

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-575>



Селективное подавление репликации вируса гриппа A/H5N1 *in vitro* с помощью наноконплексов, состоящих из siRNA и наночастиц аминопропилсиланола

Репкова М.Н.¹, Левина А.С.¹, Мазурков О.Ю.², Макаревич Е.В.², Филиппова Е.И.², Мазуркова Н.А.², Зарытова В.Ф.^{1✉}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия;

²Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Россия

Аннотация

Актуальность. Вирусы гриппа, относящиеся к семейству *Orthomyxoviridae*, широко распространены в природе и часто являются причиной возникновения пандемий. Появление новых штаммов вируса, устойчивых к лекарственным препаратам, вызывает потребность в разработке новых эффективных лекарственных форм, селективно действующих на вирусы гриппа А.

Цель работы — создание наноконплексов, состоящих из наночастиц аминопропилсиланола (АПС) и малых интерферирующих РНК (siRNA), и исследование их воздействия на нуклеиновые кислоты-мишени на примере ингибирования репликации вируса гриппа А в клеточной системе.

Материалы и методы. В работе использовали клетки MDCK, вирус гриппа A/chicken/Kurgan/05/2005 (A/H5N1), наночастицы АПС, нативные и модифицированные молекулы siRNA.

Результаты и обсуждение. Созданы уникальные наноконплексы Si-NH₂/siRNA, состоящие из наночастиц АПС и иммобилизованных на них молекул siRNA, обеспечивающих соответственно проникновение в клетки и селективное взаимодействие с нуклеиновыми кислотами-мишенями. Противовирусную активность предложенных наноконплексов исследовали на клетках MDCK, заражённых вирусом гриппа A/H5N1. Показано, что двухцепочечные молекулы siRNA в составе наноконплексов, действующие по механизму РНК-интерференции, более эффективно подавляют репликацию вируса гриппа по сравнению с соответствующими одноцепочечными фрагментами РНК. Наиболее эффективный наноконплекс, содержащий siRNA, нацеленную на выбранный участок 5-го сегмента мРНК вирусного генома, снижал репликацию вируса гриппа А в культуре клеток в 630 раз. Показано, что неагломерированные, растворимые в водных растворах наночастицы АПС являются малотоксичными, способными доставлять siRNA в клетки и защищать siRNA в составе наноконплексов Si-NH₂/siRNA от гидролиза клеточными нуклеазами.

Заключение. Продемонстрирована высокая биологическая активность созданных наноконплексов на примере селективного и высокоэффективного подавления репликации вируса гриппа A/chicken/Kurgan/05/2005 в клеточной системе.

Ключевые слова: наночастицы аминопропилсиланола, наноконплексы, siRNA, противовирусная активность, вирус гриппа A/H5N1

Благодарность. Авторы благодарят М. Мещанинову (лаборатория химии РНК Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН) за синтез олигорибонуклеотидов и их модифицированных аналогов.

Источник финансирования. Исследование поддержано Российским научным фондом (грант № 23-25-00230).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Репкова М.Н., Левина А.С., Мазурков О.Ю., Макаревич Е.В., Филиппова Е.И., Мазуркова Н.А., Зарытова В.Ф. Селективное подавление репликации вируса гриппа A/H5N1 *in vitro* с помощью наноконплексов, состоящих из siRNA и наночастиц аминопропилсиланола. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(6):794–802.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-575>
EDN: <https://www.elibrary.ru/rnwece>

Selective suppression of influenza A/H5N1 virus replication *in vitro* using nanocomplexes consisting of siRNA and aminopropylsilanol nanoparticles

Marina N. Repkova¹, Asya S. Levina¹, Oleg Yu. Mazurkov², Elena V. Makarevich², Ekaterina I. Filippova², [Natalya A. Mazurkova](#)², Valentina F. Zarytova^{1✉}

¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia;

²State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia

Abstract

Relevance. Studies on model systems have confirmed the effectiveness of antisense oligonucleotides, including those that contain photoactive groups, for the modification of nucleic acids. However, this strategy has not yet found wide application due to the lack of successful methods for the intracellular delivery. The development of effective preparations capable of acting on target nucleic acids in cells is an urgent task.

