

DOI: <https://doi.org/10.17816/C1636513>

Оценка иммуномодулирующего и противовирусного эффекта малых интерферирующих РНК Nup98.1 и Nup205.1 при гриппозной инфекции на модели *in vivo*

Е.А. Пашков^{1,2}, Е.Б. Файзулов¹, Д.В. Мильчаков², Р.Е. Лушников², Е.А. Богданова², Л.С. Рожкова², О.А. Свитич^{1,2}, В.В. Зверев^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

² Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Гриппозная инфекция — одна из наиболее актуальных проблем мирового здравоохранения. В настоящее время остро стоят проблемы формирования вирусной резистентности к существующим лекарственным препаратам и иммуносупрессивного действия, индуцируемого вирусом гриппа. Перспективным решением представляется создание противовирусных препаратов, действие которых основано на ингибировании активности клеточных генов посредством РНК-интерференции.

Цель исследования — оценка иммуномодулирующего и противогриппозного эффекта малых интерферирующих РНК, направленных к клеточным генам, на мышинной модели вирусной инфекции.

Методы. В исследовании использованы адаптированный к мышам штамм вируса гриппа A/California/7/09 (H1N1) и мыши линии BALB/c. Введение малых интерферирующих РНК и заражение животных выполняли интраназально. Оценку изменения цитокинового профиля и вирусной активности выполняли с помощью молекулярно-генетических и вирусологических методов.

Результаты. По результатам проведённой оценки динамики экспрессии цитокинов не было получено достоверных различий на системном уровне (в крови), за исключением IL-6, TNF- α и IL-10, между опытными и контрольными группами. В лёгких мышей при интраназальном введении всех комплексов малых интерферирующих РНК отмечалось снижение уровня экспрессии IL-1 β и TNF- α , однако обнаруживалось повышение экспрессии IL-1 β и IL-6 в смывах из верхних дыхательных путей. При использовании малых интерферирующих РНК Nup98.1 и Nup98.1/Nup205.1 наблюдалось достоверное увеличение экспрессии IL-10 в лёгких к третьим суткам, а при использовании Nup205.1 — достоверное повышение в верхних дыхательных путях на третьи сутки. Экспрессия TGF- β 1 также снижалась в лёгких и повышалась в крови на третьи сутки при использовании всех комплексов малых интерферирующих РНК. На локальных уровнях были получены достоверные различия в экспрессии про- и противовоспалительных цитокинов. Исходя из этого, наиболее активный иммуномодулирующий эффект используемые комплексы малых интерферирующих РНК показывают в верхних дыхательных путях и лёгких, в местах их непосредственного введения. Параллельно снижение вирусной репродукции по сравнению с группами контроля составило 1–2,5 порядка на фоне изменения иммунного профиля.

Заключение. В проведённом исследовании представлены данные о том, что малые интерферирующие РНК, направленные к одному и более клеточным генам на модели *in vivo*, способны достоверно приводить к снижению вирусной репродукции, а также к изменению цитокинового профиля.

Ключевые слова: РНК-интерференция; вирус гриппа; инфекция; малые интерферирующие РНК; цитокины.

Как цитировать:

Пашков Е.А., Файзулов Е.Б., Мильчаков Д.В., Лушников Р.Е., Богданова Е.А., Рожкова Л.С., Свитич О.А., Зверев В.В. Оценка иммуномодулирующего и противовирусного эффекта малых интерферирующих РНК Nup98.1 и Nup205.1 при гриппозной инфекции на модели *in vivo* // Цитокины и воспаление. 2024. Т. 21, № 2. С. 102–110. DOI: <https://doi.org/10.17816/C1636513>

DOI: <https://doi.org/10.17816/Ci636513>

Evaluation of the immunomodulatory and antiviral effects of small interfering RNAs Nup98.1 and Nup205.1 in an *in vivo* influenza model

Evgeny A. Pashkov^{1,2}, Evgeny B. Faizuloev¹, Danil V. Milchakov², Ruslan E. Lushnikov², Ekaterina A. Bogdanova², Lanita S. Rozhkova², Oxana A. Svitich^{1,2}, Vitaly V. Zverev^{1,2}

¹ I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: Influenza remains a significant global public health challenge. Currently, the challenges of viral resistance to existing antiviral drugs and the immunosuppressive effects induced by the influenza virus remain urgent issues. A promising strategy involves developing antiviral agents that inhibit cellular gene activity via RNA interference.

AIM: To evaluate the immunomodulatory and anti-influenza effects of small interfering RNAs targeting cellular genes in a murine model of influenza virus infection.

METHODS: The study utilized the mouse-adapted influenza virus strain A/California/7/09 (H1N1) and BALB/c mice. Small interfering RNA administration and viral infection were performed intranasally. Changes in cytokine profiles and viral replication were assessed using molecular-genetic and virological methods.

