

А. С. Бавыкин<sup>1</sup>, Д. В. Мишин<sup>2</sup>, А. В. Карпукхин<sup>1</sup>, П. Г. Дерябин<sup>2</sup>

## Способность малых интерферирующих РНК-олигонуклеотидов снижать инфекционную активность вируса гепатита С в культурах клеток

<sup>1</sup>Учреждение Российской академии медицинских наук Медико-генетический научный центр РАМН, Москва; <sup>2</sup>ФГБУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского Минздравсоцразвития России, Москва

С помощью метода РНК-интерференции были получены данные о противовирусной активности малых интерферирующих РНК-олигонуклеотидов (миРНК) в отношении инфекции, вызванной вирусом гепатита С (ВГС) в культурах клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ). Механизм РНК-интерференции основан на специфическом распознавании мРНК-мишени с помощью специально сконструированных малых (19–22 пары оснований) интерферирующих РНК-олигонуклеотидов (миРНК, или siRNA). В частности показано, что обработка монослоя клеток СПЭВ, инфицированных ВГС, миРНК приводила к защите зараженных клеток от цитопатогенного действия вируса. Результаты были подтверждены в опытах, в которых была обнаружена способность РНК-олигонуклеотидов снижать продукцию инфекционного (цитопатогенного) ВГС инфицированными клетками СПЭВ в ранних стадиях инфекции.

Ключевые слова: малые интерферирующие РНК, вирус гепатита С, культура клеток, противовирусная активность, инфекционные свойства

### The ability of small interfering RNA oligonucleotides to decrease the infective activity of hepatitis C virus in the cell cultures

A. S. Bavykin<sup>1</sup>, D. V. Mishin<sup>2</sup>, A. V. Karpukhin<sup>1</sup>, P. G. Deryabin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Molecular Genetics Research Center, Russian Academy of Medical Sciences; <sup>2</sup>D. I. Ivanovsky Research Institute of Virology, Ministry of Health and Social Development of Russia, Moscow

The use of the RNA interference technique yielded data on the antiviral activity of small interfering RNA (siRNA) oligonucleotides against hepatitis C virus (HCV) infection in the pig embryo kidney (SPEV) cell cultures. The RNA interference technique is based on the specific recognition of the mRNA target by using the specially designed siRNA (19–22 bp) oligonucleotides. In particular, it was shown that siRNA added to the monolayer of HCV-infected SPEV cells resulted in the protection of the infected cells against the cytopathogenic activity of the virus. The results were confirmed in the experiments that demonstrated the ability of RNA oligonucleotides to reduce the production of infectious (cytopathogenic) HCV by infected SPEV cells in early-stage infection.

Key words: small interfering RNA oligonucleotides, hepatitis C virus, cell culture, antiviral activity, infective properties

Гепатит С является одной из наиболее серьезных проблем здравоохранения в глобальном масштабе. По консервативным оценкам, во всем мире вирусом гепатита С (HCV, Hepatitis C virus) инфицировано около 170 млн человек с ежегодным приростом числа инфицированных от 3 до 4 млн [1, 6]. Возбудителем инфекции является HCV, относящийся к семейству *Flaviviridae* [6]. В 85% случаев ВГС вызывает хроническое заболевание, которое в дальнейшем может приводить к циррозу печени, а также к хроническому поражению многих органов и тканей человека, а впоследствии – к развитию гепатоцеллюлярной карциномы [1, 6].