The aim of the study is to create nanocomplexes consisting of aminopropylsilanol nanoparticles and short interfering RNA (siRNA) to study their effect on target nucleic acids by the example of inhibition of influenza A virus replication *in vitro*.

Materials and methods. MDCK cells, influenza virus A/chicken/Kurgan/05/2005 (A/H5N1), aminopropylsilanol nanoparticles, and native and modified siRNA molecules.

Results and discussion. We have prepared unique Si-NH₂/siRNA nanocomplexes, which consist of aminopropylsilanol nanoparticles and siRNA molecules, which enable cell penetration and selective interaction with target nucleic acids, respectively. The antiviral activity of the proposed nanocomplexes has been studied on MDCK cells infected with the influenza A/H5N1 virus. It has been shown that the double-stranded siRNA molecules in the nanocomplexes, which act by the RNA interference mechanism, are more efficient in inhibiting the replication of the influenza virus than the corresponding single-stranded RNA fragments. The most effective nanocomplex that contained siRNA targeted at the chosen region of mRNA segment 5 of the viral genome reduced virus replication in the culture by a factor of 630. We have shown that non-agglomerated and water-soluble aminopropylsilanol nanoparticles are low-toxic, capable of delivering siRNA into cells and protecting siRNA in the Si-NH₂/siRNA nanocomplexes from hydrolysis by cellular nucleases.

Conclusion. The biological activity of the created nanocomplexes has been demonstrated by the example of highly effective selective suppression of influenza A/chicken/Kurgan/05/2005 virus replication in the cellular system.

Keywords: *aminopropylsilanol nanoparticles, nanocomplexes, siRNA, antiviral activity, influenza A virus, influenza A/H5N1 virus*

Acknowledgement. The authors thank M. Meshchaninova (Laboratory of RNA Chemistry, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences) for the synthesis of oligoribonucleotides and their modified analogs.

Funding source. The research was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 23-25-00230).

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Repkova M.N., Levina A.S., Mazurkov O.Yu., Makarevich E.V., Filippova E.I., Mazurkova N.A., Zarytova V.F. Selective suppression of influenza A/H5N1 virus replication *in vitro* using nanocomplexes consisting of siRNA and aminopropylsilanol nanoparticles. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(6):794–802.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-575>

EDN: <https://www.elibrary.ru/mwece>

Введение

Терапия с использованием нуклеиновых кислот (НК) предлагает уникальные возможности воздействия на генетический материал клетки. Однако её эффективность ограничена нестабильностью НК по отношению к клеточным нуклеазам и их низкой способностью проникать через цитоплазматическую мембрану, что делает необходимым использование различных систем доставки [1].

Малые интерферирующие рибонуклеиновые кислоты (small interfering RNA, siRNA) — многообещающий тип терапевтических средств на основе РНК, поскольку механизм их действия является каталитическим и каждая молекула siRNA может инактивировать несколько молекул РНК-мишеней. Молекулы siRNA интенсивно исследуются в качестве противовирусных агентов. L. Singh и соавт. представили широкий спектр применения нанораз-

мерных материалов для лечения распространённых вирусных инфекций [2]. Для клинического успеха предлагаемых методов доставки фрагментов НК в клетки безопасность и эффективность остаются жизненно важными требованиями. Предложены различные подходы к решению проблемы доставки siRNA, например, с помощью вирусов, катионных липидов, полимеров, транспортных пептидов. Следует упомянуть успешное использование биоконъюгатов siRNA и N-ацетилгалактозаминов [3]. Однако все методы имеют ограничения для терапевтического использования. Огромное количество потенциальных препаратов на основе siRNA не прошли клинических испытаний, поскольку многие факторы (низкая эффективность доставки siRNA в клетки-мишени, токсичность, деградация siRNA нуклеазами, фильтрация почками, поглощение иммунными клетками, нецелевые эффекты, низкая эффективность проникновения через гидрофобную клеточную мембрану и высвобождение siRNA из эндосом) ограничивают использование siRNA в биомедицине.

