.

Вероятно, SARS-CoV-2 при прямом инфицировании лейкоцитов индуцирует в клетках аберрантный интерфероновый ответ, что выражается в пониженной экспрессии ключевых противовирусных ISGs, таких как *MxA*, *OAS1* и *PKR* на ранних стадиях вирусной инфекции. Вполне возможно, что экспрессия этих генов возрастает на более поздних стадиях инфицирования. Этот отсроченный противовирусный ответ может обеспечить окно для репликации вируса, побуждая манипулятивную стратегию SARS-CoV-2 воздействовать на врожденный иммунный ответ. К сожалению, в нашей работе оценить экспрессию на поздних сроках не представлялось возможным, поскольку дизайн эксперимента представлял собой сравнение разных вирусов (ВГА, ВГВ, РСВ и SARS-CoV-2), а вирус-опосредованное цитопатическое действие при заражении вирусами гриппа и РСВ на поздних сроках приводит к неадекватному измерению экспрессии генов в клетках.

Таким образом, разработанная мультиплексная система для определения экспрессии генов *MxA*, *OAS1* и *PKR*, обладающих противовирусной активностью, может быть важным инструментом для определения инициации иммунной системы в ответ на вирусное заражение, позволяющим оценивать вовлеченность сигнальных путей иммунной регуляции в противовирусное состояние клеток.

## Дополнительная информация

**Источник финансирования.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 23-25-00433: «Изучение противовирусного действия мРНК, кодирующей *MxA* белок человека» (М.А. Плотникова), <https://rscf.ru/project/23-25-00433/>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Все результаты и выводы, представленные в публикации, выполнены лично авторами статьи.

**Соблюдение этических норм.** Исследования с использованием лейкоцитов получили одобрение локальной этической комиссии ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России (заседания № 108 от 03.09.2018 и № 164 от 12.02.2021).

**Вклад авторов.** Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией. Наибольший вклад распределен следующим образом: С.А. Клотченко, Е.А. Романовская-Романько, М.А. Плотникова — идея работы, планирование эксперимента, написание и редактирование рукописи; В.А. Олейник, М.А. Егорова, В.С. Монахова, Е.В. Венёв — участие в исследовании, сбор данных; Е.А. Романовская-Романько, М.А. Плотникова — анализ и интерпретация данных.

## Additional information

**Funding source.** The study was funded by the Russian Science Foundation, project No. 23-25-00433: “Study of the antiviral effect of mRNA encoding human *MxA* protein” (M.A. Plotnikova), <https://rscf.ru/project/23-25-00433/>

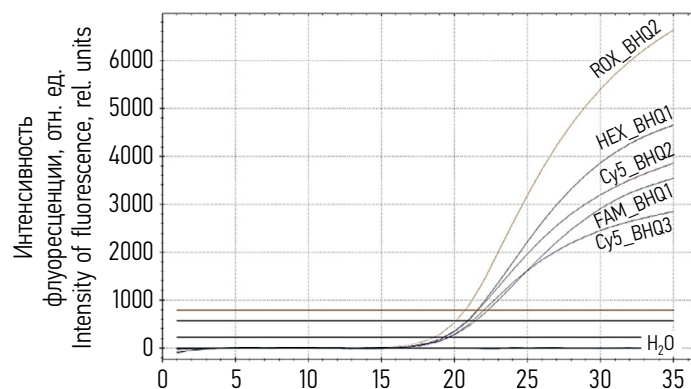
**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest. All results and conclusions presented in the publication were personally produced by the authors of the article.

**Ethics approval.** Research involving leukocytes received approval from the local ethical commission of the Smorodintsev Research Institute of Influenza, Russian Ministry of Health, St. Petersburg, Russia (sessions No. 108 dated 03.09.2018 and No. 164 dated 12.02.2021).

**Authors' contribution.** All authors made a significant contribution to the development of the concept, research, and preparation of the article, read and approved the final version before publication. The largest contributions are distributed as follows: S.A. Klotchenko, E.A. Romanovskaya-Romanko, M.A. Plotnikova — idea of the work, planning the experiment, writing and editing the manuscript; V.A. Oleynik, M.A. Egorova, V.S. Monakhova, E.V. Venev — participation in the study, data collection; E.A. Romanovskaya-Romanko, M.A. Plotnikova — data analysis and interpretation.