RESULTS: Based on the evaluation of cytokine expression dynamics, no statistically significant differences were observed in systemic cytokine levels (blood), except for IL-6, TNF- α , and IL-10, between the experimental and control groups. In the lungs, intranasal administration of all small interfering RNA complexes resulted in decreased IL-1 β and TNF- α expression, while IL-1 β and IL-6 expression increased in upper respiratory tract lavage samples. The use of small interfering RNAs Nup98.1 and Nup98.1/Nup205.1 led to a significant increase in IL-10 expression in the lungs by day 3, whereas Nup205.1 resulted in a significant increase in IL-10 levels in the upper respiratory tract by the same time point. TGF- β 1 expression decreased in the lungs but increased in the blood by day 3 across all small interfering RNA complexes. Significant differences in the expression of pro- and anti-inflammatory cytokines were observed at the local level. The most pronounced immunomodulatory effects were observed in the upper respiratory tract and lungs, the primary sites of small interfering RNA administration. Parallel to these immune profile alterations, viral replication was reduced by 1–2.5 orders of magnitude compared to control groups.

CONCLUSIONS: This study provides evidence that small interfering RNAs targeting one or more cellular genes in an *in vivo* model can significantly reduce viral replication while modulating cytokine profiles.

Keywords: RNA interference; influenza virus; infection; small interfering RNA; cytokines.

To cite this article:

Pashkov EA, Faizuloev EB, Milchakov DV, Lushnikov RE, Bogdanova EA, Rozhkova LS, Svitich OA, Zverev VV. Evaluation of the immunomodulatory and antiviral effects of small interfering RNAs Nup98.1 and Nup205.1 in an *in vivo* influenza model. *Cytokines and Inflammation*. 2024;21(2):102–110. DOI: <https://doi.org/10.17816/Ci636513>

ОБОСНОВАНИЕ

Респираторные вирусные инфекции представляют собой одну из глобальных проблем, несущих тяжёлые социальные и экономические последствия. В 2021 году во всём мире гриппозная инфекция унесла почти 650 000 жизней¹. Осложнения гриппозной инфекции зачастую затрагивают не только респираторную, но и центральную нервную, мочеполовую, сердечно-сосудистую и иммунную системы, а также вызывают развитие бактериальных и грибковых осложнений [1]. Ввиду развития лекарственной резистентности вируса гриппа на сегодняшний день имеет место недостаток эффективных средств лечения данного заболевания. Высокая частота сопутствующих осложнений и смертности связана также и с тем, что вирусы гриппа имеют в своём составе белки, которые придают им иммуносупрессорные свойства. Одним из наиболее изученных подобных белков является NS-1, основная функция которого заключается в нарушении функционирования интерферон-опосредованных механизмов защиты организма, что приводит к снижению экспрессии ряда генов, кодирующих компоненты гуморального иммунитета [2].

В формировании противогриппозного иммунитета ключевую роль играют цитокины IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10 и TGF-1 β . IL-1 β принимает участие в усилении экспрессии генов *MCP-1* и *MCP-3* и функциональном созревании тканевых макрофагов и дендритных клеток. Это приводит к усилению воспалительной реакции и активации эффективной системы презентации антигена [3]. Было показано, что TNF- α обладает противовирусной активностью в эпителиальных клетках лёгких [4]. Кроме того, TNF- α активирует макрофаги и стимулирует созревание дендритных клеток. Увеличение экспрессии TNF- α также коррелирует с продукцией IL-10, который является основным противовоспалительным цитокином, чья функция состоит в регуляции и предотвращении избыточной воспалительной реакции [5]. IL-6 принимает участие в стимуляции синтеза белков острой фазы и выработке нейтрофилов в костном мозге [6]. TGF-1 β выступает ключевым регулятором сигнального пути, способствующего образованию Treg-клеток [7].

Одной из перспективных технологий для преодоления данной проблемы является создание специфических противовирусных препаратов, основанных на механизме РНК-интерференции — процесса нарушения экспрессии целевого гена с помощью молекулы малой интерферирующей РНК (миРНК, siRNA) [8].

Цель исследования — оценка иммуномодулирующего эффекта миРНК, заключающегося в изменении экспрессии цитокинов IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10 и TGF-1 β в лёгких, в верхних дыхательных путях (ВДП) и в крови в результате

подавления активности клеточных генов *Nip98* и *Nip205* на модели *in vivo*, а также оценка противогриппозного эффекта самих миРНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

миРНК

Подбор и анализ миРНК к необходимым последовательностям мРНК осуществляли с использованием программного обеспечения VectorNTI.11 и siDirect 2.0. Последовательности мРНК получены из базы данных GenBank (NCBI). Выполняли выравнивание нескольких вариантов мРНК каждого гена с использованием программы VectorNTI.11 и выбирали наиболее консервативные участки мРНК. К этим участкам подбирались по два варианта миРНК с помощью программы siDirect 2.0.

