

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 578.832.1.083.2

Петрова-Бродская А.В.^{1,2}, Бондаренко А.Б.^{1,3}, Тимин А.С.^{2,4}, Плотникова М.А.¹, Афанасьев М.В.³, Семенова А.А.⁵, Лебедев К.И.¹, Горшков А.Н.^{1,7}, Горшкова М.Ю.⁶, Егоров В.В.¹, Клотченко С.А.¹, Васин А.В.^{1,2}

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТЕЙ ИНГИБИРОВАНИЯ ВИРУСА ГРИППА А *IN VITRO* КОМПЛЕКСАМИ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК С ПРОИЗВОДНЫМИ ХИТОЗАНА, ПОЛИЭТИЛЕНИМИНОМ И ГИБРИДНЫМИ МИКРОКАПСУЛАМИ НА ОСНОВЕ ПОЛИАРГИНИНА С НЕОРГАНИЧЕСКИМИ КОМПОНЕНТАМИ

¹ ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург;

² ФГАО УВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», 195251, г. Санкт-Петербург;

³ ФГБУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», 199034, г. Санкт-Петербург;

⁴ ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», 634050, г. Томск;

⁵ ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург;

⁶ ФГБУН «Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева» РАН, 119991, г. Москва

⁷ ФГБУН «Институт цитологии» РАН, 194064, г. Санкт-Петербург

Механизм РНК-интерференции открывает широкие возможности при создании новых препаратов для лечения гриппа. Он позволяет точно воздействовать на консервативные участки вирусных генов и блокировать их экспрессию. Проведена сравнительная оценка различных носителей для внутриклеточной доставки малых интерферирующих РНК: метилгликольхитозана, кватернизованного хитозана, полиэтиленимина и гибридных микрокапсул на основе полиаргинина с неорганическими компонентами. Кроме того, оценивали противовирусную активность трех малых интерферирующих РНК, направленных на гены NP (NP-717, NP-1496) и PA (PA-1630) вирусов гриппа А, в зависимости от выбранного носителя. По результатам исследования наиболее эффективные внутриклеточная доставка и противовирусная активность были показаны для гибридных микрокапсул.

Ключевые слова: вирус гриппа; противовирусная активность; малые интерферирующие РНК; системы доставки; хитозан; полиэтиленимин; гибридные микрокапсулы.

Для цитирования: Петрова-Бродская А.В., Бондаренко А.Б., Тимин А.С., Плотникова М.А., Афанасьев М.В., Семенова А.А., Лебедев К.И., Горшков А.Н., Горшкова М.Ю., Егоров В.В., Клотченко С.А., Васин А.В. Сравнение эффективностей ингибирования вируса гриппа А *in vitro* комплексами малых интерферирующих РНК с производными хитозана, полиэтиленимином и гибридными микрокапсулами на основе полиаргинина с неорганическими компонентами. *Вопросы вирусологии.* 2017; 62(6): 259-265. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-6-259-265>

Petrova-Brodskaya A.V.^{1,2}, Bondarenko A.B.^{1,3}, Timin A.S.^{2,4}, Plotnikova M.A.¹, Afanas'ev M.V.^{1,3}, Semenova A.A.⁵, Lebedev K.I.¹, Gorshkov A.N.^{1,7}, Gorshkova M.Yu.⁶, Egorov V.V.¹, Klotchenko S.A.¹, Vasin A.V.^{1,2}

COMPARISON OF INFLUENZA A VIRUS INHIBITION *IN VITRO* BY siRNA COMPLEXES WITH CHITOSAN DERIVATIVES, POLYETHYLENIMINE AND HYBRID POLYARGININE-INORGANIC MICROCAPSULES

¹ Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376, Russian Federation;

² Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251, Russian Federation;

³ St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034, Russian Federation;

⁴ National Research Tomsk Polytechnic University, 634050, Tomsk, Russian Federation;

⁵ St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy, St. Petersburg, 197376, Russian Federation;

⁶ A.V. Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, Moscow, 119991, Russian Federation

⁷ Institute of Cytology, St. Petersburg, 194064, Russian Federation

Anti-influenza drugs and vaccines have a limited effect due to the high mutation rate of virus genome. The direct impact on the conservative virus genome regions should significantly improve therapeutic effectiveness. The RNA interference mechanism (RNAi) is one of the modern approaches used to solve this problem. In this work, we have investigated the antiviral activity of small interfering RNA (siRNA) against the influenza A/PR/8/34 (H1N1), targeting conserved regions of NP and PA. Polycations were used for intracellular siRNA delivery: chitosan's derivatives (methylglycol and quaternized chitosan), polyethyleneimine, lipofectamine, and hybrid organic/non-organic microcapsules. A comparative study of these delivery systems with fluorescent labeled

Для корреспонденции: Петрова-Бродская Александра Валерьевна, мл. науч. сотр. лаб. внутриклеточного сигналинга и транспорта «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург. E-mail: alexandra.b_05@mail.ru

siRNA was conducted. The antiviral activity of three small interfering RNAs targeting the NP (NP-717, NP-1496) and PA (PA-1630) influenza A viruses genes was demonstrated, depending on the chosen carrier. The most effective intracellular delivery and antiviral activity were observed for hybrid microcapsules.

