

СИНТЕТИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЫ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК СПЕЦИФИЧЕСКИ ПОДАВЛЯЮТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ (IL-25 И TSLP) В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VITRO*

Каганова М.М.¹, Шиловский И.П.¹, Тимотиевич Е.Д.¹, Юмашев К.В.¹,
Гурский Д.А.^{1,2}, Виноградова К.В.^{1,2}, Попова М.В.^{1,3}, Хаитов М.Р.^{1,3}

¹ ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина», Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Аллергический ринит (АР) — воспалительное заболевание верхних дыхательных путей (слизистой оболочки носовой полости). От АР в мире страдают до 40% населения, в Российской Федерации заболеваемость находится на уровне 18-30% в зависимости от региона. Несмотря на то, что АР не является тяжелой патологией, он наносит значительный экономический ущерб. Другая опасность этого заболевания состоит в том, что в 40% случаев у пациентов с АР впоследствии развивается более тяжелая инвалидизирующая патология — БА. Широкая распространенность и значительные экономические потери, обусловленные АР, определяют значимость разработки новых способов профилактики и контроля данного заболевания, так как существующих способов лечения недостаточно. Однако поиск новых способов терапии невозможен без детального изучения молекулярных механизмов патогенеза АР. Длительное время считалось, что данное аллергическое воспаление формируется по Th2-зависимому механизму с участием Th2-лимфоцитов, В-клеток и эозинофилов и выделяемых ими провоспалительных цитокинов: IL-4, IL-5 и IL-13. Однако на данный момент накоплены экспериментальные доказательства участия эпителиальных клеток респираторного тракта и выделяемых ими провоспалительных цитокинов (IL-25, IL-33 и TSLP) в патогенезе АР и БА. Было показано, что IL-25 индуцирует выработку IL-4, IL-5 и IL-13, направляя иммунный ответ по Th2-типу. При этом мыши с инактивированным IL-25 практически не развивают Th2-иммунный ответ. Инактивация IL-33 значительно снижает уровень воспаления (опосредованного эозинофилами) респираторно-

Адрес для переписки:

Каганова Мария Михайловна
ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства
115522, Россия, Москва, Каширское шоссе, 24.
Тел.: 8 (495) 441-67-10.
E-mail: mariya.kaganova.99@mail.ru

Address for correspondence:

Mariya M. Kaganova
National Research Center — Institute of Immunology,
Federal Medical-Biological Agency
24 Kashirskoe Highway
Moscow
115522 Russian Federation
Phone: +7 (495) 441-67-10.
E-mail: mariya.kaganova.99@mail.ru

Образец цитирования:

М.М. Каганова, И.П. Шиловский, Е.Д. Тимотиевич, К.В. Юмашев, Д.А. Гурский, К.В. Виноградова, М.В. Попова, М.Р. Хаитов «Синтетические молекулы малых интерферирующих РНК специфически подавляют экспрессию генов провоспалительных цитокинов (IL-25 и TSLP) в экспериментах *in vitro*» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 5. С. 1107-1114. doi: 10.15789/1563-0625-SSI-16795

© Каганова М.М. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

M.M. Kaganova, I.P. Shilovskiy, E.D. Timotievich, K.V. Yumashev, D.A. Gurskii, K.V. Vinogradova, M.V. Popova, M.R. Khaitov "Synthetic small interfering RNAs selectively suppress the expression of proinflammatory cytokine genes (IL-25 and TSLP) in experiments *in vitro*", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 5, pp. 1107-1114. doi: 10.15789/1563-0625-SSI-16795

© Kaganova M.M. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-SSI-16795

го тракта. Мыши, нокаутные по рецептору цитокина TSLP, не развивали назальную гиперреактивность в ответ на аллерген, однако уровень воспаления слизистой оболочки носа оставался высоким. Сейчас активно ведутся работы по созданию новых лекарственных средств, способных специфично блокировать активность перечисленных цитокинов; прежде всего лекарственных средств на основе нейтрализующих моноклональных антител. Однако существуют и другие технологии, при помощи которых можно регулировать активность генов, например технология, основанная на феномене РНК-интерференции. С ее помощью можно подавить экспрессию любого гена с известной нуклеотидной последовательностью, в том числе генов, кодирующих провоспалительные цитокины.