Одним из наиболее перспективных подходов к решению проблемы доставки siRNA в клетки является использование невирусных векторов на основе наночастиц (НЧ) [2, 4, 5]. Для доставки siRNA применялись различные типы НЧ. НЧ, состоящие из катионных полимеров (поли-L-лизин, полиамидоамин, полиэтиленимин, хитозан) или липидов, являются наиболее изученными средствами доставки [6, 7]. Учитывая широкое разнообразие доступных материалов, каждый из которых имеет множество потенциальных модификаций, состав НЧ можно оптимизировать для доставки конкретного типа РНК [8–10]. Системы доставки должны удовлетворять ряду важных требований: они должны повышать способность проникновения РНК в клетки, обеспечивать эффективную защиту РНК от деградации клеточными нуклеазами, а также обладать низкой токсичностью.

Несмотря на определённые успехи в разработке методов доставки фрагментов НК в клетки, проблему доставки нельзя считать окончательно решённой. Поэтому целесообразным является поиск других способов доставки siRNA в клетки.

Ранее мы разработали системы доставки олигодезоксирибонуклеотидов и дезоксирибозимов, основанные на использовании НЧ диоксида титана и аминопропилсиланола (АПС), с целью их воздействия на НК-мишени. Показано, что фрагменты ДНК в составе созданных нанокомпозитов сайт-специфично и эффективно воздействуют на гены-мишени *in vitro* и *in vivo* [11–14].

Цель работы — определить возможность использования неагломерированных, растворимых в водных растворах НЧ АПС для доставки siRNA в клетки в виде нанокомплексов Si~NH₂/siRNA, для

эффективного и селективного подавления репликации вируса гриппа А/Н5N1.

Материалы и методы

В работе использовали реактивы от коммерческих поставщиков: (3-аминопропил)триэтоксисилан, трипсин, пенициллин, стрептомицин («Sigma-Aldrich»); среду DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; «Биолот»); эмбриональную телячью сыворотку («Gibco»), МТТ ((3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолийбромид), «NeoFroxx»), диметилсульфоксид («Компонент-Реактив»). Трипсин использовали в концентрации 2 мкг/мл, пенициллин и стрептомицин — в концентрации 100 ЕД/мл. Куриные эритроциты, клетки MDCK и штамм вируса гриппа А/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) были получены из коллекций ГНЦ ВБ «Вектор».

Олигорибонуклеотиды и их производные синтезировали твёрдофазным методом на автоматическом ДНК/РНК-синтезаторе «ASM-800 synthesizer» («Биоссет»), используя оптимизированный протокол для масштаба синтеза 0,4 ммоль. В качестве мономеров использовали 2'-дезокси-, 2'-O-TBDMS- и 2'-O-метил-фосфорамидиты («Glen Research»). Сульфурезулирующий реагент II («Glen Research») применяли для введения тиофосфатной группы. Концентрацию олигонуклеотидов определяли спектрофотометрическим методом путём измерения их оптической плотности в растворе с использованием спектрофотометра «Shimadzu U-1800» («Shimadzu»).