Key words: *antiviral activity; NP, PA, small interfering RNA (siRNA); delivery systems; lipofectamine; chitosan; polyethyleneimine; microcapsules.*

For citation: Petrova-Brodskaya A.V., Bondarenko A.B., Timin A.S., Plotnikova M.A., Afanas'ev M.V., Semenova A.A., Lebedev K.I., Gorshkov A.N., Gorshkova M.Yu., Egorov V.V., Klotchenko S.A., Vasin A.V. Comparison of influenza A virus inhibition in vitro by siRNA complexes with chitosan derivatives, polyethyleneimine and hybrid polyarginine-inorganic microcapsules. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(6): 259-265. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-6-259-265>

For correspondence: Alexandra V. Petrova-Brodskaya, Research assistant in the Laboratory of intracellular signaling and transport, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376, Russian Federation. E-mail: alexandra.b_05@mail.ru

Information about authors:

Petrova-Brodskaya A.V., <http://orcid.org/0000-0001-5130-3755>; Timin A.S., <http://orcid.org/0000-0002-0276-7892>;
Plotnikova M.A., <https://orcid.org/0000-0001-8196-3156>; Gorshkov A.N., <http://orcid.org/0000-0003-2303-1144>;
Gorshkova M.Yu., <http://orcid.org/0000-0002-6249-1031>; Egorov V.V., <http://orcid.org/0000-0002-3670-8962>;
Klotchenko S.A., <http://orcid.org/0000-0003-0289-6560>; Vasin A.V., <http://orcid.org/0000-0002-1391-7139>

Acknowledgment. This work was supported by the Russian Science Foundation (Grants No. 15-15-00170, No. 17-73-10023).

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

Received 17 August 2017

Accepted 25 August 2017

Введение

Грипп — острая респираторная инфекция, вызывающая сезонные эпидемии и периодические пандемии. Этиологическим агентом заболевания являются одноименные (–)РНК-содержащие вирусы семейства Orthomyxoviridae. Для вирусов гриппа характерна чрезвычайно высокая степень генетической изменчивости, приводящая к быстрому развитию устойчивости к противовирусным препаратам и вакцинам [1, 2]. Для решения этой проблемы необходимы новые подходы к разработке средств лечения гриппа, к которым относится, например, применение малых интерферирующих РНК (siРНК) [3].

РНК-интерференция — это осуществляемый малыми РНК высокоспецифичный механизм подавления экспрессии генов на уровне мРНК, приводящий к блокированию трансляции. РНК-интерференция может использоваться для выключения определенных генов в экспериментальной биологии и биотехнологии, а также в медицине для лечения инфекционных, наследственных и онкологических заболеваний [4–6]. В ряде исследований была продемонстрирована эффективность siРНК для ингибирования вируса гриппа и других респираторных вирусов [7, 8]. Однако практическое применение терапевтических siРНК осложнено их низкой стабильностью, необходимостью использования эффективных и безопасных средств доставки в клетки-мишени, а также возможной иммуногенностью [9, 10]. Для преодоления подобных барьеров активно ведутся поиски новых систем доставки малых РНК, отвечающих таким параметрам, как способность связывать нуклеиновые кислоты, биосовместимость, биодеградация, низкая токсичность и высокая эффективность трансфекции клеток.

В работе приведены сравнительные исследования эффективности различных носителей (Lipofectamine® 2000, полиэтиленимин (ПЭИ), производные хитозана, гибридные микроконтейнеры на основе полиаргинина с неорганическими компонентами) для доставки противовирусных siРНК, направленных на гены вирусов гриппа А, кодирующие субъединицу полимеразы PA и нуклеопротеин NP. При обработке клеток исследуемыми препаратами (siРНК в составе комплексов с трансфецирующим агентом) и их последующем заражении вирусом гриппа было показано существенное снижение

репродукции вирусных частиц как в самих клетках, так и во внеклеточной среде. Наименьшая токсичность, наибольшие эффективность трансфекции клеток и противовирусный эффект среди всех изученных систем доставки были показаны для гибридных микрокапсул. Полученные в работе данные могут быть использованы для последующего исследования противовирусной активности siРНК на животной модели инфекции.

Материал и методы

Материал. Трансфекционные агенты: ПЭИ (P3143, «Sigma-Aldrich»), Lipofectamine® 2000 (11668019, «Invitrogen»), метилгликольхитозан (МГХ) (M3150, «Sigma-Aldrich»); модифицированный полимер деацетирированного хитина –кватернизованный хитозан (КХ) Mw > 200 000 (Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН, Москва) [11]. Этилендиаминтетрауксусная кислота, фосфатно-солевой буфер, диметилсульфоксид (все производства «Sigma-Aldrich») были использованы без дополнительной очистки.

Гибридные микрокапсулы, пустые и с упакованной siРНК, были синтезированы и охарактеризованы по описанной ранее методике [12] в лаборатории микрокапсулирования и управляемой доставки биологически активных соединений RASA-центра (Политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург).

siРНК. При подборе siРНК выбирали наиболее консервативные участки генов-мишеней и руководствовались «правилом Тушля» [13, 14]. Все РНК-нуклеотиды были синтезированы компанией «ДНК-Синтез» (Москва), последовательности приведены далее; в РНК-олигонуклеотиде NP-1496-1/2(dTdT) 2-гидроксильная группа была заменена на 2-О-метильную группу в каждом нуклеотидном остатке, РНК-олигонуклеотид PA-1630-FAM содержит карбоксифлюоресцеин (FAM) на 3'-конце. Олигонуклеотиды были растворены в $depcH_2O$ (100 мкМ). Двухцепочечные siРНК получали в процессе термического отжига и гибридизации по ранее описанному протоколу [12]. Полученные РНК-дуплексы были проанализированы методом электрофоретического разделения в 15% полиакриламидном геле.