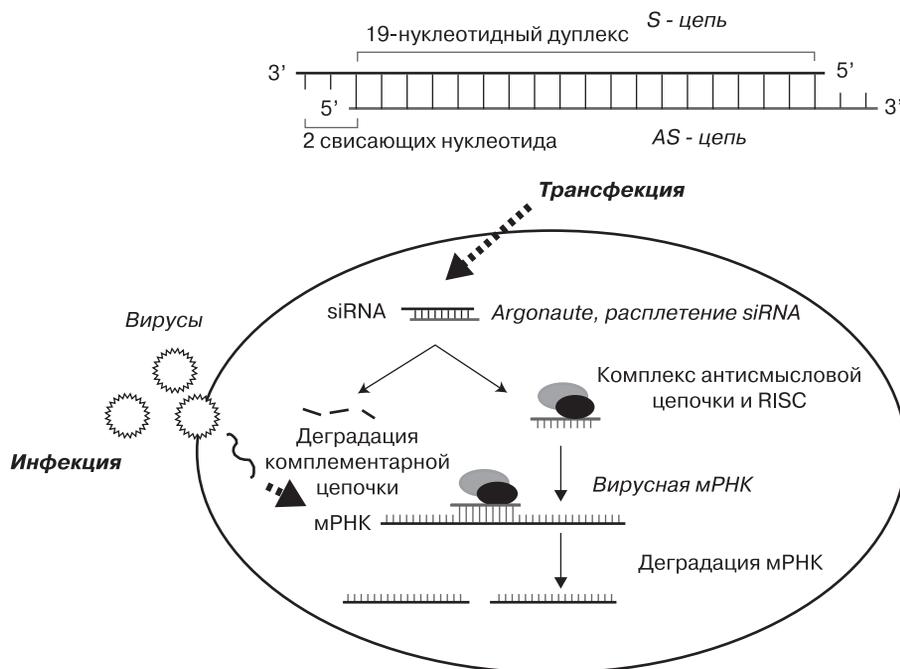
Основными препаратами для лечения гепатита С являются интерфероны в сочетании с рибавирином (вирозол). В зависимости от влияния различных факторов, связанных с особенностями вируса или течением инфекции у пациента, эффективность такого комбинированного лечения не превышает 40–60%. Невысокая эффективность лечения усугубляется побочным действием препаратов: интерфероны вызывают длительное и выраженное общее недомогание и депрессию, а применение рибавирина ведет к появлению гемолитической анемии.

Таким образом, в настоящее время остро встает вопрос поиска альтернативных путей терапии ВГС-инфекции, решение которого в течение длительного времени было затруднено из-за недоступности надежных моделей инфекции, вызванной ВГС в клеточных культурах, необходимых для доклинических испытаний противовирусной активности соединений. Впервые созданная нами лабораторная модель инфекции, вызванной ВГС в культурах клеток, открыла перспективу для широкого скрининга соединений с целью поиска альтернативных путей лечения ВГС-инфекции [2–5].

В последние годы в мире наметилось динамично развивающееся направление в лечении вирусных инфекций [8, 9], связанное с применением метода РНК-интерференции [7]. Данный метод основан на специфическом распознавании РНК-мишени с помощью специально сконструированных малых (19–22 пары оснований) интерферирующих РНК-олигонуклеотидов (миРНК, или siRNA). Попадая внутрь клетки, миРНК образуют комплекс с мРНК-мишенью на уровне комплементарного взаимодействия. Это приводит к нарушению синтеза вирусных

Контактная информация:

Бавыкин Андрей Сергеевич, канд. мед. наук, ст. науч. сотр.; e-mail:bavykinas@mail.ru



Механизм РНК-интерференции в клетке.

Малые интерферирующие РНК (миРНК) (вверху рисунка) представляют собой РНК-РНК-дуплекс в виде двух цепей -- смысловой S и антисмысловой AS. Цепи синтезируют искусственно и затем гибридизуют друг с другом таким образом, чтобы сформировался дуплекс с неспаренными 3'-концами; они служат для распознавания дуплекса внутриклеточными эндонуклеазами. МиРНК доставляют в инфицированную клетку с использованием метода трансфекции. Внутри клетки миРНК расщепляются белком Argonaute, после чего антисмысловая AS в составе белкового комплекса RISC (RNA Induced Silencing Complex) комплементарно взаимодействует с вирусной мРНК, что блокирует трансляцию последней и в конечном счете приводит к ее деградации.