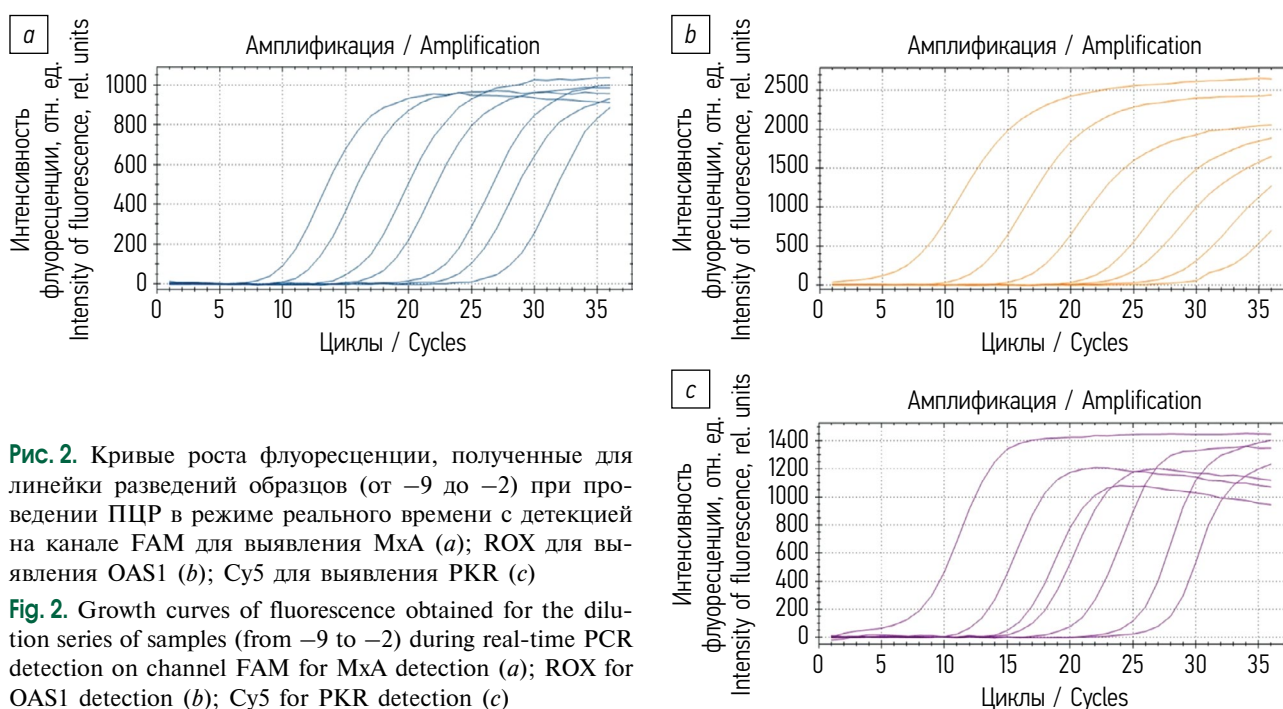


## Приложение / Supplementary



**Рис. 1.** Амплификация гена *MxA* при использовании разных флуорофоров и гасителей

**Fig. 1.** *MxA* gene amplification using different fluorophores and quenchers



**Рис. 2.** Кривые роста флуоресценции, полученные для линейки разведений образцов (от –9 до –2) при проведении ПЦР в режиме реального времени с детекцией на канале FAM для выявления *MxA* (a); ROX для выявления *OAS1* (b); Cy5 для выявления *PKR* (c)

**Fig. 2.** Growth curves of fluorescence obtained for the dilution series of samples (from –9 to –2) during real-time PCR detection on channel FAM for *MxA* detection (a); ROX for *OAS1* detection (b); Cy5 for *PKR* detection (c)