Культуры клеток. В работе использовали монослойные клеточные культуры Мадин-Дарби почек собак

Таблица 1

Концентрации поликатионов в комплексе с siРНК

| Концентрация | ПЭИ | МГХ | КХ |
|---|------|-----|------|
| Mn _{pol} , г/моль | 43 | 375 | 298 |
| x _{pol} , мг/мл, N/P = 1 на 1•10 ⁻⁶ моль siРНК | 0,94 | 8,2 | 6,52 |
| Конечная концентрация полимера в добавляемом растворе полиплексов (N/P = 1), мкг/мл | 0,48 | 4,1 | 3,8 |

(Madine-Darby canine kidney, MDCK) и эпителия лёгких человека (A549), полученные из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России (Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде DMEM («Биолот», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Biowest», Франция). Все опыты проводили на суточном монослое с плотностью 10⁵ клеток на 1 см².

Вирусы. Использовали вирус гриппа А/PR/8/34 (H1N1) с титром 2,69•10⁶ (50% тканевая цитопатическая доза, ТЦИД₅₀) из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа». Культивирование вируса проводили на 10-дневных куриных эмбрионах по методике, приведенной в работе [15]. Инфекционный титр вируса определяли на клеточной культуре MDCK в соответствии с данными в работе [15]; титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча [16] с использованием ТЦИД₅₀.

Антитела. Для выявления вирусного белка NP использовали моноклональные мышьиные антитела 6D11, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP), полученные в лаборатории биотехнологии диагностических препаратов ФГБУ «НИИ гриппа».

Приготовление комплексов с siРНК. Комплексы на основе катионных полимеров полиплексов получали в процессе смешивания эквивалентных объемов водных растворов нуклеиновых кислот и растворов поликатионов с различной концентрацией, чтобы достичь соотношения азотных групп полимера (N) к фосфатным группам РНК (P) (соотношение N/P) в расчёте на один нуклеотид и одно мономерное звено в промежутке от 1/128 до 128/1. Готовые смеси интенсивно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре 30 мин. Концентрации рассчитывали по приведённой ниже формуле, для всех экспериментов определяли массовую концентрацию поликатиона, необходимого для создания комплекса с 1 мкмоль siРНК согласно табл. 1.

$$N/P = \frac{Mn_{pol} / x_{pol}}{Mn_{RNA} / y_{RNA}}$$

где Mn_{pol} — молекулярная масса мономерного звена поликатиона (в г/моль); Mn_{RNA} = 320 г/моль; x_{pol} — концентрация поликатиона (в г/мл); y_{RNA} — концентрация siРНК (≈0,7 мг/мл).

Комплексы siРНК с липофектаминоном были получены путём смешивания реагента Lipofectamine® 2000 и siРНК в соотношениях, указанных в протоколе производителя. Комплексы siРНК с поликатионами в различных соотношениях разбавляли не содержащей сыворотку средой и вносили в лунки планшета. siРНК с Lipofectamine® 2000 вносили согласно протоколу производителя. Микрокапсулы в водном растворе добавляли в среду, доводя до нужной концентрации по siРНК, и вносили к клеткам в соотношении приблизительно 2—5 микрокапсул на клетку.

Оценка жизнеспособности клеток. Комплексы с siРНК с поликатионами

получали смешиванием разведений полимеров с 0,1 мкмоль siРНК. Комплексы добавляли к монослою клеток A549 с последующей инкубацией в течение 24 ч. Жизнеспособность клеток оценивали при помощи микротетразолиевого теста (МТТ, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил) 2,5-дифенилтетразолия бромид на PBS). Раствор МТТ в концентрации 2,5 мг/мл вносили на предварительно отмые PBS клетки в лунках 96-луночных планшетов и инкубировали 4 ч при 37°С в атмосфере 5% CO₂, затем раствор сбрасывали и использовали 96% C₂H₅OH (100 мкл) для разрушения клеточных мембран и растворения осадка. Оптическую плотность измеряли на план-