Синтез олигорибонуклеотидов был выполнен НПК «Синтол» (Москва, Россия). Каждый олигорибонуклеотид имеет 2 дезоксирибонуклеотида на 3'-конце. Это необходимо для минимизации отрицательного влияния ферментов-экзонуклеаз. Для достижения количества вещества, равного 100 пкмоль/мкл, в соответствии с инструкциями производителя комплементарные одноцепочечные олигорибонуклеотиды смешивали с деионизованной водой (Thermo Fisher Scientific, США) и хранили при температуре -80 °C. Для получения необходимого количества вещества (концентрации) миРНК смешивали между собой комплементарные одноцепочечные олигорибонуклеотиды, в течение 1 мин нагревали до 60 °C, затем остужали до комнатной температуры при окружающей температуре 25 °C. Полученные дуплексы хранили при температуре -80 °C. Подробные механизмы приготовления комплексов миРНК, а также их последовательности отражены в раннем исследовании [9].

Культуры клеток

В работе использовались клетки почек кокер-спаниеля MDCK (Институт Пастера, Франция) и клетки мышечных фибробластов L929 [Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова (НИИ ВС им. И.И. Мечникова), Россия]. Клетки MDCK выращивали в среде Minimum Essential Medium (MEM; ПанЭко, Россия), содержащей 5% эмбриональной сыворотки коров (ЭСК) Gibco (Fisher Scientific, Новая Зеландия), 40 мкг/мл гентамицина (ПанЭко, Россия) и 300 мкг/мл L-глутамина (ПанЭко, Россия), при 37 °C в CO₂-инкубаторе.

Вирус

В работе использован вирус гриппа A/California/7/09 (H1N1), полученный из коллекции вирусов НИИ ВС им. И.И. Мечникова. Культивирование вируса проводилось на культуре клеток MDCK.

¹ Грипп (сезонный): информационный бюллетень [интернет]. Режим доступа: [https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))

Лабораторные животные

В работе использовали мышей линии BALB/c (Столбовая, Россия) массой 16–18 г. Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с Директивой Совета Европейских Сообществ от 24.11.1986 (86/609/ЕЕС). Протокол исследования в рамках диссертационной работы² был одобрен на заседании локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» (протокол № 03-24 от 08.02.2024) [9].

Дизайн эксперимента

В работе использовались 5 групп мышей по 3 головы, 3 группы из которых обрабатывались специфическими миРНК, количество вводимого вещества при этом составляло 1,5 нмоль/мкл. Введение миРНК осуществлялось без использования носителя [10]. Остальные группы принадлежали к группе неспецифического и вирусного контроля.

Мышей подвергали эвтаназии парами хлороформа с использованием газовой камеры на 24, 48 и 72-й час с момента инфицирования. Перед умерщвлением у мышей выполнялся сыв из ВДП, а также проводился забор крови посредством вскрытия сонной артерии под наркозом. После умерщвления у погибших животных изымались лёгкие для последующего определения титра вируса по цитопатическому действию (ЦПД) и экспрессии цитокинового профиля посредством полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени ОТ-ПЦР-РВ.

Изъятые лёгкие гомогенизировали в 1,5 мл среды MEM, а затем осветляли центрифугированием при 10 000 об./мин в течение 5 мин на микроцентрифуге (Eppendorf, Германия). Надосадочную жидкость использовали для выделения тотальной РНК и титрования вируса в культуре клеток (образцы предварительно фильтровали, используя фильтры с диаметром пор 0,1 мкм). Все полученные образцы хранили при –70 °С с целью последующего использования для титрования по ЦПД и постановки ОТ-ПЦР-РВ.

Методы определения экспрессии миРНК цитокинов

Тотальную РНК выделяли из лёгочного гомогената, смыва из ВДП и крови мышей набором ExtractRNA (Evrogen, Россия). Для постановки реакции обратной транскрипции (ОТ) применяли набор реагентов ОТ-1 (Синтол, Россия) [11]. Для ПЦР-РВ использовали набор реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя EVA Green и референсного красителя ROX (Синтол, Россия). Рабочая концентрация праймеров составила 10 пмоль на реакционную смесь. Реакция ПЦР-РВ проводилась в амплификаторе ДТ-96 (ДНК-технология, Россия).

Температурно-временной режим составил 95 °С в течение 5 мин (1 цикл), 62 °С — 40 с, 95 °С — 15 с (40 циклов). Праймеры для определения экспрессии цитокинов (Синтол, Россия) представлены в исследованиях [11–15]. Специфичность полученного сигнала оценивалась посредством выстраивания кривой при амплификации. Оценка изменения экспрессии целевого гена проводилась с использованием критерия $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [14]. Оценку влияния миРНК, направленных на мышинные гены (*Nup98* и *Nup205*), на экспрессию генов цитокинов, проводили относительно неспецифичной миРНК L2. Выполнялся расчёт разницы трёх повторов значений пороговых циклов ПЦР (ΔCt) между исследуемыми генами неспецифического контроля *siL2* и геном домашнего хозяйства *GAPDH*:

$$\Delta Ct = Ct (\text{интересующий ген}) - Ct (GAPDH).$$

Аналогичный расчёт ΔCt проводился для клеток, обработанных специфическими миРНК (*Nup98.1*, *Nup205.1*, *Nup98.1/Nup205.1*). Полученные данные усреднялись.