Получение наночастиц аминопропилсиланола Si~NH₂ и нанокомплексов Si~NH₂/siRNA

НЧ АПС (Si~NH₂) синтезировали путём гидролиза (3-аминопропил)триэтоксисилана, который добавляли по каплям в горячую воду, и смесь перемешивали при этой температуре в течение 15 ч с последующим охлаждением до комнатной температуры [15]. Значение pH полученного раствора (10,6) было доведено до 7,5 с помощью 1 М HCl. Концентрацию конечного раствора Si~NH₂ (0,26 М) определяли титрованием аминогрупп с помощью 1 М HCl. Выход реакции составил 95–97%. НЧ Si~NH₂ ранее изучены физико-химическими методами: динамическое светорассеяние, ультрафиолетовая, инфракрасная спектроскопия, просвечивающая и атомно-силовая микроскопия [15].

Молекулы РНК иммобилизовали на НЧ АПС [16] благодаря электростатическому взаимодействию между отрицательно заряженными межнуклеотидными фосфатными группами в олигорибонуклеотидах (р) и положительно заряженными аминогруппами (NH₂) в НЧ. Нанокомплексы с одно- и двухцепочечной РНК (соответственно Si~NH₂/RNA и Si~NH₂/siRNA) получали при смешивании RNA или siRNA с 0,26 М Si~NH₂ в воде при условии, что

соотношение NH_2/ρ составляло 50 (мы учитывали количество фосфатных групп только в одной цепи). Размер и дзета-потенциал полученных НЧ АПС и наноконплексов с молекулами РНК измеряли методом динамического светорассеяния на приборе «Zetasizer Nano ZS Plus» («Malvern»).

Анализ токсичности наночастиц и наноконплексов в культуре клеток MDCK

Образцы в среде DMEM (0,1 мл в концентрациях 5–50 мкМ для siRNA или 5–50 мМ для $\text{Si}\sim\text{NH}_2$) вносили в лунки 96-луночных планшетов с клетками MDCK. В качестве контроля использовали клетки в 0,1 мл поддерживающей среды DMEM. После инкубации клеток в течение 2 дней при 37°C и 5% CO_2 культуральную среду удаляли и в каждую лунку вносили МТТ-краситель (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолийбромид) в буфере FSB-D (фосфатная соль Дульбекко; 0,075 мл, 1 мг/мл). Клетки инкубировали в течение 90 мин при 37°C, после чего удаляли раствор красителя и добавляли диметилсульфоксид (0,1 мл). После инкубации в течение 10 мин измеряли оптическую плотность в каждой лунке на спектрофотометре «Emax» («Molecular Devices») при длине волны 540 нм, что является показателем количества жизнеспособных клеток в монослое.

Зависимость оптической плотности от концентрации исследуемого образца была представлена в полулогарифмических координатах, а 50% цитотоксическая концентрация (CC_{50}) каждого образца была рассчитана с помощью компьютерной программы «SoftMaxPro-4.0».

Противовирусная активность наноконплексов

Вирус A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) выращивали в аллантоисной полости 10-дневных куриных эмбрионов при 37°C. Аллантоисную жидкость собирали в течение 48 ч после инокуляции вируса и хранили при –80°C. Клетки MDCK высевали из расчёта 10^5 клеток/мл в питательной среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Gibco»), в 96-луночные планшеты (100 мкл/лунку) и инкубировали при 37°C, 5% CO_2 и 100% влажности. После достижения ~80% монослоя среду удаляли и в лунки добавляли образцы $\text{Si}\sim\text{NH}_2$, $\text{Si}\sim\text{NH}_2/\text{RNA}$ и $\text{Si}\sim\text{NH}_2/\text{siRNA}$ в концентрации 0,5 мМ (в отношении $\text{Si}\sim\text{NH}_2$, что соответствует 0,5 мкМ в отношении РНК или siRNA) в 100 мкл среды DMEM. Контрольным образцом была та же среда без наноконплексов. В качестве препарата сравнения использовали озельтамивир в концентрации 10 мкг/мл.

Для экспериментов по исследованию дозозависимости противовирусной активности наноконплексов $\text{Si}\sim\text{NH}_2/\text{siRNA}$ их концентрация изменялась в диапазоне 0,01–1,00 мкМ (в отношении siRNA).