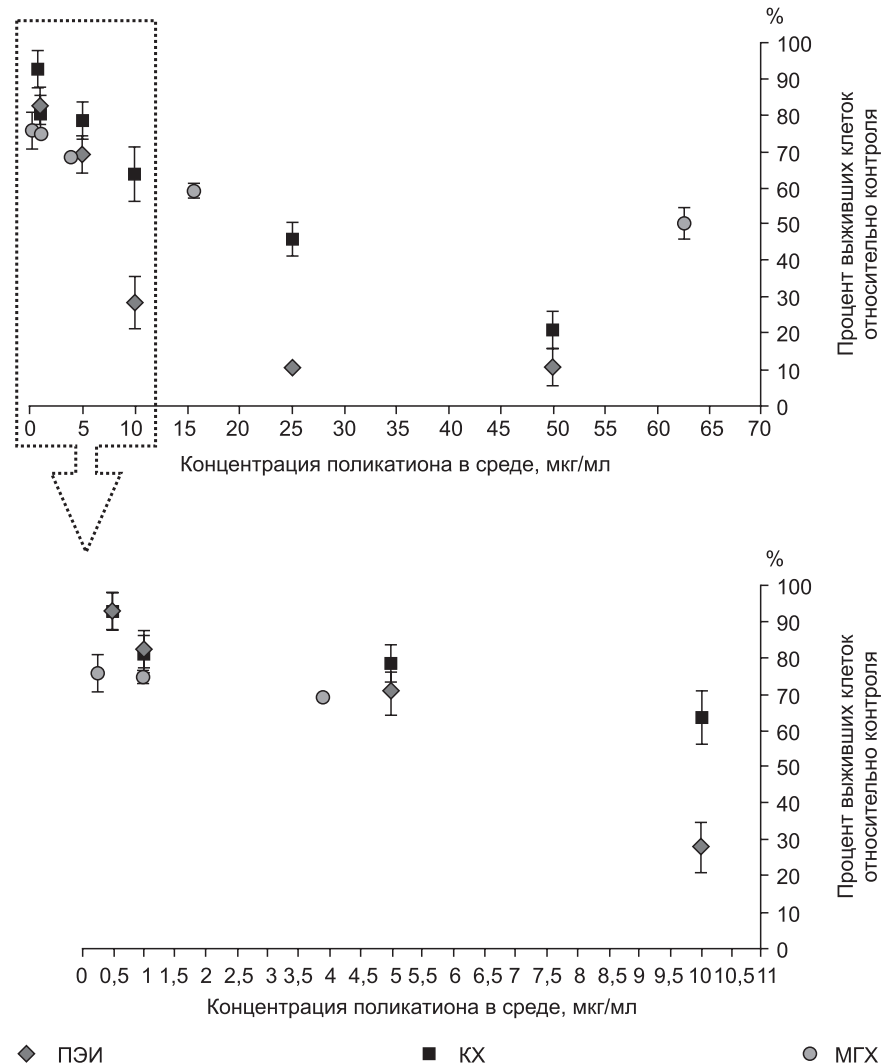


Рис. 1. Токсическое действие комплексов поликатионов ПЭИ, МГХ и КХ с siРНК (1 μM) с различными концентрациями по поликатиону на клеточный монослой A549 (50 000 клеток).

шетном ридере CLARIOstar («BMG LABTECH», Германия) в режиме снятия тотального поглощения с лунки на длине волны 570 нм.

Определение эффективности внутриклеточной доставки siРНК. Для оценки эффективности проникновения siРНК в клетки была использована FAM-меченая siРНК. Исследовали комплексы поликатионов в следующих соотношениях N/P: 32:1; 16:1; 8:1; 4:1; 2:1; 1:1. Полиплексы, siРНК с липофектаминам, а также микрокапсулы с FAM-меченой siРНК, растворённые в не содержащей сыворотки среде, вносили в лунки 96-луночного планшета в трех повторях (концентрация siРНК в лунке 1 мкМ). Через 24 ч клетки отмывали PBS, чтобы избавиться от не вошедших в клетку комплексов, фиксировали ацетоном, окрашивали DAPI. Изображения, качественно подтверждающие наличие FAM-меченой siРНК в цитоплазме клеток, а также полуколичественный расчет эффективности доставки siРНК с учётом отрицательного контроля (сигнал фона) и нормировки на количество клеток были получены с помощью системы формирования изображений Cytell Cell Imaging System («GE», США) (настраиваемое приложение MuBioApp).

Определение противовирусной активности siРНК. Противовирусную активность препаратов siРНК оценивали по профилактической схеме на клеточной культуре A549.

Препараты siРНК добавляли к клеткам в лунки планшетов, инкубировали 24 ч (37°C, 5% CO₂), отмывали PBS и заражали вирусом в разведениях на поддерживающей среде (DMEM + L-глутамин, 0,1 мкг/мл трипсина и 0,1 мг/мл стрептомицина). Через 30 мин инкубации (8°C) сменяли среду на поддерживающую.

Клетки инкубировали 24 и 72 ч (37°C, 5% CO₂), после чего оценивали вирусную репродукцию в клетках и вирус-содержащей культуральной жидкости (ВКЖ), полученной от них.

Быстрый скрининг действия siРНК, доставляемой в клетки с помощью липофектамина, проводили на двух клеточных культурах A549 и MDCK по профилактической схеме. Препараты siРНК (50 пмоль/10⁵ клеток) вносили за 1 ч до заражения вирусом в множественности инфекции (MOI) 0,1, выбранной в соответствии с данными в работе [17]. Противовирусную активность оценивали по реакции гемагглютинации (РГА) через сутки.

РГА. Репродукцию вируса в ВКЖ оценивали методом РГА с 0,5% куриными эритроцитами для двукратно раститрованных ВКЖ, полученных от клеток через 24 и 73 ч после заражения, согласно данным в работе [15]. Титр вируса выражали в единицах ГА, обратных максимальному