После определения ΔCt для всех исследуемых групп полученные в трёх повторах данные ΔCt усреднялись, а затем рассчитывалось значение $\Delta\Delta Ct$ относительно среднего значения ΔCt для клеток, обработанных миРНК:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{обработанный специфическими миРНК образец}) - \Delta Ct (\text{неспецифический контроль siL2}).$$

Для определения критерия $2^{-\Delta\Delta Ct}$ необходимо возвести в степень полученного значения $\Delta\Delta Ct$ для каждого исследуемого гена. Далее данные $2^{-\Delta\Delta Ct}$ будут представлены в относительных единицах (ОЕ) [15].

Титрование вируса по конечной точке цитопатического действия

Вирусный титр определялся микроскопически по крайней точке проявления цитопатического эффекта в культуре клеток MDCK. Клетки MDCK сеяли в 96-луночные планшеты при посевной концентрации 1×10^4 /см² на лунку. Через двое суток питательная среда удалялась из лунок, вносили 10-кратные последовательные разведения вирусного материала в поддерживающей среде и инкубировали на протяжении четырёх суток в CO₂-инкубаторе при 37 °С. На четвертые сутки проводили визуальный учёт результатов титрования под микроскопом на наличие специфического цитопатического эффекта для вируса гриппа (изменение, деформация, открепление мёртвых клеток со дна лунки). Вирусный титр рассчитывался по М.А. Ramakrishnan [16] и выражался как логарифм тканевых цитопатогенных доз (lg ТЦД₅₀/мл).

Статистический анализ

Статистическую значимость полученных результатов определяли с помощью критерия Манна–Уитни. Разница считалась достоверной при $p \leq 0,01$ и $p \leq 0,05$.

² Пашков Е.А. Иммунные механизмы интерференции РНК в противогриппозной защите : дис. ... канд. мед. наук. Москва, 2024. 105 с.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние миРНК на изменение экспрессии цитокинового профиля *in vivo* при гриппе

В лёгких мышей при интраназальном введении всех комплексов миРНК отмечалось снижение уровня экспрессии IL-1 β на вторые сутки с момента трансфекции в 0,6, 1,7 и в 4,5 OE по отношению к неспецифическому контролю *silL2*. В смывах ВДП на первые сутки отмечалось

повышение экспрессии IL-1 β также при введении всех комплексов миРНК. В данном случае, при интраназальном введении Nup98.1, рост экспрессии IL-1 β на первые сутки составил 1036 OE, для миРНК Nup205.1 — 112,6 OE, а для Nup98.1/Nup205.1 — 557,5 OE. В крови не отмечалось достоверного изменения экспрессии IL-1 β .

При оценке экспрессии IL-6 были получены следующие результаты. В лёгких мышей не отмечалось достоверного роста экспрессии IL-6 после интраназального введения комплексов миРНК и инфицирования, однако

Таблица 1. Влияние комплексов миРНК, направленных к генам *Nup98* и *Nup205*, на изменение концентрации цитокинов
Table 1. Effect of siRNA complexes directed to the *Nup98* and *Nup205* genes on changes in cytokine concentrations

Комплекс миРНК	Уровень экспрессии, относительные единицы								
	Лёгкие			Верхние дыхательные пути			Кровь		
	1-е сутки	2-е сутки	3-и сутки	1-е сутки	2-е сутки	3-и сутки	1-е сутки	2-е сутки	3-и сутки
<i>IL-1β</i>									
Nup98.1	1	-0,6*	1890	1	+1036,6*	0,03	1	743,2	723,8
Nup205.1	1	-1,7*	677	1	+112,6*	12,7	1	6016	5169
Nup98.1/ Nup205.1	1	-4,5*	2245	1	+557,5*	0,2	1	4712	698
<i>silL2</i>	1	112,4	603	1	0	1,2	1	71 446	2134
IAV	1	100	1748	1	0	0,6	1	14 985	350,1
<i>IL-6</i>									
Nup98.1	1	1	28,7	1	1	34,6	1	1	-45,2*
Nup205.1	1	1	34,05	1	1	-25,08*	1	1	-63,1*
Nup98.1/ Nup205.1	1	1	48,3	1	1	29,2	1	1	101,8
<i>silL2</i>	1	1	78,5	1	1	38,2	1	1	136,4
IAV	1	1	80,5	1	1	43,6	1	1	151,4
<i>TNF-α</i>									
Nup98.1	1	-333*	-0,05*	1	+588*	84,14	1	103,5	112,59
Nup205.1	1	620	-0,4*	1	+159,5*	20,96	1	601	183,52
Nup98.1/ Nup205.1	1	441	-0,12*	1	+200*	0	1	572,5	741,2
<i>silL2</i>	1	1286	33,8	1	70,5	56,46	1	793	4695,7
IAV	1	833	34	1	26	22,24	1	1275	6890,8
<i>IL-10</i>									
Nup98.1	1	1	+ 52,9*	1	1	12,1	1	1	90
Nup205.1	1	1	92,6	1	1	+570*	1	1	4472
Nup98.1/ Nup205.1	1	1	+183*	1	1	7,3	1	1	4543
<i>silL2</i>	1	1	5,4	1	1	254	1	1	42 467
IAV	1	1	1,2	1	1	134	1	1	58 280
<i>TGF-β1</i>									
Nup98.1	1	1	-29,9*	1	1	76,61	1	1	+2*
Nup205.1	1	1	-53,2*	1	1	97,34	1	1	+1,5*
Nup98.1/ Nup205.1	1	1	-63,1*	1	1	132,3	1	1	-0,9*
<i>silL2</i>	1	1	260,1	1	1	198,6	1	1	80,67
IAV	1	1	146,1	1	1	126,3	1	1	1,75

