

Комплексный нокдаун клеточных генов посредством малых интерферирующих РНК с целью снижения репродукции вируса гриппа (штамм А/WSN/1933).

Пашков Е.А.¹, Коротышева М.О.²

1 - Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, Россия, *E-mail: pashkov.j@yandex.ru*; 2 - Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, Россия, *E-mail: m10042001achr@gmail.com*

Введение. По данным ВОЗ, грипп - одна из наиболее актуальных проблем мирового здравоохранения. Каждый год около 500 тыс. человек умирают вследствие не только самой инфекции, но и от вызванных ей осложнений [1]. Вследствие высокой изменчивости, ежегодно появляются новые штаммы, обладающие резистентностью ко многим противовирусным терапевтическим средствам [2]. Разработка лекарственных средств, основанных на механизме сайленсинга генов с помощью миРНК является перспективным направлением.

Цель исследования: Оценка эффективности одновременного нокдауна двух и более клеточных генов (*FLT4*, *Nup98* и *Nup205*) с помощью малых интерферирующих РНК с целью снижения репродукции вируса гриппа А/WSN/33 (H1N1) в культуре клеток А549.

Материалы и методы. *Вирусы.* В работе использовали штамма вируса гриппа А А/WSN/1933 (St. Jude's Children's Research Hospital, USA). *Клеточные линии.* Культура клеток А549 - аденокарцинома человеческого лёгкого (ATCC® CCL-185, USA). *миРНК.* миРНК *FLT4*, *Nup98*, *Nup205* к мРНК целевых генов (Синтол, РФ). Из этих миРНК были составлены комбинации комплексов: А (*FLT4+Nup98*), Б (*Nup98+Nup205*), В (*FLT4+Nup205*), Г (*FLT4+Nup98+Nup205*). Для оценки эффективности комплексов миРНК была синтезирована неспецифическая миРНК *L2*. *Трансфекционный агент.* Lipofectamin2000 (Invitrogen, USA). Клетки А549 высевались в 24-луночные планшеты, далее обрабатывались комплексами миРНК и Lipofectamin2000. Через 4 часа клетки заражались вирусом гриппа при множественности заражения (*moi*) 0.1 и 0.01. Клеточный лизат и супернатант отбирались в течение 3 дней с момента трансфекции, затем проводилась оценка вирусной активности с использованием метода титрования по ЦПД. Количество вРНК определялось с помощью ОТ-ПЦР-РВ. Для вычисления статистически значимых различий между группами авторы использовали непараметрический критерий Манна-Уитни.

Результаты исследования. Наиболее эффективное снижение вирусной репродукции отмечалось при *moi* 0.01, при использовании комплексов В и Г. Вирусная репродукция достоверно снижалась на 1.8 и 2 lg ТЦД₅₀/мл на 1ые и на 1.8 и 2.5 lg ТЦД₅₀/мл на 2ые сутки ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с контролями. При *moi* 0.1 применение только комплекса Г, приводило к снижению вирусной репродукции на 1.5 lg ТЦД₅₀/мл в 1ые сутки по сравнению с миРНК *siL2* ($p < 0,05$). Результаты титрования коррелировали с полученными результатами ОТ-ПЦР-РВ.

Выводы. Проведённые исследования показывают, что комплексный нокдаун экспрессии клеточных генов даёт достоверное снижение вирусной репродукции.

1.

Источники и литература

- 1) 1. Peteranderl C., Herold S., Schmoldt C. Human influenza virus infections. Semin. Respir. Crit. Care Med. 2016; 37(4): 487-500. doi:10.1055/s-0036-1 584801

- 2) 2. Han J, Perez J, Schafer A, Cheng H, Peet N, Rong L, Manicassamy B. Influenza Virus: Small Molecule Therapeutics and Mechanisms of Antiviral Resistance. *Curr Med Chem.* 2018; 25(38):5115-5127. doi: 10.2174/0929867324666170920165926