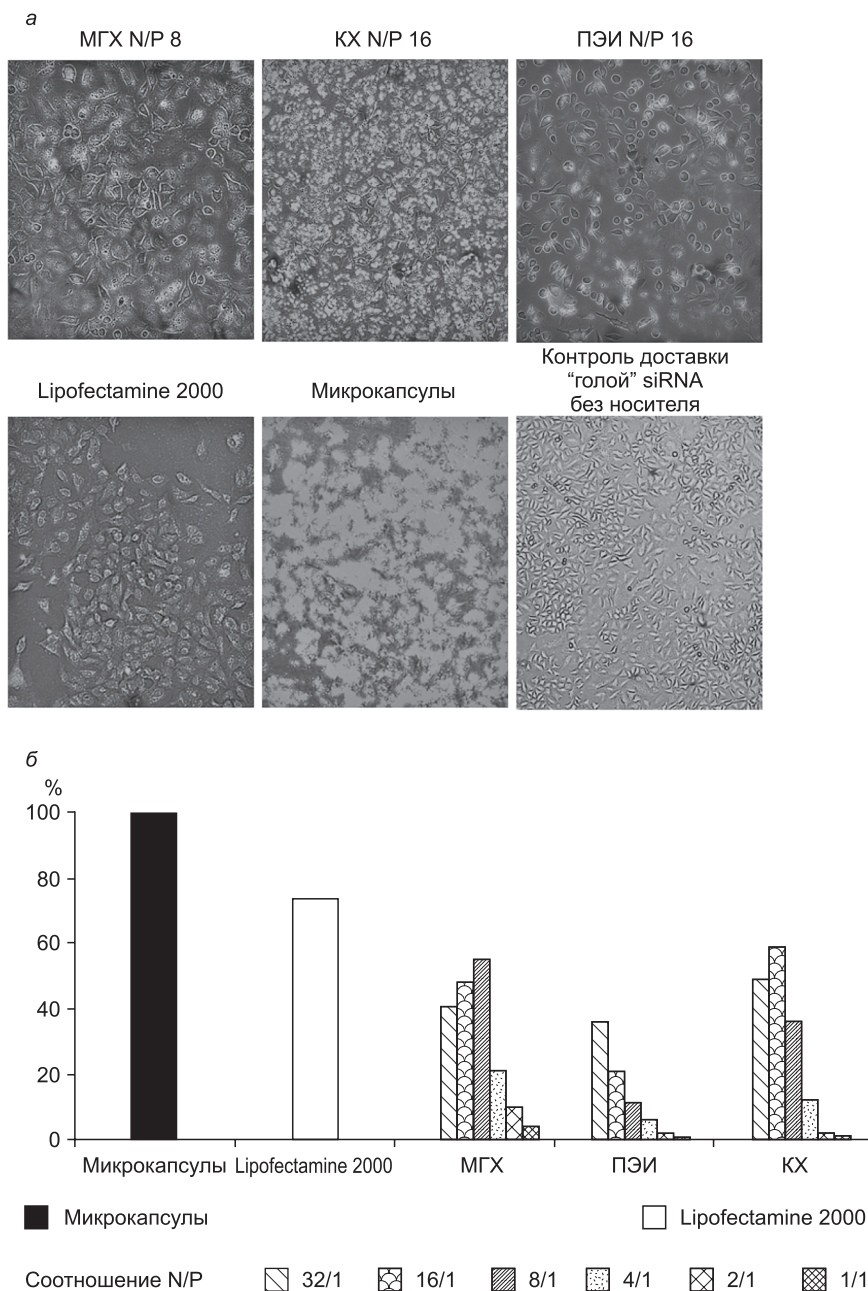


Рис. 2. Эффективность внутриклеточной доставки siРНК.

а — визуальное сравнение поликатионной доставки FAM-PA-1630 для наиболее эффективных и наименее токсичных соотношений N/P. Изображения получены с помощью системы формирования изображений Cytell Cell Imaging System («GE», США); *б* — относительная эффективность (по оси ординат) доставки FAM-PA-1630 различными системами, нормированная на количество клеток.

разведению вызывающих агглютинацию эритроцитов.

Имуноферментный анализ (ИФА). Накопление вирусного белка NP в инфицированных клетках и ВКЖ, полученных от них, определяли методом прямого ИФА с использованием антител 6D11-HRP по методике, описанной в [12].

Результаты

Эффективность доставки в клетки siРНК, обладающих противовирусной активностью в отношении вируса гриппа А, оценивали с использованием следующих

Таблица 2

Последовательности siРНК-олигонуклеотидов

| Название siРНК | 5' ->3' 3p-seq | 5' ->3' 5p-seq |
|----------------|--------------------------|---------------------------|
| РА-1630 | UgAgCCACACAAAUgggAA | UCCCAUUUgUgUggCUCgU |
| NP-717* | UUAUgAgAgAAUgCAACAU | gUUgCACAUUCUCUCAUAAgC |
| NP-1496** | ggAUCUUUUUCUUCggAg(dTdT) | CUCCgAAgAAAUAAGAUCC(dTdT) |
| Negative siРНК | CAUgACCAACAAGAUgAAgAg | CUUCUgCUUgUgUgUCAUgCg |

Примечание. * — siРНК, описанная в работе [12]; ** — siРНК, описанная в работе [17].

носителей: МГХ, КХ, ПЭИ и гибридных микрокапсул. Характеристика носителей и источники их получения приведены в разделе «Материал и методы». На первом этапе определяли минимальные соотношения N/P, необходимые для полного связывания siРНК с поликатионами. Для этого использовали метод электрофоретического разделения комплексов siРНК с носителями в агарозном геле с детекцией нуклеиновых кислот бромистым этидием. Для МГХ комплексы приобретают положительный заряд и экранируют siРНК при значениях N/P свыше 1:2, для КХ — при N/P свыше 2, для ПЭИ — при N/P свыше 1:4. Емкость микрокапсул и предельные значения концентрации образующих их полимеров и органических компонентов для длительной защиты siРНК от эндонуклеаз и их эффективной доставки внутрь клетки описаны ранее в работах [12, 18].

Далее определяли максимально допустимые дозы препаратов, образованных поликатионами и siРНК в соотношениях N/P > 1, которые вызывают гибель 50% клеток *in vitro*. Они составили 6,5 мкг/мл для ПЭИ, 60 мкг/мл для МГХ и 24,5 мкг/мл для КХ (рис. 1).

Ранее было показано, что доставка siРНК, находящихся в комплексах с поликатионами МГХ, КХ и ПЭИ при N/P больше или равном 2, внутрь клетки начинается уже через 5 мин инкубации [19]. Согласно протоколу использования Lipofectamine® 2000, являющегося «золотым стандартом» внутриклеточной доставки нуклеиновых кислот, рекомендуемое время экспозиции siРНК составляет не менее 4 ч. При использовании системы доставки на основе микрокапсул показано, что их захват эндосомами происходит в течение первых 15 мин после введения, начало высвобождения siРНК в клетке в процессе разрушения капсул начинается через 4 ч и полностью завершается через 24 ч [12].

Учитывая различающиеся данные о времени доставки siРНК для разных носителей, провели их сравнительное исследование с использованием флюоресцентно-меченой дунитевой РНК РА-1630, содержащей карбоксифлюоресцеин (FAM) на 3'-конце (FAM-РА-1630). В случае исследуемых поликатионов подготовили несколько вариантов комплексов с FAM-РА-1630 с соотношениями N/P 16, 8, 4, 2 и 1, которые находятся в диапазоне концентраций, вызывающих менее 30% гибели клеток в монослое. Помимо поликатионов для доставки FAM-РА-1630 в клетки использовали гибридные микрокапсулы, а также Lipofectamine® 2000. Через 24 ч после внесения препаратов максимально эффективную доставку FAM-РА-1630 наблюдали для микрокапсул. При использовании поликатионов МГХ, КХ и ПЭИ наблюдали прямую зависимость интенсивности флюоресценции в клетках от соотношения N/P (рис. 2).