Учитывая вышесказанное, целью данной работы было проектирование синтетических молекул миРНК и изучение их способности специфически блокировать экспрессию генов, кодирующих провоспалительные цитокины IL-25 и TSLP, в экспериментах *in vitro*.

Ключевые слова: миРНК, РНК-интерференция, цитокины, воспаление, IL-25, IL-33, TSLP

SYNTHETIC SMALL INTERFERING RNAS SELECTIVELY SUPPRESS THE EXPRESSION OF PROINFLAMMATORY CYTOKINE GENES (IL-25 AND TSLP) IN EXPERIMENTS *IN VITRO*

Kaganova M.M.^a, Shilovskiy I.P.^a, Timotievich E.D.^a, Yumashev K.V.^a, Gurskii D.A.^{a, b}, Vinogradova K.V.^{a, b}, Popova M.V.^{a, c}, Khaitov M.R.^{a, c}

^a National Research Center — Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

^b K. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russian Federation

^c N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Allergic rhinitis (AR) is an inflammatory disease of the upper respiratory tract (nasal mucosa). AR affects up to 40% of the world's population; in the Russian Federation, the incidence is 18% to 30%, depending on the region. Despite the fact that AR is not a severe pathology, it causes significant economic burden. Another threat associated with this disease is that in 40% of cases, patients with AR eventually develop a more severe disabling pathology — AD. Widespread prevalence and significant economic disadvantages caused by AR determine the importance of developing new ways of prevention and control of this disease, as the existing methods of therapy are insufficient. However, the search for new ways of therapy is impossible without a detailed investigation of the molecular mechanisms of AR pathogenesis. For a long time it was considered that this allergic inflammation is formed by Th2-dependent mechanism with involvement of Th2-lymphocytes, B-cells and eosinophils and pro-inflammatory cytokines: IL-4, IL-5 and IL-13. However, experimental evidence has now accumulated on the role of epithelial cells of the respiratory tract and the proinflammatory cytokines they secrete (IL-25, IL-33 and TSLP) in the pathogenesis of AR and AD. IL-25 has been shown to induce the production of IL-4, IL-5 and IL-13, directing a Th2-type immune response. At the same time, mice with inactivated IL-25 developed barely any Th2-immune response. Inactivation of IL-33 significantly reduces inflammation (mediated by eosinophils) of the respiratory tract. Mice knockout for the cytokine receptor TSLP did not develop nasal hyperreactivity in response to allergen, but the level of nasal mucosal inflammation remained high. Currently, work is actively progressing on the development of new drugs capable of specifically blocking the activity of the listed cytokines; first of all, drugs based on neutralizing monoclonal antibodies. However, there are other technologies that can be used to regulate the activity of genes, such as the technology based on the RNA interference. It can be used to suppress the expression of any gene with a known nucleotide sequence, including genes encoding pro-inflammatory cytokines.

Considering the above, the aim of this work was to design synthetic miRNA molecules and study their ability to specifically block the expression of genes encoding proinflammatory cytokines IL-25 and TSLP in experiments *in vitro*.

Keywords: siRNA, RNA interference, cytokines, inflammation, IL-25, IL-33, TSLP

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 23-45-10031).

Введение

Одними из самых распространенных аллергопатологий считаются аллергический ринит (АР) и бронхиальная астма (БА). От АР в мире страдают до 40% населения [3], в России – от 18-38% в зависимости от региона [1]. В отдельных странах заболеваемость БА достигает 18%, в России – около 7% [1]. Продолжающийся рост заболеваемости свидетельствует о том, что существующих способов лечения недостаточно, поэтому актуальна разработка новых безопасных и эффективных средств борьбы с этими заболеваниями [3], но она невозможна без детального изучения механизма патологии.

Патогенез обоих заболеваний (АР и БА) связан с развитием аллергического воспаления в верхних (в случае АР) и нижних (в случае БА) дыхательных путях. Длительное время считалось, что это воспаление формируется по Th2-зависимому механизму с участием Th2-лимфоцитов, В-клеток и эозинофилов и выделяемых ими провоспалительных цитокинов (IL-4, IL-5 и IL-13) [2]. На данный момент накоплены экспериментальные доказательства участия эпителиальных клеток респираторного тракта и выделяемых ими провоспалительных цитокинов (IL-25, IL-33 и TSLP) в патогенезе АР и БА [6].