## Список литературы

- Yang E., Li M.M. All about the RNA: interferon-stimulated genes that interfere with viral RNA processes // *Front. Immunol.* 2020. Vol. 11. P. 605024. DOI: 10.3389/fimmu.2020.605024
- Schneider W.M., Chevillotte M.D., Rice C.M. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses // *Annu. Rev. Immunol.* 2014. Vol. 32. P. 513–545. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032713-120231
- Verhelst J., Hulpiau P., Saelens X. Mx proteins: antiviral gatekeepers that restrain the uninvited // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2013. Vol. 77, No. 4. P. 551–566. DOI: 10.1128/MMBR.00024-13
- Al-khatib K., Williams B.R., Silverman R.H. et al. Distinctive roles for OAS and PKR in the *in vivo* anti-viral effect of an adenoviral vector expressing murine IFN- $\beta$  // *J. Immunol.* 2004. Vol. 72, No. 9. P. 5638–5647. DOI: 10.4049/jimmunol.172.9.5638
- Meurs E.F., Watanabe Y., Kadereit S. et al. Constitutive expression of human double-stranded RNA-activated p68 kinase in murine cells mediates phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 and partial resistance to encephalomyocarditis virus growth // *J. Virol.* 1992. Vol. 66, No. 10. P. 5805–5814. DOI: 10.1128/JVI.66.10.5805-5814.1992
- Williams B.R. Signal integration via PKR // *Sci. STKE.* 2001. No. 89. P. re2. DOI: 10.1126/stke.2001.89.re2
- Wang S., Wu J., Wang F. et al. Expression pattern analysis of antiviral genes and inflammatory cytokines in PEDV-infected porcine intestinal epithelial cells // *Front. Vet. Sci.* 2020. Vol. 7. P. 75. DOI: 10.3389/fvets.2020.00075
- Бахтеева Л.Б., Хайбуллина С.Ф., Ломбарди В.К. и др. Значение полиморфизма генов фермента 2',5'-олигоаденилатсинтетазы в прогнозе ВИЧ-инфекции // *Современные технологии в медицине.* 2016. Т. 8, № 1. С. 99–105. DOI: 10.17691/stm2016.8.1.13
- Knapp S., Yee L.J., Frodsham A.J. et al. Polymorphisms in interferon-induced genes and the outcome of hepatitis C virus infection: roles of *MxA*, *OAS-1* and *PKR* // *Genes Immun.* 2003. Vol. 4, No. 6. P. 411–419. DOI: 10.1038/sj.gene.6363984