Примечание. В таблице полужирным выделены достоверные значения при (* $p < 0,05$).

Note. In the table, significant values are highlighted in bold at (* $p < 0,05$).

наблюдалось снижение экспрессии указанного цитокина в 25 ОЕ в ВДП спустя 72 ч с момента интраназального введения миРНК и инфицирования при использовании миРНК Nup205.1. Было установлено, что в тех группах, где мышей обрабатывали комплексами Nup98.1 и Nup205.1, наблюдалось снижение экспрессии указанного цитокина в крови к третьим суткам в 45,2 и в 63,1 ОЕ соответственно.

Уровень экспрессии TNF- α в лёгких снижался на вторые и третьи сутки. Экспрессия TNF- α в ВДП повышалась на вторые сутки при использовании всех комплексов миРНК в 588, 159 и 200 ОЕ. При оценке изменения экспрессии TNF- α в крови достоверных различий не обнаруживалось.

При использовании миРНК Nup98.1 и Nup98.1/Nup205.1 наблюдалось достоверное увеличение экспрессии IL-10 в лёгких к третьим суткам в 52,9 и 183,1 ОЕ с момента их интраназального введения на первые сутки. Повышение экспрессии IL-10 в ВДП отмечалось на третьи сутки при использовании миРНК Nup205.1 и составило 570 ОЕ. Достоверного изменения экспрессии IL-10 в крови мышей не наблюдалось.

Далее было установлено, что экспрессия TGF- β 1 снижалась на третьи сутки с момента трансфекции на 29,9, 53,2 и 63,1 ОЕ при введении всех комплексов миРНК по отношению к первым суткам. При этом противоположный результат отмечался при оценке динамики экспрессии TGF- β 1 в крови мышей. В данном случае наблюдался рост экспрессии среди групп мышей, обработанных миРНК Nup98.1 и Nup205.1, и составил 2 и 1,5 ОЕ. В случае с эквивалентной смесью Nup98.1/Nup205.1 отмечалось снижение экспрессии TGF- β 1 в 0,9 ОЕ. Полученные данные представлены в табл. 1.

Противовирусный эффект комплексов миРНК

Использование всех миРНК приводило к снижению вирусной репродукции. Применение миРНК Nup98.1 снижало вирусную репродукцию на третьи сутки на 2,3 lg ТЦД₅₀/мл по сравнению с неспецифической группой контроля siL2. На 2,1 lg ТЦД₅₀/мл достоверно снижался вирусный титр при использовании миРНК Nup205.1. При оценке противовирусной активности эквивалентной смеси Nup98.1/Nup205.1 было установлено, что у мышей, обработанных данным комплексом, вирусная активность была достоверно снижена на 1,4 lg ТЦД₅₀/мл. Полученные данные представлены на рис. 1.

ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам проведённой оценки динамики экспрессии цитокинов было установлено, что на локальных уровнях наблюдались достоверные различия в экспрессии про- и противовоспалительных цитокинов. При использовании всех миРНК на вторые сутки с момента трансфекции и инокуляции отмечался наиболее выраженный рост экспрессии провоспалительных цитокинов IL-1 β (1036,

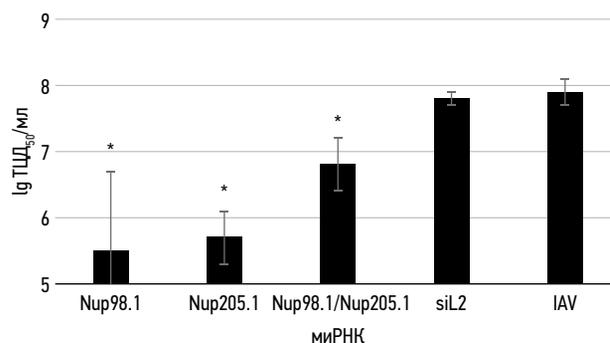


Рис. 1. Влияние подавления генов *Nup98* и *Nup205* посредством миРНК на репродукцию вируса гриппа A/California/7/09 (H1N1) на 3-и сутки с момента трансфекции при LD50. На оси абсцисс — названия миРНК; на оси ординат — показатель вирусного титра. * $p < 0,05$ относительно неспецифической siL2.