Клетки инкубировали в присутствии образцов при 37°C, 5% CO_2 и 100% влажности в течение 4 ч с последующей промывкой клеток той же средой. Затем клетки инфицировали вирусом A/H5N1 в содержащей трипсин (2 мкг/мл) среде DMEM (по 100 мкл в каждую лунку) при множественности заражения 0,01 50% тканевой цитопатической дозы (TCID_{50}) на 1 мл. После адсорбции вируса в течение 1 ч при комнатной температуре среду, содержащую вирус, удаляли, клетки промывали средой DMEM без трипсина и добавляли ту же среду, содержащую трипсин, в каждую лунку по 100 мкл. После инкубации в течение 48 ч последовательные 10-кратные разведения (от 10^{-1} до 10^{-8}) культуральной жидкости, содержащей вирус, из каждой лунки наносили на клетки MDCK с повторной инкубацией в течение 48 ч для последующей оценки титра вируса. Наличие цитопатического действия регистрировали под микроскопом и в реакции гемагглютинации с 1% суспензией куриных эритроцитов. Титр вируса выражали в единицах $\lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$. Для оценки зависимости ингибирования вируса от концентрации наноконплексов рассчитывали процент подавления продукции вируса по формуле: $(A - B)/A$, где A — титр вируса в контроле (без образца) в $\text{TCID}_{50}/\text{мл}$; B — титр вируса в эксперименте (с образцом) в $\text{TCID}_{50}/\text{мл}$.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием программы «Statistica v. 12» («StatSoft Inc.»). Титр вируса в контроле и эксперименте (соответственно без или с экспериментальными образцами) рассчитывали с использованием метода Спирмена–Кербера и выражали в $\lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$. Различия между результатами с экспериментальными и контрольными образцами считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

НЧ диоксида кремния рассматриваются как перспективные носители для доставки НК в клетки [17]. Чаще всего для иммобилизации НК и их фрагментов используются аминокислотные модифицированные Si-НЧ. Мы синтезировали неагломерированные НЧ АПС (гидродинамический диаметр — ~1 нм, дзета-потенциал — ~10 мВ) [15].

Малый размер частиц $\text{Si}\sim\text{NH}_2$ обеспечивает получение водорастворимых препаратов. Характеристика НЧ АПС с помощью физико-химических методов описана в нашей предыдущей работе [15]. Показано, что полученные НЧ не склонны к агрегации и могут храниться в течение нескольких месяцев.

Наноконплексы $\text{Si}\sim\text{NH}_2/\text{RNA}$ и $\text{Si}\sim\text{NH}_2/\text{siRNA}$ получены путём электростатического взаимодействия между отрицательно заряженными между-клеточными фосфатными группами в РНК и siRNA и положительно заряженными протонированными

Титр вируса, Ig ТЦД₅₀/мл
Virus titer, Ig TCID₅₀/mL

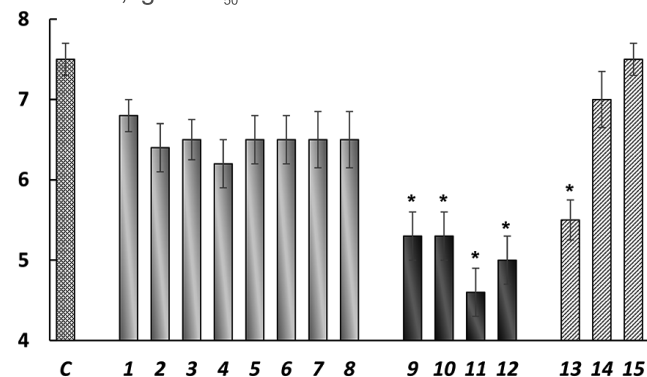


Рис. 1. Титры вируса гриппа A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) после инкубирования клеток MDCK с наноконплексами Si~NH₂/RNA и Si~NH₂/siRNA.