На следующем этапе работы определяли функ-

циональную эффективность комплексов исследуемых носителей с siРНК относительно ингибирования вирусной инфекции на культивируемых клетках А549. Для этого использовали siРНК, направленные на гены PA и NP вирусов гриппа А (табл. 2). Применяли как ранее охарактеризованные siРНК NP-1496 [17] и NP-717 [12], для которых была показана противовирусная активность, так

и новую siРНК РА-1630, противовирусная активность которой была обнаружена в процессе выполнения работы. В качестве отрицательного контроля использовали siРНК, последовательность которой была случайным образом подобрана так, чтобы не иметь комплементарных участков в генах человека и вирусов гриппа А. В качестве препарата положительного контроля противовирусной активности использовали озельтамивир.

В лунки 24-луночного планшета к монослою клеток А549 вносили в бессывороточную среду препараты siРНК, находящиеся в комплексах с изучаемыми поликатионами (в соотношении N/P 16), микрокапсулами и Lipofectamine® 2000. После инкубации в течение 24 ч отмывали клетки от не вошедших внутрь препаратов siРНК, затем проводили оценку противовирусной активности методом РГА (табл. 3). Установили, что метод РГА не может быть использован для оценки противовирусной активности препаратов, содержащих МГХ и КХ. Причиной этого, вероятно, является способность хитозана связываться с гемагглютинином вируса гриппа за счет наличия большого количества активных положительно заряженных NH₂-групп. При этом для исследуемых проб наблюдали цитопатическое действие вируса и определяли вирусный белок NP методом ИФА (рис. 3). В случае ПЭИ и Lipofectamine® 2000 методом РГА продемонстрировали снижение вирусной репродукции с помощью siРНК, однако такой же эффект наблюдали и для неспецифической siРНК. При использовании микрокапсул с вирусспецифическими siРНК наблюдалось достоверное снижение вирусной репродукции, в то время как контрольные препараты такого снижения не вызывали.

Помимо метода РГА для определения вирусной нагрузки использовали метод ИФА с моноклональными антителами 6D11 к NP вирусов гриппа А (рис. 4). В этом случае для заражения клеток А549 использовали мень-

Таблица 3

Результаты РГА ВКЖ, полученных от клеток А549, зараженных А/PR/8/34 1 МОИ, через 72 ч после заражения; внесение препаратов siРНК (0,125 мкМ/лунка)

| Показатель | Lipofectamine® 2000 | ПЭИ | Микрокапсулы | МГХ | КХ |
|-----------------------|---------------------|-----|--------------|-----|-----|
| Контроль заражения | | 16 | | | |
| Носитель без siРНК | 16 | 16 | 16 | н/о | н/о |
| Неспецифическая siРНК | 8 | 8 | 16 | н/о | н/о |
| РА-1630 | 8 | 4 | 4 | н/о | н/о |
| NP-717 | 4 | 8 | 2 | н/о | н/о |
| NP-1496 | 8 | 8 | 8 | н/о | н/о |
| Озельтамивир | | 2 | | | |

Примечание. н/о — невозможно определить.

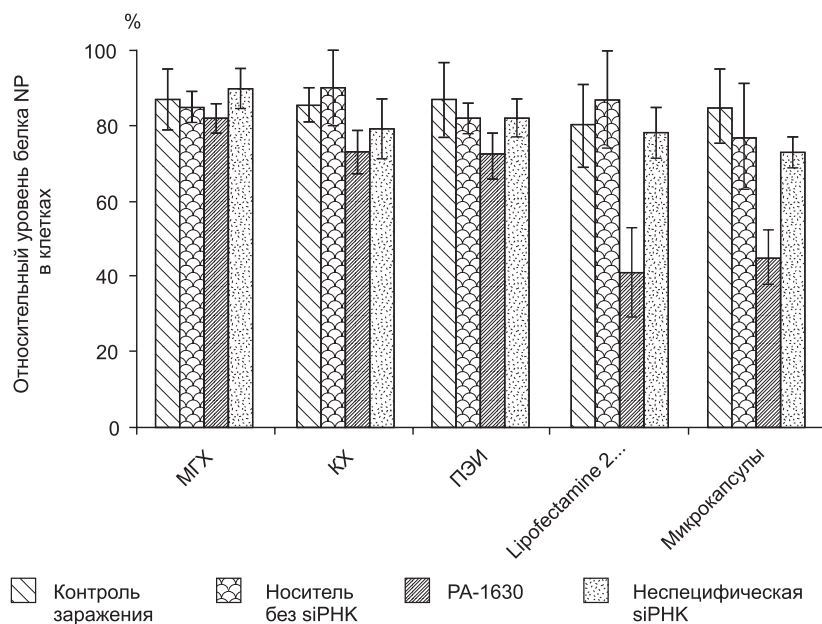


Рис. 3. Уровень белка NP в клетках A549, заражённых A/PR/8/34 1 MOI, через 72 ч после заражения. Внесение препаратов siРНК (0,125 мкМ/лунка) с поликатионами N/P 16 по профилактической схеме.