Fig. 1. Effect of *Nup98* and *Nup205* gene silencing by siRNA on the replication of influenza A/California/7/09 (H1N1) virus on day 3 post transfection at LD50. The abscissa shows the siRNA names; the ordinate shows the viral titer. * $p < 0.05$ relative to non-specific siL2.

112,6 и 557,5 ОЕ соответственно) и TNF- α (588, 159 и 200 ОЕ соответственно). К третьим суткам экспрессия указанных цитокинов снижалась и не наблюдалось достоверной разницы по сравнению с группой неспецифического контроля. Также при использовании миРНК Nup98.1 и Nup98.1/Nup205.1 в лёгких к третьим суткам отмечалось достоверное нарастание уровня экспрессии противовоспалительного IL-10 на 52,9 и 183 ОЕ на фоне снижения экспрессии TGF- β 1 и TNF- α .

При трансфекции миРНК Nup205.1 наблюдались следующие результаты. На третьи сутки в ВДП отмечался рост уровня экспрессии IL-10 на 570 ОЕ, а в крови — повышение уровня экспрессии TGF- β 1 на 1,5 ОЕ. Достоверное изменение экспрессии IL-10 и TGF- β 1 обнаруживалось на фоне снижения IL-6 в ВДП на 25 ОЕ и на системном уровне на 63,1 ОЕ.

Использование всех миРНК приводит к противовирусному эффекту на третьи сутки с момента инокуляции вируса и интраназального введения миРНК. При использовании миРНК Nup98.1, Nup205.1 и Nup98.1/Nup205.1 показатель вирусного титра составил 5,5, 5,7 и 6,8 lg ТЦД₅₀/мл, в то время как в группах неспецифического и вирусного контроля титр вируса составил 7,8 и 7,9 lg ТЦД₅₀/мл.

При оценке экспрессии цитокинов после применения комплексов миРНК было установлено выраженное иммуномодулирующее действие комплексов миРНК. Наличие иммуномодулирующего эффекта может быть обусловлено тем, что комплексы миРНК взаимодействовали с TLR и это способствовало изначальному повышению продукции провоспалительных цитокинов, а далее приводило к увеличению продукции противовоспалительных цитокинов. Предположительно, наблюдаемая динамика экспрессии рассматриваемых цитокинов

обусловлена как взаимодействием инокулированных миРНК с TLR 3, 7 и 8-го типов [17, 18], так и нарушением процесса вирусной репродукции, о чём говорят полученные результаты оценки противогриппозной активности миРНК. Схожий результат, заключающийся в ингибировании вирусной репродукции посредством инокуляции циркулирующей РНК *in vitro* и *in vivo*, на фоне чего наблюдается активация IFN- β , отражён в исследовании Jie Min и соавт. [19].

Наличие дискордантного изменения экспрессии цитокинов на локальном и системном уровнях может быть обусловлено выбранным путём введения миРНК. В связи с тем, что соединения вводились локально, более выраженная экспрессия наблюдалась в ВДП и лёгких.

Вопрос создания лекарственных средств для экстренной профилактики и терапии гриппозной инфекции в настоящее время имеет особую актуальность. Предельно важно, чтобы разрабатываемые лекарственные препараты были безопасны для пациента и имели узкий спектр противопоказаний. Дополнительным их свойством должна быть способность на фоне противовирусного эффекта оказывать также и иммуностимулирующий эффект [20]. В настоящем исследовании получены данные о том, что противогриппозный эффект комплексов миРНК на модели *in vivo* приводит к выраженному иммуномодулирующему эффекту в ВДП и лёгких, в местах введения комплексов миРНК, несмотря на способность вируса гриппа оказывать иммуносупрессивное действие.

Резюме основного результата исследования

Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследованные в работе миРНК обладают не только противовирусной активностью, но также и иммуномодулирующей, что способствует более эффективному иммунному ответу организма. Установлено, что на фоне снижения вирусной репродукции в экспериментальных группах наблюдается изменение экспрессии исследуемых групп цитокинов.

Обсуждение основного результата исследования

Использование миРНК на модели *in vivo* приводит к повышению экспрессии генов исследуемых цитокинов на локальных уровнях в местах введения комплексов миРНК на фоне снижения вирусной репродукции. Это свидетельствует о том, что препараты миРНК способны обладать не только противовирусным эффектом, но также и иммуностимулирующим.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные результаты позволят разработать принципы быстрого проектирования и создания специфических противовирусных средств, предназначенных для защиты от старых и новых патогенных вирусов, обеспечения противозидемической безопасности различных групп населения и эффективного ответа на возникновение пандемий и случаев биотерроризма.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Исследование и публикация статьи осуществлены за счёт финансирования в рамках государственного задания.

Раскрытие интересов. Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов (личных, профессиональных или финансовых), связанных с третьими лицами (коммерческими, некоммерческими, частными), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи, а также иных отношений, деятельности и интересов за последние три года, о которых необходимо сообщить.