белков на мРНК-матрице и подавлению сборки вирусных белков (см. рисунок).

Метод РНК-интерференции позволяет точно подобрать РНК-олигонуклеотиды, подобно праймерам в ПЦР, для нужных участков мРНК.

Цель данной работы – изучить противовирусную активность сконструированных миРНК в отношении инфекции, вызванной ВГС в культурах клеток.

### Материалы и методы

**Культуры клеток.** Для изучения противовирусной активности сконструированных миРНК использовали чувствительные к репродукции ВГС перевиваемые культуры клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ). Культуры выращивали в виде 2-дневного монослоя в 48-луночных пластиковых культуральных панелях на среде 199 (производство НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН) с добавлением 100 ЕД/мл пенициллина и стрептомицина и 10% сыворотки крупного рогатого скота.

**Вирус.** В исследованиях использовали цитопатогенный вариант ВГС штамм С-13 [2–4]. Этот вариант вируса выделен из сыворотки крови больной хроническим гепатитом С, положительной на РНК ВГС (генотип 1b). В работе использовали ВГС-содержащую культуральную жидкость, собранную из инфицированных культур клеток СПЭВ в стадии цитодеструкции; инфекционный титр ВГС составлял  $8,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ .

**Малые интерферирующие РНК (миРНК).** Подбор последовательностей миРНК ВГС осуществляли посредством сравнительного анализа наиболее консервативных участков генома ВГС. Подобранные миРНК позволяют взаимодействовать с областью III домена

на 5'-UTR области генома ВГС. РНК-нуклеотиды этой области формируют петлевые структуры, распознающие 40S-домен внутриклеточных рибосом и отвечают за инициацию трансляции вирусных белков. Последовательность нуклеотидов в этой области является наиболее консервативной среди абсолютного большинства вариантов ВГС, позволяя таким образом использовать данные миРНК для дальнейшей терапии ВГС независимо от субтипов ВГС. Синтезированные миРНК для мишени представляют собой 2 нити длиной 19–21 пара оснований в виде смысловой и антисмысловой нити (смысловая: GUACUGCU-GAUAGGGUGCdTdT, антисмысловая: GCACCCUAUCA GGCA-GUACdTT). Перед проведением трансфекции из нитей получали дуплексы, которые обеспечивают устойчивость миРНК для внутриклеточных нуклеаз. На концах 3' – концах РНК-дуплексов имеются по два выступающих дезокси-Т (dTdT), которые распознаются внутриклеточными нуклеазами.

**Трансфекция миРНК в клетки, инфицированные ВГС.** Трансфекция миРНК проводилась с помощью липофектамина с использованием набора для трансфекции (RNAiMAX, “Invitrogen”) интерферирующих РНК, предназначенного для клеточных линий, живущих в виде монослоя клеток.

С этой целью культуры клеток СПЭВ рассеивали в лунки двух 48-луночных культуральных планшетов за 2 сут до трансфекции. При этом посевную концентрацию клеток рассчитывали таким образом, чтобы на следующий день в лунках был сформирован монослой клеток, покрывающий не более 50% дна лунки. За 1 сут до трансфекции в лунках с монослоем клеток меняли питательную среду на среду поддержки (с содержанием 1% сыворотки, без антибиотиков). Затем выделяли контрольные лунки с монослоем клеток: а) без добавления миРНК, не зараженные ВГС (контроль клеток); б) культура клеток, инфицированных вирусом, без добавления миРНК (контроль вируса); в) культуры клеток, трансфицированные миРНК, неинфицированные ВГС (контроль препарата, в частности его способность индуцировать цитотоксический эффект). В опытных лунках с монослоем клеток СПЭВ за 1 ч до трансфекции миРНК клетки были инфицированы ВГС в дозах 1,0; 0,1 и 0,01  $\text{ТЦД}_{50}/\text{клетка}$ . После 1 ч инкубации неадсорбированный вирус из лунок был удален и к монослою клеток добавляли смеси миРНК с липофектамином в режиме прямой трансфекции в соответствии с протоколом. Приготовление смесей с липофектамином проводили в соответствии с инструкцией набора. Конечная концентрация миРНК в лунках составляла 4 нМ и более.

