

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-221

ПОДАВЛЕНИЕ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСА ГРИППА А/H5N1 *IN VITRO* НЕМОДИФИЦИРОВАННЫМИ siRNA В СОСТАВЕ НАНОКОМПЛЕКСОВ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ АМИНОПРОПИЛСИЛАНОЛА*

SUPPRESSION OF INFLUENZA A/H5N1 VIRUS REPLICATION *IN VITRO* BY UNMODIFIED siRNAS IN NANOCOMPLEXES BASED ON AMINOPROPYLSILANOL NANOPARTICLES

М. Е. Ребус¹, Е. И. Филиппова¹, М. А. Проценко¹, Е. В. Макаревич¹,
Б. П. Челобанов², М. Н. Репкова³, А. С. Левина³, В. Ф. Зарытова³, Л. Н. Шишкина¹

¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

²Московский физико-технический институт, Долгопрудный

³Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

M. E. Rebus¹, E. I. Filippova¹, M. A. Protsenko¹, E. V. Makarevich¹,
B. P. Chelobanov², M. N. Repkova³, A. S. Levina³, V. F. Zarytova³, L. N. Shishkina¹

¹State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

²Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny

³Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

✉ rebus_me@vector.nsc.ru

Аннотация

В работе показано, что наночастицы аминопропилсиланол (SiNH₂) в составе наноконплексов SiNH₂~siRNA доставляют siRNA в клетки, защищают их от гидролиза клеточными ферментами и обеспечивают молекулам siRNA возможность с высокой эффективностью подавлять репликацию вируса гриппа А/H5N1.

Abstract

The work shows that aminopropylsilanol (SiNH₂) nanoparticles in the SiNH₂~siRNA nanocomplexes deliver siRNA to cells, protect them from hydrolysis by cellular enzymes, and provide siRNA molecules with the ability to suppress influenza A/H5N1 virus replication with high efficiency.

Малые interfering РНК (siRNA) являются перспективными терапевтическими средствами на основе РНК. Однако их потенциал полностью не реализован. Ограничивающими факторами являются низкая эффективность доставки siRNA в клетки-мишени и деградация siRNA клеточными нуклеазами. Одним из наиболее эффективных подходов к решению проблемы доставки siРНК в клетки является использование невирусных векторов на основе наночастиц (НЧ) [1].

Целью работы является исследование возможности НЧ аминопропилсиланол (SiNH₂) в составе наноконплексов с siRNA (SiNH₂~siRNA) способствовать проникновению siRNA в клетки, защите их от гидролиза клеточными ферментами и в итоге подавлению репликации вируса гриппа штамма A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1).

В качестве мишени для воздействия с помощью siRNA выбран сегмент 5-го вируса гриппа А, кодирующий нуклеопротеин [2]. Используются две siRNA (см. таблицу), направленные на кодирующую область сегмента 5, которая является консервативной и уязвимой к действию siРНК [3]. В качестве контроля использована siRNA-SCR, неспецифическая к вирусу гриппа А.

Нуклеотидные последовательности siRNA

Цепь	Последовательность 5'→3'	siRNA
RNA1	CUCCGAAGAAUAAGAUC	siRNA1/2
RNA2	GGAUCUUAUUUCUUCGAG	
RNA3	CUCCGAAGAAUAAGAUC(dTdT)	siRNA3/4
RNA4	GGAUCUUAUUUCUUCGAG(dTdT)	

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-75-10105)

Наноконплексы SiNH₂-siRNA (далее Si~siRNA) получали иммобилизацией siRNA на SiNH₂ [4]. Показано, что наноконплекс Si~siRNA проникает в клетки MDCK, причем обе цепи проникают в составе сформированного дуплекса (рис. 1).

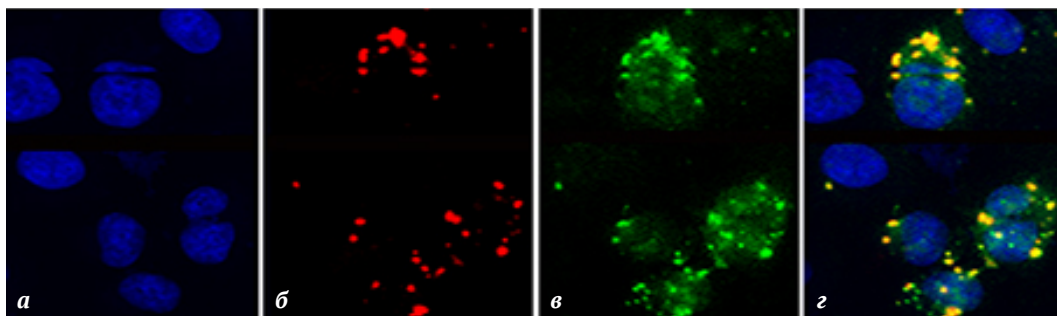


Рис. 1. Конфокальная лазерная микроскопия MDCK клеток после их инкубации с Si~siRNA; одна из цепей мечена флуоресцеином, другая — родамином. Клеточные ядра окрашены DAPI blue (а, синий цвет); родамин-меченная цепь (б, красный цвет); флуоресцеин-меченная цепь (в, зеленый цвет); суперпозиция каналов (г)