Вклад авторов. Е.А. Пашков — выполнение экспериментов, обзор литературы, сбор и анализ литературных источников, написание текста и редактирование статьи; Е.Б. Файзулов, Д.В. Мильчаков, Р.Е. Лушников, Л.С. Рожкова — выполнение экспериментов, написание текста; Е.А. Богданова, О.А. Свитич, В.В. Зверев — обзор литературы, сбор и анализ литературных источников, написание текста и редактирование статьи. Все авторы одобрили версию для публикации, а также согласились нести ответственность за все аспекты работы и гарантировали, что вопросы, связанные с точностью или добросовестностью любой части работы, будут должным образом рассмотрены и решены.

ADDITIONAL INFORMATION

Funding source. The research and publication of the article were carried out with funding from a government assignment.

Disclosure of interest. The authors have no relationships, activities or interests (personal, professional or financial) with for-profit or not-for-profit third parties whose interests may be affected by the content of the manuscript, as well as other relationships, activities or interests for the last three years that needed to disclose.

Authors' contribution. E.A. Pashkov — conducting experiments, literature review, collection and analysis of literary sources, writing the text and editing the article; E.B. Faizuloev, D.V. Milchakov, R.E. Lushnikov, L.S. Rozhkova — conducting experiments, writing the text; E.A. Bogdanova, O.A. Svitich, V.V. Zverev — literature review, collection and analysis of literary sources, writing the text and editing the article. Thereby, authors provided approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Rodríguez-Gutiérrez JF, Estella Á. Latest developments in early diagnosis and specific treatment of severe influenza infection. *J Intensive Med*. 2023;4(2):160–174. doi: 10.1016/j.jointm.2023.09.006 EDN: XDYOCO
2. Zhang Q, Zhang X, Lei X, et al. Influenza A virus NS1 protein hijacks YAP/TAZ to suppress TLR3-mediated innate immune response. *PLoS Pathog*. 2022;18(5):e1010505. doi: 10.1371/journal.ppat.1010505
3. Park HS, Liu G, Thulasi Raman SN, et al. NS1 protein of 2009 pandemic influenza A virus inhibits porcine NLRP3 inflammasome-mediated interleukin-1 beta production by suppressing ASC ubiquitination. *J Virol*. 2018;92(8):e00022-18. doi: 10.1128/JVI.00022-18
4. Hou Y, Wang Y, Chen J, Chen C. Dual roles of tumor necrosis factor superfamily 14 in antiviral immunity. *Viral Immunol*. 2022;35(9):579–585. doi: 10.1089/vim.2022.0070
5. Wang X, Wong K, Ouyang W, Rutz S. Targeting IL-10 family cytokines for the treatment of human diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2019;11(2):a028548. doi: 10.1101/cshperspect.a028548
6. Cui H, Wang N, Li H, et al. The dynamic shifts of IL-10-producing Th17 and IL-17-producing Treg in health and disease: a crosstalk between ancient “Yin-Yang” theory and modern immunology. *Cell Commun Signal*. 2024;22(1):99. doi: 10.1186/s12964-024-01505-0 EDN: ILELJR
7. Liu Q, Chen G, Moore J, et al. Exploiting canonical TGFβ signaling in cancer treatment. *Mol Cancer Ther*. 2022;21(1):16–24. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-20-0891
8. Wong KH, Lal SK. Alternative antiviral approaches to combat influenza A virus. *Virus Genes*. 2023;59(1):25–35. doi: 10.1007/s11262-022-01935-3 EDN: JAVTVZ
9. Pashkov E, Korchevaya E, Faizuloev E, et al. Knockdown of FLT4, Nup98, and Nup205 cellular genes effectively suppresses the reproduction of influenza virus strain A/WSN/1933 (H1N1) in vitro. *Infect Disord Drug Targets*. 2022;22(5):e250322202629. doi: 10.2174/1871526522666220325121403 EDN: BIMTOK
10. Kaushal A. Innate immune regulations and various siRNA modalities. *Drug Deliv Transl Res*. 2023;13(11):2704–2718. doi: 10.1007/s13346-023-01361-4 EDN: CRRPJ
11. Pashkov E, Momot V, Pak A, et al. Influence of siRNA complexes on the reproduction of influenza A virus (Orthomyxoviridae: Alphainfluenzavirus) in vivo. *Vopr Virusol*. 2023;68(2):95–104. doi: 10.36233/0507-4088-159 EDN: RHEUQD
12. Bień K, Żmigrodzka M, Orłowski P, et al. Involvement of Fas/FasL pathway in the murine model of atopic dermatitis. *Inflamm Res*. 2017;66(8):679–690. doi: 10.1007/s00011-017-1049-z EDN: UPZREU
13. Lin YC, Ku CC, Wuputra K, et al. Vulnerability of antioxidant drug therapies on targeting the Nrf2-Trp53-Jdp2 axis in controlling tumorigenesis. *Cells*. 2024;13(19):1648. doi: 10.3390/cells13191648 EDN: FSALVE
14. Harshitha R, Arunraj DR. Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. *Biochem Mol Biol Educ*. 2021;49(5):800–812. doi: 10.1002/bmb.21552 EDN: CKJOCM
15. Hamilton TA, Ohmori Y, Tebo J. Regulation of chemokine expression by antiinflammatory cytokines. *Immunol Res*. 2002;25(3):229–245. doi: 10.1385/IR.25.3:229 EDN: HDVLYO
16. Ramakrishnan MA. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J Virol*. 2016;5(2):85–86. doi: 10.5501/wjv.v5.i2.85
17. Man HSJ, Moosa VA, Singh A, et al. Unlocking the potential of RNA-based therapeutics in the lung: current status and future directions. *Front Genet*. 2023;14:1281538. doi: 10.3389/fgene.2023.1281538 EDN: RWSUVR
18. Hinay AA Jr, Kakee S, Kageyama S, et al. Pro-inflammatory cytokines and interferon-stimulated gene responses induced by seasonal influenza A virus with varying growth capabilities in human lung epithelial cell lines. *Vaccines (Basel)*. 2022;10(9):1507. doi: 10.3390/vaccines10091507 EDN: WMROFZ
19. Min J, Ma J, Wang Q, Yu D. Long non-coding RNA SNHG1 promotes bladder cancer progression by upregulating EZH2 and repressing KLF2 transcription. *Clinics (Sao Paulo)*. 2022;77:100081. doi: 10.1016/j.clinsp.2022.100081
20. Pak AV, Pashkov EA, Abramova ND, et al. Effect of antiviral siRNAs on the production of cytokines in vitro. *Fine Chemical Technologies*. 2022;17(5):384–393. doi: 10.32362/2410-6593-2022-17-5-384-393 EDN: MEFLST