Результаты учитывали двумя способами: оценивали влияние миРНК на жизнеспособность клеток, инфицированных ВГС; определяли титр ВГС в пробах сре-

Таблица 1

## Влияние миРНК на выживаемость клеток, инфицированных ВГС

| Варианты опыта                     | Погибшие инфицированные ВГС клетки в моно-слое в зависимости от трансфекции миРНК, % |    |    |     |     |     |
|------------------------------------|--|----|----|-----|-----|-----|
|                                    | 1  | 1  | 1  | кв  | кв  | кв  |
| Доза 0,01 ТЦД <sub>50</sub> /лунка | 0  | 0  | 0  | 5   | 5   | 5   |
| Доза 0,1 ТЦД <sub>50</sub> /лунка  | 0  | 0  | 0  | 100 | 100 | 100 |
| Доза 1,0 ТЦД <sub>50</sub> /лунка  | 80   | 90 | 85 | 100 | 100 | 100 |

Примечание. Здесь и в табл. 2: 1 – 4 нмоль миРНК дуплекса; кв – культуры клеток, инфицированные ВГС без добавления миРНК.

Таблица 2

## Влияние миРНК на способность клеток, инфицированных ВГС, продуцировать инфекционный для культур клеток СПЭВ вирус через 48 ч после заражения и внесения препаратов

| Варианты опыта                     | Титр вируса гепатита С в Ig ТЦД <sub>50</sub> для культур СПЭВ в среде инфицированных культур клеток через 48 ч после заражения клеток и трансфекции миРНК |     |     |     |     |     |
|------------------------------------|--|-----|-----|-----|-----|-----|
|                                    | 1  | 1   | 1   | кв  | кв  | кв  |
| Доза 0,01 ТЦД <sub>50</sub> /лунка | 0  | 0   | 0   | 1,5 | 2,0 | 1,5 |
| Средние данные                     |  | 0   |     |     | 1,7 |     |
| Доза 0,1 ТЦД <sub>50</sub> /лунка  | 0  | 0   | 3,0 | 7,2 | 7,0 | 7,1 |
| Средние данные                     |  | 1,0 |     |     | 7,1 |     |
| Доза 1,0 ТЦД <sub>50</sub> /лунка  | 6,9  | 7,0 | 7,1 | 7,1 | 7,2 | 7,0 |
| Средние данные                     |  | 7,0 |     |     | 7,1 |     |

ды, отобранных из лунок с монослоем клеток СПЭВ через 48 ч после заражения ВГС.

## Результаты и обсуждение

До сих пор из наиболее серьезных проблем, связанных с гепатитом С, является создание и разработка современных и эффективных способов лечения этой инфекции, характеризующейся чаще всего скрытым течением, серьезными последствиями для организма и необычайной вариабельностью генома вируса, что создает большие сложности в поиске средств эффективного лечения гепатита С. В последние несколько лет большой интерес фармакологов направлен на новый способ борьбы с РНК-содержащими вирусами, который получил название РНК-интерференции.

Представляло интерес изучить возможность подавления репликации ВГС с использованием миРНК, способных взаимодействовать с геномом ВГС. Проводили также исследование цитотоксичности миРНК.

Получены данные, свидетельствующие об отсутствии цитотоксических свойств у миРНК в используемых концентрациях.

Данные табл. 1 и 2 указывают на способность миРНК защищать инфицированные ВГС клетки от цитопатогенного действия вируса. Получены также данные, свидетельствующие о способности миРНК снижать инфекционную активность ВГС, продуцируемого культурами клеток СПЭВ в ранних стадиях инфекции. В опытах были использованы разные дозы ВГС, применяемые для заражения культур кле-

ток СПЭВ. Показано, что оптимальной дозой вируса является доза 0,1 ТЦД<sub>50</sub>/лунка, при которой были получены наиболее отличимые результаты изучения активности миРНК (см. табл. 1 и 2).