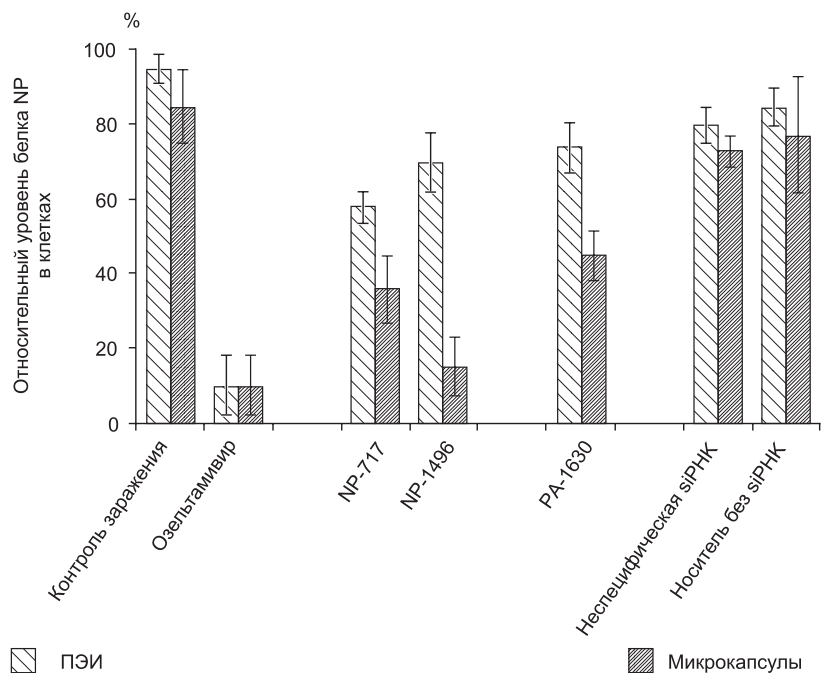


Рис. 4. Результаты ИФА определения уровня белка NP в клетках A549, заражённых A/PR/8/34 0,1 MOI, через 24 ч после заражения. Внесение препаратов siРНК (0,5 мкМ/лунка) с ПЭИ (N/P 16) и в виде микрокапсул по профилактической схеме.

шую дозу вируса (0,01 MOI). В качестве препарата сравнения вновь использовали озельтамивир (10 мкг/мл). В случае комплексов siРНК с МГХ и КХ наблюдали лишь незначительное снижение уровня NP, сопоставимое с эффектом действия как контрольной неспецифической siРНК, так и самого хитозана. Для ПЭИ достоверное снижение уровня NP произошло только в случае

siРНК NP-717. В остальных пробах снижение относительного уровня NP в клетках было сопоставимо с контрольным. В клетках, в которые siРНК доставляли с помощью микрокапсул, наблюдали достоверное снижение уровня NP методом ИФА для всех трех исследуемых препаратов. Эти данные хорошо согласуются с ранее полученными для препаратов NP-717 и NP-1496 [12, 17].

Обсуждение

В работе изучали противовирусную активность *in vitro* в отношении вируса гриппа А трех препаратов siРНК (PA-1630, NP-717, NP-1496), доставляемых в клетки различными системами невирусной доставки. Носители сравнивали по трансфекционной способности, токсическому эффекту и противовирусной активности доставляемых в клетки siРНК. Использовали поликатионные носители МГХ, КХ и ПЭИ, а также гибридные микрокапсулы на основе полиаргинина с неорганическими компонентами [11, 12, 19, 20].

Поликатионная доставка лекарственных средств считается наиболее перспективным подходом к терапии инфекционных заболеваний, развивающихся в верхних дыхательных путях [21, 22]. В частности, в литературе уделялось большое внимание хитозану как потенциальному агенту для доставки терапевтических siРНК в клетки легких [23]. Однако сложность в использовании хитозана состоит в том, что он является природным полимером, и препараты, получаемые из разного природного сырья (хитиновые панцири креветок и другие), различаются по степени деацетилирования, содержанию аминокислотных групп и молекулярной массе, в то время как синтезированные в лаборатории производные хитозана обладают различными физико-химическими свойствами. В связи с этим невозможно однозначно допустить, что разные препараты хитозанов характеризуются одинаковой доставляющей способностью, поэтому различные синтезированные модификации требуют сравнительного изучения.

На предварительном этапе работы определяли условия комплексообразования и пороги токсичности для двух модифицированных хитозанов МГХ, КХ, а также ПЭИ. Концентрации МГХ, КХ и ПЭИ в комплексах с siРНК (для соотношений N/P > 1), которые не вызывают явного токсического действия и вызывают гибель не более 30% клеток, составили 7,5, 4,5 и 5 мкг/мл соответственно (см. рис. 1). В предыдущих исследованиях оценивали эффективность трансфекции siРНК внутрь

клеток хитозанами МГХ и КХ [20], а также микрокапсулами [12]. В представленной работе провели сравнение этих систем доставки, которое показало, что микрокапсулы позволяют осуществлять наиболее эффективную трансфекцию клеток максимально возможным количеством siРНК, не вызывая их гибели. Исследованные поликатионы, а также препарат сравнения Lipofectamine®

2000 имеют ограничения по количеству доставляемой siРНК, так как с ее увеличением возрастает и количество носителя, что приводит к повышению токсичности препарата и возможному превышению концентрации «полулетальной дозы». Токсичность препарата в микрокапсулах в свою очередь определяется только большим количеством (больше 25) капсул, приходящихся на одну клетку, при этом в одну капсулу может быть заключено гораздо больше siРНК, чем можно доставить в клетку с помощью Lipofectamine® 2000 по стандартному протоколу. Таким образом, если эффективность трансфекции с помощью микрокапсул принять за 100%, доставка с помощью Lipofectamine® 2000 обладает эффективностью на уровне 80%, а доставка поликатионами не превышает 60% в пределах нетоксичных концентраций.