Было показано, что IL-25 индуцирует выработку IL-4, IL-5 и IL-13, направляя иммунный ответ по Th2-типу [10]. Мыши с инактивированным IL-25 практически не развивают Th2-иммунный ответ. В то же время интраназальное введение рекомбинантного IL-25 мышам приводит к формированию аллергического воспаления даже в отсутствие Т- и В-клеток [4]. Множество исследований подтвердило значимость IL-33 в развитии аллергии. Его инактивация значительно снижает уровень воспаления (опосредованного эозинофилами) респираторного тракта [6]. TSLP также вовлечен в развитие аллергии. Мыши, нокаутные по рецептору этого цитокина, не развивали назальную гиперреактивность в ответ на аллерген, однако уровень воспаления слизистой оболочки носа оставался высоким [6].

Учитывая ключевую роль указанных провоспалительных цитокинов в патогенезе аллергического воспаления, активно ведутся работы по созданию новых лекарственных средств, способных специфично блокировать их активность; прежде всего лекарственных средств на основе нейтрализующих моноклональных антител [7].

Однако существуют и другие технологии, при помощи которых можно регулировать ак-

тивность генов, например технология, основанная на феномене РНК-интерференции. Под РНК-интерференцией понимают механизм негативной регуляции экспрессии генов при помощи молекул малых интерферирующих РНК (миРНК). Молекулы миРНК размером 21 п.н. специфически нацеливаются на мРНК генов-мишеней, после чего при помощи ферментов клетки осуществляется деградация мРНК, и подавляется экспрессия соответствующего гена [9]. При помощи РНК-интерференции можно подавить экспрессию любого гена с известной нуклеотидной последовательностью, в том числе генов, кодирующих провоспалительные цитокины.

Ранее нашим коллективом были созданы молекулы миРНК, способные подавлять экспрессию гена *IL33* мыши в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. В модели вирус-индуцированных обострений БА у мышей ингаляционное введение миРНК против *IL33* приводило к уменьшению выраженности аллергического воспаления легких, опосредованного эозинофилами [8]. Эти результаты подтверждают перспективность применения технологии РНК-интерференции для разработки противовоспалительных препаратов.

Учитывая вышесказанное, **целью данной работы** было проектирование синтетических молекул миРНК и изучение их способности специфически блокировать экспрессию генов, кодирующих провоспалительные цитокины IL-25 и TSLP, в экспериментах *in vitro*.

Материалы и методы

Питательные среды и растворы

Полная среда DMEM (НПП «ПанЭко», Россия) содержала: 25 mM HEPES (НПП «ПанЭко», Россия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), 300 мг/л L-глутамина (НПП «ПанЭко», Россия) и 50 мкг/мл гентамицина (Gibco, США). Бессывороточная среда DMEM содержала 25 mM HEPES (НПП «ПанЭко», Россия), 300 мг/л L-глутамина (НПП «ПанЭко», Россия) и 50 мкг/мл гентамицина (Gibco, США).

Лизирующий буфер готовили путем растворения в 100 мл дистиллированной воды 42,7 г гуанидин-тиоцината (Biochemica, Германия). Данным буфером лизировали клетки для последующего выделения общей РНК и постановки полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ).

Проектирование молекул миРНК против генов, кодирующих IL-25 и TSLP мыши

Для проектирования миРНК использовалась программа OligoWalk (программное обеспечение второго поколения) и последовательности генов *IL25* и *Tslp*, опубликованные в базе данных GeneBank (BC120568.1; AF232937.1). Было

спрогнозировано 19 различных вариантов молекул миРНК против разных частей гена *IL25* и 96 против *Tslp*, из которых для синтеза и тестирования было отобрано 5 вариантов миРНК против гена *IL25* мыши и 6 вариантов против гена *Tslp* мыши. Синтез спроектированных молекул осуществлено твердофазным методом в компании ООО «Синтол» (Россия).

Скрининг биологической активности миРНК *in vitro*

Скрининг биологической активности синтезированных миРНК проведен на культуре клеток L929 (фибробласты мыши) и дополнительно на культуре клеток NIH3T3 (эмбриональные фибробласты мыши), конститутивно экспрессирующих целевые гены *IL25* и *Tslp*.