10. Lozhkov A.A., Plotnikova M.A., Egorova M.A. et al. Simultaneous detection of RIG-1, MDA5, and IFIT-1 expression is a convenient tool for evaluation of the interferon-mediated response // *Viruses*. 2022. Vol. 14, No. 10. P. 2090. DOI: 10.3390/v14102090
11. Sheppard P., Kindsvogel W., Xu W. et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R // *Nat. Immunol.* 2003. Vol. 4, No. 1. P. 63–68. DOI: 10.1038/ni873
12. Stark G.R., Kerr I.M., Williams B.R. et al. How cells respond to interferons // *Annu. Rev. Biochem.* 1998. Vol. 67, No. 1. P. 227–264. DOI: 10.1146/annurev.biochem.67.1.227
13. Savvateeva E.N., Rubina A.Y., Gryadunov D.A. Biomarkers of community-acquired pneumonia: a key to disease diagnosis and management // *Biomed. Res. Int.* 2019. Vol. 2019. P. 1701276. DOI: 10.1155/2019/1701276
14. Blanco-Melo D., Nilsson-Payant B.E., Liu W. et al. Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19 // *Cell*. 2020. Vol. 181, No. 5. P. 1036–1045.e9. DOI: 10.1016/j.cell.2020.04.026
15. Lei X., Dong X., Ma R. et al. Activation and evasion of type I interferon responses by SARS-CoV-2 // *Nat. Commun.* 2020. Vol. 11, No. 1. P. 3810. DOI: 10.1038/s41467-020-17665-9
16. Kazmierski J., Friedmann K., Postmus D. et al. Nonproductive exposure of PBMCs to SARS-CoV-2 induces cell-intrinsic innate immune responses // *Mol. Syst. Biol.* 2022. Vol. 18, No. 8. P. e10961. DOI: 10.15252/msb.202210961
17. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S. et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor // *Cell*. 2020. Vol. 181, No. 2. P. 271–280.e8. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.052
18. Song X., Hu W., Yu H. et al. Little to no expression of angiotensin-converting enzyme-2 on most human peripheral blood immune cells but highly expressed on tissue macrophages // *Cytometry A*. 2023. Vol. 103, No. 2. P. 136–145. DOI: 10.1002/cyto.a.24285
19. Xiong Y., Liu Y., Cao L. et al. Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients // *Emerg. Microbes Infect.* 2020. Vol. 9, No. 1. P. 761–770. DOI: 10.1080/22221751.2020.1747363
20. Faist A., Schloer S., Mecate-Zambrano A. et al. Inhibition of p38 signaling curtails the SARS-CoV-2 induced inflammatory response but retains the IFN-dependent antiviral defense of the lung epithelial barrier // *Antiviral Res.* 2023. Vol. 209. P. 105475. DOI: 10.1016/j.antiviral.2022.105475
5. Meurs EF, Watanabe Y, Kadereit S, et al. Constitutive expression of human double-stranded RNA-activated p68 kinase in murine cells mediates phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 and partial resistance to encephalomyocarditis virus growth. *J Virol.* 1992;66(10):5805–5814. DOI: 10.1128/JVI.66.10.5805–5814.1992
6. Williams BR. Signal integration via PKR. *Sci STKE*. 2001;(89):re2. DOI: 10.1126/stke.2001.89.re2
7. Wang S, Wu J, Wang F, et al. Expression pattern analysis of antiviral genes and inflammatory cytokines in PEDV-infected porcine intestinal epithelial cells. *Front Vet Sci*. 2020;7:75. DOI: 10.3389/fvets.2020.00075
8. Bakhteeva LB, Khaibullina SF, Lombardi VK, et al. Significance of polymorphism in 2',5'-oligoadenylate synthetase genes in HIV infection. *Modern Technologies in Medicine*. 2016;8(1):99–105. DOI: 10.17691/stm2016.8.1.13
9. Knapp S, Yee LJ, Frodsham AJ, et al. Polymorphisms in interferon-induced genes and the outcome of hepatitis C virus infection: roles of MxA, OAS-1 and PKR. *Genes Immun*. 2003;4(6):411–419. DOI: 10.1038/sj.gene.6363984
10. Lozhkov AA, Plotnikova MA, Egorova MA, et al. Simultaneous detection of RIG-1, MDA5, and IFIT-1 expression is a convenient tool for evaluation of the interferon-mediated response. *Viruses*. 2022;14(10):2090. DOI: 10.3390/v14102090
11. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol*. 2003;4(1):63–68. DOI: 10.1038/ni873
12. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, et al. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*. 1998;67(1):227–264. DOI: 10.1146/annurev.biochem.67.1.227
13. Savvateeva EN, Rubina AY, Gryadunov DA. Biomarkers of community-acquired pneumonia: a key to disease diagnosis and management. *Biomed Res Int*. 2019;2019:1701276. DOI: 10.1155/2019/1701276
14. Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu W, et al. Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19. *Cell*. 2020;181(5):1036–1045.e9. DOI: 10.1016/j.cell.2020.04.026
15. Lei X, Dong X, Ma R, et al. Activation and evasion of type I interferon responses by SARS-CoV-2. *Nat Commun*. 2020;11(1):3810. DOI: 10.1038/s41467-020-17665-9
16. Kazmierski J, Friedmann K, Postmus D, et al. Nonproductive exposure of PBMCs to SARS-CoV-2 induces cell-intrinsic innate immune responses. *Mol Syst Biol*. 2022;18(8):e10961. DOI: 10.15252/msb.202210961
17. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*. 2020;181(2):271–280.e8. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.052
18. Song X, Hu W, Yu H, et al. Little to no expression of angiotensin-converting enzyme-2 on most human peripheral blood immune cells but highly expressed on tissue macrophages. *Cytometry A*. 2023;103(2):136–145. DOI: 10.1002/cyto.a.24285
19. Xiong Y, Liu Y, Cao L, et al. Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):761–770. DOI: 10.1080/22221751.2020.1747363
20. Faist A, Schloer S, Mecate-Zambrano A, et al. Inhibition of p38 signaling curtails the SARS-CoV-2 induced inflammatory response but retains the IFN-dependent antiviral defense of the lung epithelial barrier. *Antiviral Res*. 2023;209:105475. DOI: 10.1016/j.antiviral.2022.105475

## References

1. Yang E, Li MM. All about the RNA: interferon-stimulated genes that interfere with viral RNA processes. *Front Immunol*. 2020;11:605024. DOI: 10.3389/fimmu.2020.605024
2. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:513–545. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032713-120231
3. Verhelst J, Hulpiau P, Saelens X. Mx proteins: antiviral gatekeepers that restrain the uninvited. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2013;77(4):551–566. DOI: 10.1128/MMBR.00024-13
4. Al-khatib K, Williams BR, Silverman RH, et al. Distinctive roles for OAS and PKR in the *in vivo* anti-viral effect of an adenoviral vector expressing murine IFN- $\beta$ . *J Immunol*. 2004;172(9):5638–5647. DOI: 10.4049/jimmunol.172.9.5638