Сходные данные были получены при изучении способности РНК-олигонуклеотидов снижать инфекционные титры ВГС, продуцируемые клетками СПЭВ в ранних стадиях инфекции (см. табл. 2). Обнаружено, что в опытах, в которых использовали ВГС в дозе 0,1 ТЦД<sub>50</sub>/лунка, продукция ВГС трансфицированными миРНК снижалась более чем на 6,0 lg (максимальный эффект, средние данные). Показано, что при высоких дозах заражения клеток СПЭВ противовирусный эффект отсутствовал, а при низких дозах заражения обнаружено полное подавление продукции ВГС клетками, содержащих миРНК.

Результаты, представленные в табл. 2, в определенной степени согласуются с результатами исследования способности олигонуклеотидов защищать инфицированные ВГС клетки от цитопатогенного действия вируса (см. табл. 1).

Таким образом, в результате исследований получены данные, свидетельствующие о способности РНК-олигонуклеотидов снижать инфекционную активность продуцируемого клетками СПЭВ ВГС и защищать инфицированные культуры клеток от цитопатогенного действия вируса.

Ранее в проведенных нами экспериментальных исследованиях *in vitro* было показано, что обработка клеток, инфицированных ВГС, интерфероном альфа (основной препарат, используемый в настоящее время для лечения гепатита С) приводила к снижению продукции ВГС клетками приблизительно на 2,0 lg ТЦД<sub>50</sub> [5]. Таким образом, противовирусный эффект интерферона в значительной мере уступает способности РНК-олигонуклеотидов подавлять продукцию инфекционного ВГС *in vitro*, что явно свидетельствует о перспективе использования миРНК как противовирусных соединений.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Львов Д. К., Самохвалов Е. И., Миширо С. и др. Закономерности распространения вируса С и его генотипов в России и странах СНГ // Вопр. вирусол. – 1997. – № 4. – С. 157–161.
2. Дерябин П. Г., Вязов С. О., Исаева Е. И. и др. Персистенция вируса гепатита С в культурах клеток головного мозга мышей-сосунков // Вопр. вирусол. – 1997. – № 6. – С. 254–258.
3. Дерябин П. Г., Львов Д. К. Высокопродуктивный вариант вируса гепатита С. Выделение, характеристика, идентификация // Докл. АН РФ. – 1998. – Т. 358, № 5. – С. 688–691.
4. Дерябин П. Г., Исаева Е. И., Гренкова Е. П., Сухно А. С. – Цитопатогенные варианты вируса гепатита С (ВГС), пригодные для разработки вакцины // Аллергия, астма и клин. иммунол. – 2001. – № 1. – С. 23–28.
5. Дерябин П. Г., Мезенцева М. В., Вершинина М. Ю. и др. Противовирусный эффект  $\alpha$ -интерферона и активность РНК циткинов в культурах клеток, инфицированных цитопатогенным вариантом вируса гепатита С // Вопр. вирусол. – 2003. – № 1. – С. 26–30.
6. Bacon B. R. Assessing evidence from clinical trials in chronic hepatitis C // J. Viral Hepatit. – 2006. – Vol. 13 (suppl. 1). – P. 1–5.
7. Fire A., Xu S., Montgomery M. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* // Nature. – 1998. – Vol. 391, N 6669. – P. 806–811.
8. Fischer L. T. RNAi, a new therapeutic strategy against viral infection // Cell Res. – 2004. – Vol. 14. – P. 460–466.
9. Huang D. D. The potential of RNA interference-based therapies for viral infections // Curr. HIV/AIDS reports. – 2008. – Vol. 5, N 1. – P. 33–39.

Поступила 29.09.11