Клеточную линию фибробластов мыши L929 (Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России) культивировали в полной среде DMEM (НПП «ПанЭко», Россия). Клетки высевали в 24-луночные культуральные планшеты в количестве 1×10^5 клеток/лунку в полной среде DMEM и культивировали (37 °C, 5% CO₂) в течение 24 ч. Клетки трансфецировали 1 мкг миРНК, с использованием Lipofectamine 3000 (Life Technologies, США) в соответствии с рекомендациями производителя. В качестве отрицательного контроля использовали миРНК против гена *gfp*, кодирующего зеленый флуоресцирующий белок (siGFP). Через 24 ч после трансфекции собирали лизаты клеток для оценки уровня экспрессии генов *IL25* и *Tslp* с помощью количественной ПЦР. Аналогично проводили трансфекцию клеток линии NIH3T3.

Количественная ПЦР-РВ

Уровень экспрессии мРНК генов *IL25* и *Tslp* оценивали методом ПЦР-РВ. Для этого из лизатов клеток L929 и NIH3T3 выделяли общую РНК с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, США) в соответствии с рекомендацией производителя. Полученную РНК использовали в реакции обратной транскрипции для синтеза библиотеки кДНК с применением набора реактивов «Реверта Л» (ООО «Амплисенс», Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. ПЦР-РВ проводили с использованием набора реактивов «2,5× Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ» (ООО «Синтол», Россия), специфических праймеров и зонда (см. ниже) и амплификатора DTrime 5 (ООО «НПО ДНК-технология», Россия). В качестве выравнивающего гена использовали *Hprt* мыши. Последовательность праймеров и зонда для *IL25*: прямой – CACACCCACCGCAGAAT, обратный – CAACTCATAGCTCCAAGGAGAGATG, зонд – (ROX) CCAGCAAGGATGGCCCCCTCA (RTQ2). Для

Tslp: прямой – AGCTTGTCTCCTGAAAATCGAG, обратный – CTTGTTCTCCGGGCAAATG, зонд – (ROX) GCTGCCCTTCACTCCCCGAC (RTQ2). Для *Hprt*: прямой – GCACTGAATAGAAATAGTGATAGATCC, обратный – CAGTTAAAGTTGAGAGATCATCTCC, зонд – (ROX) CAGACTGAAGAGCTACTGTAATGATCAGTCAAC (RTQ2).

Статистический анализ данных

Для всех количественных данных вычисляли среднее арифметическое (М) и стандартную ошибку среднего (m). Определяли межгрупповые различия с помощью непараметрического критерия Краскела–Уоллиса с использованием программы Statistica 12.0 (StatSoft Inc., США).

Результаты и обсуждение

Проектирование оптимальных последовательностей миРНК

С использованием программы OligoWalk было спроектировано 19 вариантов миРНК против гена *IL25* и 96 вариантов против гена *Tslp* мыши. Из них для синтеза было отобрано 5 вариантов миРНК против гена *IL25* мыши и 6 вариантов против гена *Tslp* (табл. 1). Спроектированные варианты миРНК против обоих генов таргетируют центральную кодирующую часть мРНК генов-мишеней.

Отбор спроектированных миРНК для дальнейшего синтеза производился на основании теоретических расчетов, осуществляемых программой OligoWalk и рекомендаций, приведенных в других исследовательских работах. Программное обеспечение OligoWalk относится к 2-му поколению и позволяет не только проектировать миРНК, но и рассчитывать их теоретическую эффективность (табл. 1). Поэтому для дальнейшего синтеза отбирались варианты, характеризующиеся высокой теоретически предсказанной эффективностью.

В ряде публикаций также описаны некоторые рекомендации по выбору оптимальных миРНК. Эльбашир и др. показали, что миРНК длиной 19–21 нуклеотидов с двумя нуклеотидными выступами на 3'-конце блокируют экспрессию генов. Кроме того, показано, что длинные молекулы миРНК (более 21 пн) менее стабильны, а также они вызывают неспецифическую активацию врожденной иммунной системы [5]. Поэтому мы проектировали миРНК размером 19 нуклеотидов, а на 3'-конец добавляли динуклеотид ТТ.

Длинные молекулы миРНК (более 21 пн) активируют врожденную иммунную систему, стимулируя рецепторы TLR [11]. Для уменьшения вероятности неспецифической активации врожденного иммунного ответа мы проектировали молекулы миРНК минимально возможного размера – 21 пн.