Мы использовали все системы доставки, чтобы изучить ингибирующее действие siРНК на вирус гриппа А (ВГА) на клетках А549 методами РГА и ИФА. Наибольший противовирусный эффект исследуемые siРНК показали в случае доставки с помощью микрокапсул.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о возможности использования микрокапсул для безопасной и эффективной доставки терапевтических siРНК против ВГА *in vitro* и, возможно, *in vivo*. Преимуществом такого подхода может также являться возможность упаковки в одну капсулу большого количества сразу нескольких специфичных siРНК, имеющих мишени в разных генах ВГА и/или одновременно для клеточных генов. Также капсулы можно модифицировать, добавляя в них компоненты для оптимизации транспорта и снижения токсичности на уровне организма, без потери их основных свойств и функциональности.

Финансирование. Данная работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ грант № 15-15-00170; грант № 17-73-10023.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 3—6, 8—18, 20—23 см. REFERENCES)

1. Всемирная организация здравоохранения. Информационный бюллетень о гриппе № 211. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/ru>
2. Киселёв О.И., Цыбалова Л.М., Покровский В.И., ред. *Групп: эпидемиология, диагностика, лечение, профилактика*. М.: Медицинское информационное агентство; 2012.
7. Горшков А.Н., Петрова А.В., Васин А.В. РНК-интерференция и патогенез вируса гриппа А. *Цитология*. 2017; 59(8): 517—33.
19. Петрова А.В., Горшков А.Н., Егоров В.В., Бондаренко А.Б., Шурьгина А.П.С., Грудинина Н.А. и др. Оценка трансфекционной способности производных хитозана в качестве носителей для доставки коротких интерферирующих РНК. *Естественные и математические науки в современном мире*. 2015; (36-37): 142—8.

REFERENCES

1. World Health Organization. Influenza bulletin № 211. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>
2. Kiselev O.I., Tsybalova L.M., Pokrovskiy V.I., eds. *Influenza: Epidemiology, Diagnosis, Treatment, Prevention [Gripp: epidemiologiya,*

- diagnostika, lechenie, profilaktika*]. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo; 2012. (in Russian)
3. Kurreck J. RNA interference: from basic research to therapeutic applications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2009; 48(8): 1378—98.
 4. Castel S.E., Martienssen R.A. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 2013; 14(2): 100—12.
 5. Ballarin-González B., Thomsen T.B., Howard K.A. Clinical translation of RNAi-based treatments for respiratory diseases. *Drug Deliv. Transl. Res.* 2013; 3(1): 84—99.
 6. Haussecker D. Current issues of RNAi therapeutics delivery and development. *J. Control. Release.* 2014; 195: 49—54.
 7. Gorshkov A.N., Petrova A.V., Vasin A.V. RNA-interference and Influenza A pathogenesis. *Tsitologiya*. 2017; 59(8): 517—33. (in Russian)
 8. Maillard P.V., Ciaudo C., Marchais A., Li Y., Jay F., Ding S.W., et al. Antiviral RNA interference in mammalian cells. *Science*. 2013; 342(6155): 235—8.
 9. Wang J., Lu Z., Wientjes M.G., Au J.L. Delivery of siRNA therapeutics: barriers and carriers. *AAPS J.* 2010; 12(4): 492—503.
 10. Whitehead K.A., Langer R., Anderson D.G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2009; 8(2): 129—38.
 11. Faizuloev E., Marova A., Nikonova A., Volkova I., Gorshkova M., Izumrudov V. Water-soluble N-[(2-hydroxy-3-trimethylammonium)propyl]chitosan chloride as a nucleic acids vector for cell transfection. *Carbohydr. Polym.* 2012; 89(4): 1088—94.
 12. Timin A.S., Muslimov A.R., Petrova A.V., Lepik K.V., Okilova M.V., Vasin A.V., et al. Hybrid inorganic-organic capsules for efficient intracellular delivery of novel siRNAs against influenza A (H1N1) virus infection. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 102.
 13. Elbashir S.M., Lendeckel W., Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes. Dev.* 2001; 15(2): 188—200.
 14. Reynolds A., Leake D., Boese Q., Scaringe S., Marshall W.S., Khvorov A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 2004; 22(3): 326—30.
 15. WHO. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. Available at: http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/manual_diagnosis_surveillance_influenza/en/
 16. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* 1938; 27(3): 493—7.
 17. Ge Q., McManus M.T., Nguyen T., Shen C.H., Sharp P.A., Eisen H.N., et al. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100(5): 2718—23.
 18. Ganas C., Weiß A., Nazarens M., Rösler S., Kissel T., Rivera Gil P., et al. Biodegradable capsules as non-viral vectors for in vitro delivery of PEI/siRNA polyplexes for efficient gene silencing. *J. Control. Release.* 2014; 196: 132—8.
 19. Petrova A.V., Gorshkov A.N., Egorov V.V., Bondarenko A.B., Shurygina A.P.S., Grudinina N.A., et al. Evaluation of the chitosan derivatives transfection capacity as carriers for the delivery of small interfering RNAs. *Estestvennye i matematicheskie nauki v sovremennoy mire*. 2015; (36-37): 142—8. (in Russian)
 20. Pack D.W., Hoffman A.S., Pun S., Stayton P.S. Design and development of polymers for gene delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005; 4(7): 581—93.
 21. Höbel S., Aigner A. Polyethylenimines for siRNA and miRNA delivery in vivo. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2013; 5(5): 484—501.
 22. Kumar M. A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.* 2000; 46(1): 1—27.
 23. Ramsey J.M., Hibbitts A., Barlow J., Kelly C., Sivadas N., Cryan S.A. 'Smart' non-viral delivery systems for targeted delivery of RNAi to the lungs. *Ther. Deliv.* 2013; 4(1): 59—76.

Поступила 17.08.17

Принята в печать 25.08.17