## Информация об авторах / Information about the authors

ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия  
*Smorodintsev Research Institute of Influenza, Russian Ministry of Health, Saint Petersburg, Russia*

Сергей Анатольевич Клотченко — канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории гриппозных вакцин.  
 ORCID: 0000-0003-0289-6560;  
 eLibrary SPIN: 2632-6195;  
 e-mail: fosfatik@mail.ru

Sergey A. Klotchenko — Cand. Sci. (Biol.), Senior Research Associate at the Influenza Vaccine Laboratory.  
 ORCID: 0000-0003-0289-6560;  
 eLibrary SPIN: 2632-6195;  
 e-mail: fosfatik@mail.ru

Екатерина Андреевна Романовская-Романько — канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории векторных вакцин.  
 ORCID: 0000-0001-7560-398X;  
 eLibrary SPIN: 1012-8043;  
 e-mail: ekaterina.romanovskaya@influenza.spb.ru

Ekaterina A. Romanovskaya-Romanko, Cand. Sci. (Biol.), Leading Research Associate at the Vector Vaccine Laboratory.  
 ORCID: 0000-0001-7560-398X;  
 eLibrary SPIN: 1012-8043;  
 e-mail: ekaterina.romanovskaya@influenza.spb.ru

Марья Алексеевна Егорова — научный сотрудник лаборатории системной вирусологии.  
 ORCID: 0000-0003-1408-8413;  
 eLibrary SPIN: 6055-1423;  
 e-mail: sci-work\_maria@mail.ru

Marya A. Egorova — Research Associate at the Systemic Virology Laboratory.  
 ORCID: 0000-0003-1408-8413;  
 eLibrary SPIN: 6055-1423;  
 e-mail: sci-work\_maria@mail.ru

Варвара Сергеевна Монахова — научный сотрудник лаборатории генной инженерии и экспрессии рекомбинантных белков.  
 eLibrary SPIN: 2111-8493;  
 e-mail: varvara.bio@gmail.com

Varvara S. Monakhova — Research Associate at the Laboratory of Genetic Engineering and Expression of Recombinant Proteins.  
 eLibrary SPIN: 2111-8493;  
 e-mail: varvara.bio@gmail.com

Марина Александровна Плотникова — канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории векторных вакцин.  
 ORCID: 0000-0001-8196-3156;  
 eLibrary SPIN: 2986-9850;  
 e-mail: biomalinka@mail.ru

Marina A. Plotnikova — Cand. Sci. (Biol.), Senior Research Associate at the Vector Vaccine Laboratory.  
 ORCID: 0000-0001-8196-3156;  
 eLibrary SPIN: 2986-9850;  
 e-mail: biomalinka@mail.ru

ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия  
*Smorodintsev Research Institute of Influenza, Russian Ministry of Health, Saint Petersburg, Russia*

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)», Санкт-Петербург, Россия  
*Saint Petersburg State Institute of Technology (Technical University), Saint Petersburg, Russia*

Вероника Андреевна Олейник — лаборант-исследователь лаборатории гриппозных вакцин; студент.  
 e-mail: working.lyutik@gmail.com

Veronika A. Oleynik — Research Laboratory Assistant at the Influenza Vaccine Laboratory; student.  
 e-mail: working.lyutik@gmail.com

ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия  
*Smorodintsev Research Institute of Influenza, Russian Ministry of Health, Saint Petersburg, Russia*

СПб ГБУЗ «Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина», Санкт-Петербург, Россия  
*Botkin Clinical Infectious Diseases Hospital, Saint Petersburg, Russia*

Евгений Валерьевич Венёв — старший преподаватель; врач-инфекционист.  
 e-mail: imberbis@gmail.com

Evgeny V. Venev — Senior Lecturer; infectious disease doctor.  
 e-mail: imberbis@gmail.com

## ✉ Контактное лицо / Corresponding author

Сергей Анатольевич Клотченко / Sergey A. Klotchenko  
 Адрес: Россия, 197022, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17  
 Address: 15/17 Prof. Popov St., Saint Petersburg, 197022, Russia  
 E-mail: fosfatik@mail.ru