ТАБЛИЦА 1. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ МОЛЕКУЛ МИРНК ПРОТИВ ГЕНА *Il25* И *Tslp* МЫШИ И ИХ ХАРАКТЕРИСТИКИ
TABLE 1. SEQUENCES AND CHARACTERISTICS OF siRNA MOLECULES AGAINST THE MOUSE *Il25* AND *Tslp* GENES

№ No.	Название Name	Цепь Strand	Последовательность 5-3 Subsequence 5-3	ДНК-мишень 5-3 Target DNA 5-3	Теор. эфф. Theor. eff.	Идентичность по отношению к другим генам мыши, % Identity according to other mouse genes, %
1	simIL-25-255	S	GUUGGACAGGGACUUGAAUtt	GTTGGACAGGGAGCTTGAAT	83	74
		aS	AUUCAGUCCCGUGUCCAActt			
2	simIL-25-234	S	CAUCUCUCCUUGGAGCUAUtt	CATCTCTCCTTGGAGCTAT	72	84
		aS	AUAGCUCCAAGGAGAGAUgtt			
3	simIL-25-17	S	CAUUCUUGGCAAUGAUCGUtt	CATTCTTGGCAATGATCGT	65	79
		aS	ACGAUCAUUGCCAAGAAUgtt			
4	simIL-25-175	S	CACACCCACACGCAGAAUtt	CACACCCACACGCAGAAT	61	84
		aS	AUUCUGCGUGGUGGUGUGtt			
5	simIL-25-368	S	UCCCACUUUACCAACCActt	TCCCACTTTACCACAACCA	59	84
		aS	UGGUUGUGGUAAGUGGGatt			
6	simTSLP-310	S	ACUGAGAGAAAUGACGGUAtt	ACTGAGAGAAATGACGGTA	92	84
		aS	UACCGUCAUUUCUCUCAGUtt			
7	simTSLP-78	S	CUUCACGUCAAUUACGAAatt	CTTCACGTCAATTACGAAA	91	79
		aS	UUUCGUAAUUGACGUGAAGtt			
8	simTSLP-405	S	CAUGCAAUCUCCAGAAUAatt	CATGCAATCTCCAGAAATAA	89	79
		aS	UUAUUCUGGAGAUUGCAUGtt			
9	simTSLP-188	S	GUCUCCUGAAAAUCGAGUAtt	GTCTCCTGAAAATCGAGTA	89	74
		aS	UACUCGAUUUUCAGGAGACtt			
10	simTSLP-374	S	CCUCACAAAUUCUAAGAUUtt	CCTCACAAATTCTAAGATT	88	84
		aS	AAUCUUAAGAAUUUGAGGtt			
11	simTSLP-131	S	GAGAUUUGAAAGGGGCUAatt	GAGATTTGAAAGGGGCTAA	88	84
		aS	UUAGCCCCUUUCAAUCUCtt			

Примечание. Теор. эфф. – теоретически предсказанная активность (от 0 до 100%). S – смысловая цепь. aS – антисмысловая цепь.
Note. Theor. eff., theoretically predicted activity (from 0 to 100%). S, sense strand. aS, antisense strand).