Противовирусную активность Si~siRNA в зараженных клетках MDCK изучали при концентрации 0,5 мМ по SiNH₂, что намного ниже их 50%-х токсических концентраций (TC₅₀ = 38 мМ по SiNH₂) [5]. Эксперименты проводили так же, как описано в [4]. Результаты приведены на рис. 2.

SiNH₂ и контрольный Si~siRNA-SCR практически не подавляют репликацию вируса гриппа А, что свидетельствует о высокой специфичности воздействия созданных наноконплексов. Одноцепочечные фрагменты обеих молекул siRNA были менее эффективными по сравнению с двухцепочечными молекулами. Наноконплексы Si~siRNA3/4 и Si~siRNA1/2 оказались эффективными ингибиторами репликации вируса. Индексы подавления продукции вируса под действием этих образцов составили 2,2 и 1,8 lg соответственно. Эффективность Si~siRNA3/4 оказалась сравнима с контрольным препаратом озельтамивиром.

Таким образом, показана высокая противовирусная активность наноконплексов на основе немодифицированных siRNA и НЧ аминопропилсиланола против вируса гриппа А/Н5N1 в клеточной системе. Полученные результаты указывают на перспективность использования НЧ для доставки siRNAs в клетки, способных эффективно предотвращать гидролиз siRNA в составе наноконплекса.

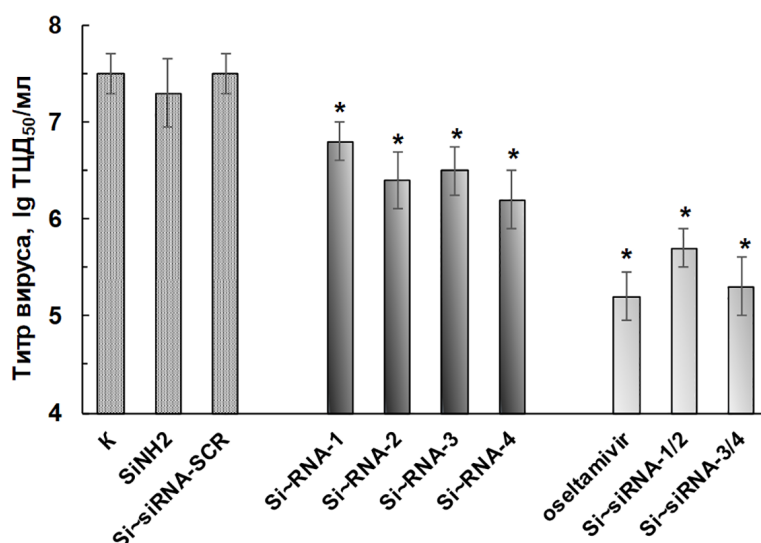


Рис. 2. Противовирусная активность образцов в отношении А/Н5N1.

Концентрации: siRNA — 0,5 мкМ; SiNH₂ — 0,5 мМ; озельтамивир — 100 мкг/мл. К — титр вируса в клетках без образца. Результаты представлены в виде средних значений и стандартных отклонений.

* — отличие от контроля (без образца) по методу Спирмена — Кербера, $p \leq 0,05$

Литература

1. Clipp A., Burger M., Leroux J. C. Get out or die trying: Peptide- and protein-based endosomal escape of RNA therapeutics // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2023. Vol. 200. P. 115047.
2. Repkova M., Mazurkov O., Filippova E. et al. Effect of modification of siRNA molecules delivered with aminopropylsilanol nanoparticles on suppression of A/H5N1 virus in cell culture // *BBA — Gen. Sub.* 2024. Vol. 1868. P. 130727.
3. Ge Q., McManus M. T., Nguyen T. 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. Vol. 100 (5). P. 2718–2723.
4. Levina A. S., Repkova M. N., Shikina N. V. et al. Non-agglomerated silicon-organic nanoparticles and their nanocomplexes with oligonucleotides: synthesis and properties // *Beilstein J. Nanotechnol.* 2018. Vol. 9. P. 2516–2525.
5. Репкова М. Н., Левина А. С., Мазурков О. Ю. и др. Подавление репликации вируса гриппа А/Н5Н1 in vitro с помощью наноконплексов, состоящих из siRNA и наночастиц аминопропилсиланола // *Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол.* 2024. Т. 101 (6). С. 794–802.