ОБ АВТОРАХ

* **Пашков Евгений Алексеевич**, канд. мед. наук;
адрес: Россия, 105064, Москва, пер. Малый Казенный, д. 5а;
ORCID: 0000-0002-5682-4581;
eLibrary SPIN: 4933-1128;
e-mail: pashckov.j@yandex.ru

Файзулов Евгений Бахтиёрович, канд. биол. наук;
ORCID: 0000-0001-7385-5083;
eLibrary SPIN: 1908-7720;
e-mail: faizuloev@mail.ru

Мильчаков Данил Владимирович;
ORCID: 0009-0001-6247-7088;
e-mail: qugard1@gmail.com

AUTHORS' INFO

* **Evgeny A. Pashkov**, MD, Cand. Sci. (Medicine);
address: 5a Malyy Kazennyy aly, Moscow, Russia, 105064;
ORCID: 0000-0002-5682-4581;
eLibrary SPIN: 4933-1128;
e-mail: pashckov.j@yandex.ru

Evgeny B. Faizuloev, Cand. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0001-7385-5083;
eLibrary SPIN: 1908-7720;
e-mail: faizuloev@mail.ru

Danil V. Milchakov;
ORCID: 0009-0001-6247-7088;
e-mail: qugard1@gmail.com

Лушников Руслан Евгеньевич;

ORCID: 0009-0008-4788-0005;

eLibrary SPIN: 1703-5706;

e-mail: ruslan_lushnikov@mail.ru

Богданова Екатерина Александровна, канд. мед. наук;

ORCID: 0000-0002-5620-1843;

eLibrary SPIN: 7250-5808;

e-mail: bogdekaterin@yandex.ru

Рожкова Ланита Сергеевна;

ORCID: 0009-0002-6150-9938;

e-mail: lanitarozhkova@yandex.ru

Свитич Оксана Анатольевна, д-р мед. наук, профессор,

чл.-корр. РАН;

ORCID: 0000-0003-1757-8389;

eLibrary SPIN: 8802-5569;

e-mail: svitichoa@yandex.ru

Зверев Виталий Васильевич, д-р биол. наук, профессор,

академик РАН;

ORCID: 0000-0002-0017-1892;

eLibrary SPIN: 2122-1808;

e-mail: vitalyzverev@outlook.com

Ruslan E. Lushnikov;

ORCID: 0009-0008-4788-0005;

eLibrary SPIN: 1703-5706;

e-mail: ruslan_lushnikov@mail.ru

Ekaterina A. Bogdanova, MD, Cand. Sci. (Medicine);

ORCID: 0000-0002-5620-1843;

eLibrary SPIN: 7250-5808;

e-mail: bogdekaterin@yandex.ru

Lanita S. Rozhkova;

ORCID: 0009-0002-6150-9938;

e-mail: lanitarozhkova@yandex.ru

Oxana A. Svitich, MD, Dr. Sci. (Medicine), Professor,

Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences;

ORCID: 0000-0003-1757-8389;

eLibrary SPIN: 8802-5569;

e-mail: svitichoa@yandex.ru

Vitaly V. Zverev, Dr. Sci. (Biology), Professor,

academician of the Russian Academy of Sciences;

ORCID: 0000-0002-0017-1892;

eLibrary SPIN: 2122-1808;

e-mail: vitalyzverev@outlook.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author