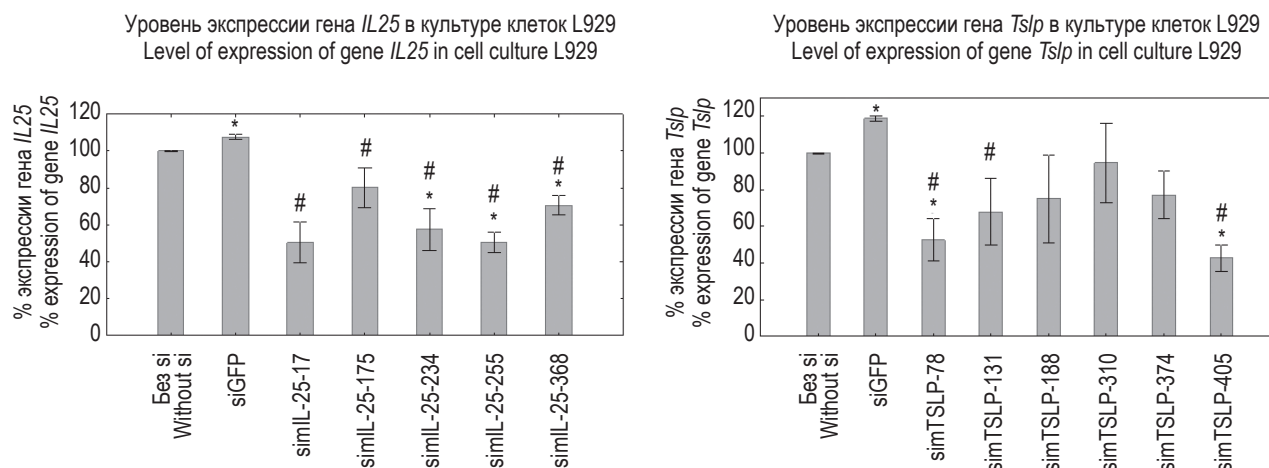


Рисунок 1. Биологическая активность миРНК против генов *IL25* и *Tslp* в культуре клеток L929

Примечание. Представлены средние значения $\pm$ стандартная ошибка. * – статистически значимое отличие от группы «без si». # – статистически значимое отличие от группы «siGFP». Статистический анализ проведен с использованием непараметрического критерия Краскела–Уоллиса. Отличия считались значимыми при $p \leq 0,05$, $n = 5$.

Figure 1. Activity of siRNAs against *IL25* and *Tslp* genes in L929 cell culture

Note. Means $\pm$ standard errors are presented. *, statistically significant difference vs «without si». #, statistically significant difference vs «siGFP». Statistical analysis was performed using the nonparametric Kruskal–Wallis test. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$, $n = 5$.

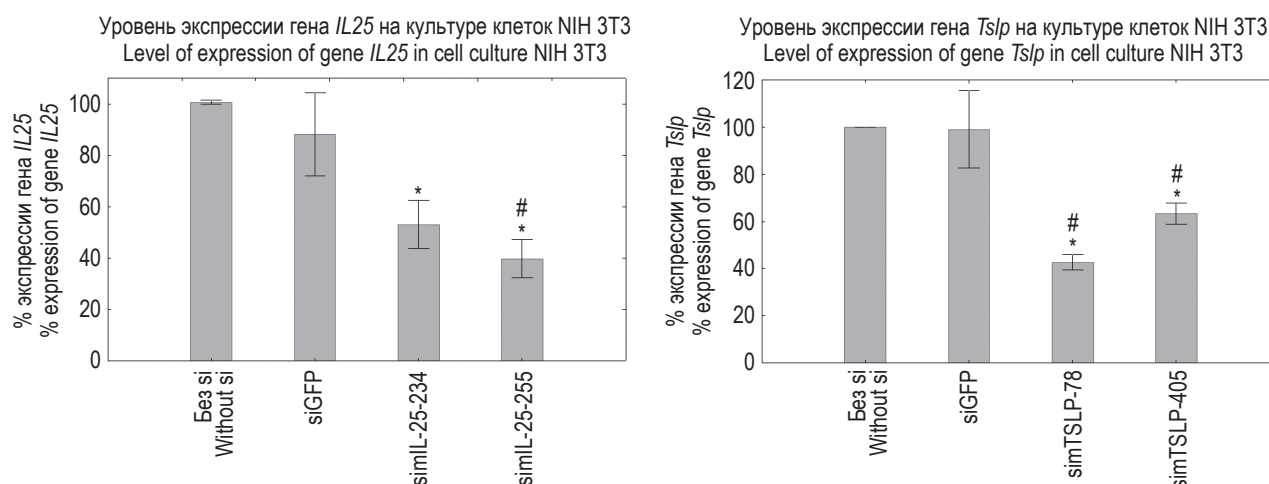


Рисунок 2. Биологическая активность миРНК против генов *IL25* и *Tslp* в культуре клеток NIH3T3

Примечание. Представлены средние значения $\pm$ стандартная ошибка. * – статистически значимое отличие от группы «без si». # – статистически значимое отличие от группы «siGFP». Статистический анализ проведен с использованием непараметрического критерия Краскела–Уоллиса. Отличия считались значимыми при $p \leq 0,05$, $n = 6$.

Figure 2. Activity of siRNAs against *IL25* and *Tslp* genes in NIH3T3 cell culture

Note. Means $\pm$ standard errors are presented. *, statistically significant difference vs «without si». #, statistically significant difference vs «siGFP». Statistical analysis was performed using the nonparametric Kruskal–Wallis test. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$, $n = 6$.

Учитывалось также положение участка отжига миРНК на мРНК гена-мишени; он не должен находиться ближе 50-150 пн относительно старто-кодона гена, т. к. в данном участке мРНК инициируется трансляция белка, которая сопряжена с привлечением различных белковых факторов, что снижает пространственную доступность дан-

ного участка для молекул миРНК и, как следствие, понижает их активность.

Также при проектировании миРНК следует учитывать так называемые off-target-эффекты, когда молекула миРНК может нацеливаться сразу на несколько генов, имеющих сходные последовательности. Учитывая это, для синтеза миРНК мы отбирали варианты, которые отличаются от

последовательностей других генов мыши на 16% и более (т. е. идентичность последовательности *miRNA* к другим генам составляет не более 84%) (табл. 1).

Биологическая активность молекул *miRNA* в экспериментах *in vitro*

После отбора подходящих вариантов *miRNA* против генов *IL25* и *Tslp* было проведено их тестирование в экспериментах *in vitro* на культуре клеток L929. Активность *miRNA* оценивали по их способности подавлять экспрессию целевого гена, которая оценивалась методом ПЦР-РВ.

Наиболее активными оказались варианты *simIL-25-234* и *simIL-25-255*, которые подавляли экспрессию гена *IL25* на 43% и 49% соответственно, по сравнению с неспецифическими *miRNA* (*siGFP*). Варианты *miRNA* *simTSLP-78* и *simTSLP-405* подавляли экспрессию гена *Tslp* на 54% и 56% по сравнению с неспецифическими *miRNA* (*siGFP*) (рис. 1). Неспецифические *miRNA* (*siGFP*) в проведенных экспериментах практически не влияли на экспрессию целевых генов; экспрессия *IL25* и *Tslp* в клетках L929 трансфицированных *siGFP* была сопоставима с таковой в клетках необработанных *miRNA* (рис. 1). Эти данные подтверждают, что подавление экспрессии *IL25* и *Tslp* вариантами *simIL-25-234*, *simIL-25-255*, *simTSLP-78* и *simTSLP-405* было сиквенс-специфичным.

Было проведено дополнительное исследование биологической активности спроектированным *miRNA* на культуре клеток NIH3T3. В этих дополнительных экспериментах с целью выявить наиболее активную *miRNA* мы оценили активность двух вариантов против гена *IL25* (*simIL-25-234* и *simIL-25-255*) и двух вариантов против гена *Tslp* (*simTSLP-78* и *simTSLP-405*).

В результате экспериментов было продемонстрировано, что наибольшую активность проявлял вариант *simIL-25-255*; он подавлял экспрессию гена *IL25* на 60% в сравнении с *siGFP*. Вариант *simTSLP-78* в наибольшей степени (на 57%) подавлял экспрессию гена *Tslp* (рис. 2).

Заключение

Таким образом, были спроектированы молекулы *miRNA* против генов *IL25* и *Tslp* мыши и изучена их биологическая активность в экспериментах *in vitro*. Наиболее активные варианты *miRNA* подавляли экспрессию гена *IL25* на 60% (вариант *simIL-25-255*), а гена *Tslp* (вариант *simTSLP-78*) на 57%. Указанные варианты *miRNA* (*simIL-25-255* и *simTSLP-78*) могут быть в дальнейшем использованы в экспериментах *in vivo* в моделях аллергического воспаления у мышей с целью выявить их противовоспалительный потенциал и оценить перспективность разработки противовоспалительных средств на основе *miRNA*.

Список литературы / References

1. Козулина И.Е., Курбачева О.М., Ильина Н.И. Аллергия сегодня. Анализ новых эпидемиологических данных. Российский аллергологический журнал // Российский аллергологический журнал, 2014. Т. 3. С. 3-10. [Kozulina I.E., Kurbacheva O.M., Ilina N.I. Allergy today. Analysis of new epidemiological data. *Rossiyskiy allergologicheskii zhurnal = Russian Journal of Allergy*, 2014, Vol. 3, pp. 3-10. (In Russ.)]
2. Bernstein D.I., Schwartz G., Bernstein J.A. Allergic rhinitis: mechanisms and treatment. *Immunol. Allergy Clin. North Am.*, 2016, Vol. 36, pp. 261-278.
3. Bousquet J., Anto J.M., Bachert C., Baiardini I., Bosnic-Anticevich S., Walter Canonica G., Melén E., Palomares O., Scadding G.K., Togias A., Toppila-Salmi S. Allergic rhinitis. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2020, Vol. 6, no. 1, 95. doi: 10.1038/s41572-020-00227-0.
4. Deng C., Peng N., Tang Y., Yu N., Wang C., Cai X., Zhang L., Hu D., Ciccio F., Lu L. Roles of IL-25 in Type 2 Inflammation and Autoimmune Pathogenesis. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 691559. doi: 10.3389/fimmu.2021.691559.
5. Elbashir S. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*, 2002, Vol. 26, pp. 199-213.
6. Hong H., Liao S., Chen F., Yang Q., Wang D.Y. Role of IL-25, IL-33, and TSLP in triggering united airway diseases toward type 2 inflammation. *Allergy*, 2020, Vol. 75, pp. 2794-2804.
7. Muñoz-Bellido F.J., Moreno E., Dávila I. Dupilumab: A review of present indication. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, 2022, Vol. 32, pp. 97-115.
8. Nikonova A., Shilovskiy I., Galitskaya M., Sokolova A., Sundukova M., Dmitrieva-Posocco O., Mitin A., Komogorova V., Litvina M., Sharova N., Zhernov Y., Kudlay D., Dvornikov A., Kurbacheva O., Khaitov R., Khaitov M. Respiratory syncytial virus upregulates IL-33 expression in mouse model of virus-induced inflammation exacerbation in OVA-sensitized mice and in asthmatic subjects. *Cytokine*, 2021, Vol. 138, 155349. doi: 10.1016/j.cyt.2020.155349.
9. Traber G.M., Yu A.M. Special section on non-coding RNAs in clinical practice: from biomarkers to therapeutic tools-minireview RNAi-based therapeutics and novel RNA bioengineering technologies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2023, Vol. 384, pp. 133-154.

10. Wang C., Liu Q., Chen F., Xu W., Zhang C., Xiao W. IL-25 Promotes Th2 Immunity responses in asthmatic mice via nuocytes activation. *PLoS One*, 2016, Vol. 11, no. 9, e0162393. doi: 10.1371/journal.pone.0162393.
11. Weber C., Müller C., Podszuweit A., Montino C., Vollmer J., Forsbach A. Toll-like receptor (TLR) 3 immune modulation by unformulated small interfering RNA or DNA and the role of CD14 (in TLR-mediated effects). *Immunology*, 2012, Vol. 136, pp. 64-77.

Авторы:

Каганова М.М. — младший научный сотрудник лаборатории противовирусного иммунитета ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Шиловский И.П. — д.б.н., заместитель директора по науке и инновациям ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Тимотиевич Е.Д. — младший научный сотрудник лаборатории противовирусного иммунитета ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Юмашев К.В. — младший научный сотрудник лаборатории противовирусного иммунитета ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Гурский Д.А. — студент ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина»; лаборант лаборатории противовирусного иммунитета ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Виноградова К.В. — студентка ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина»; лаборант лаборатории противовирусного иммунитета ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Попова М.В. — студентка МБФ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ; лаборант лаборатории противовирусного иммунитета ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Хаитов М.Р. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, директор ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России; заведующий кафедрой иммунологии МБФ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Kaganova M.M., Junior Research Associate, Antiviral Immunity Laboratory, National Research Center — Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Shilovskiy I.P., PhD, MD (Biology), Deputy Director on Science and Innovation, National Research Center — Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Timotievich E.D., Junior Research Associate, Antiviral Immunity Laboratory, National Research Center — Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Yumashev K.V., Junior Research Associate, Antiviral Immunity Laboratory, National Research Center — Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Gurskii D.A., Student, K. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology; Laboratory Assistant, Antiviral Immunity Laboratory, National Research Center — Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Vinogradova K.V., Student, K. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology; Laboratory Assistant, Antiviral Immunity Laboratory, National Research Center — Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Popova M.V., Student of MBF, N. Pirogov Russian National Research Medical University; Laboratory Assistant, Antiviral Immunity Laboratory, National Research Center — Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Khaitov M.R., PhD, MD (Medicine) Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director, National Research Center — Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency; Head, Immunology Department, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 31.03.2024
Отправлена на доработку 01.04.2024
Принята к печати 02.04.2024

Received 31.03.2024
Revision received 01.04.2024
Accepted 02.04.2024