C — контроль вируса без образцов. 1–8 — наноконплексы Si~NH₂/RNA, содержащие RNA₁–RNA₈ (концентрация РНК в наноконплексах 0,5 мкМ); 9–12 — наноконплексы Si~NH₂/siRNA, содержащие siRNA_{1/4}, siRNA_{3/4}, siRNA_{5/4} и siRNA_{7/4} (концентрация siRNA в наноконплексах 0,5 мкМ в расчёте на одну цепь); 13 — озельтамивир (10 мкг/мл или 32 мкМ); 14 — Si~NH₂ (концентрация частиц 0,5 мМ); 15 — Si~NH₂/siRNA_{9/10} (наноконплекс, содержащий неспецифическую (для вируса гриппа А) siRNA_{9/10}). Множественность заражения — 0,01 ТЦД₅₀/кл. Представленные средние значения, стандартные отклонения и отличия величин титров вируса рассчитаны по методу Спирмена–Кербера. **p* ≤ 0,05 по сравнению с контролем.

Fig. 1. Titers of A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) virus in MDCK cells after their incubation of with Si~NH₂/RNA and Si~NH₂/siRNA nanocomplexes.

C, virus control without samples. Si~NH₂/RNA nanocomplexes containing RNA₁–RNA₈ (1–8), concentration of RNA in nanocomplexes is 0.5 μM; Si~NH₂/siRNA nanocomplexes containing siRNA_{1/4}, siRNA_{3/4}, siRNA_{5/4}, and siRNA_{7/4} (9–12), concentration of siRNA in nanocomplexes is 0.5 μM per one strand; ozeltamivir (13), 10 μg/mL or 32 μM; Si~NH₂ (14), 0.5 mM; Si~NH₂/siRNA_{9/10}, nanocomplex containing unspecific siRNA_{9/10} (15). MOI, 0.01 TCID₅₀/cell. The presented average values, standard deviations and differences in the titer values of the virus are calculated using the Spearman–Kerber method. Asterisks designate the difference between the control and the titer values of the virus obtained under the action of the studied series of nanocomplexes, at *p* < 0.05.

РНКазы-Н1 и AGO2) [24–26], что в итоге приводит к утрате функций целевых РНК. Одноцепочечные РНК-фрагменты могут формировать комплементарные комплексы с РНК-мишенью, но не вызывают деградации целевой РНК. Молекула siRNA сначала связывается с комплексом (RISC), затем удаляется смысловая (пассажирская) цепь. Нуклеаза AGO2 и оставшаяся антисмысловая цепь в составе комплекса RISC находят целевую РНК-мишень, и AGO2 расщепляет её. AGO2 сохраняет антисмысловую цепь в течение некоторого времени в составе комплекса RISC для дальнейших реакций [27–29].

Известно, что siRNA быстро гидролизуются клеточными нуклеазами, для защиты от которых используют различные модификации. Следует отметить, что даже минимально модифицированные siRNA_{1/4} и siRNA_{3/4}, доставленные в клетки в составе наноконплексов с НЧ, весьма эффективно

подавляли репликацию вируса (на 2,3 порядка, ~ в 200 раз). Это означает, что в составе наноконплекса Si~NH₂/siRNA НЧ АПС защищают siRNA от клеточных нуклеаз. Самый активный наноконплекс Si~NH₂/siRNA_{5/4} подавлял репликацию вируса почти на 3 порядка.

Противовирусная активность исследованных наноконплексов Si~NH₂/siRNA была сравнима с активностью озельтамивира (наиболее часто используемого препарата сравнения при исследовании воздействия на вирус гриппа А), но при гораздо меньшей концентрации активного компонента (0,5 мкМ для siRNA и 32 мкМ для озельтамивира). НЧ Si~NH₂, как и следовало ожидать, не приводили к подавлению репликации вируса.

Наиболее активный наноконплекс Si~NH₂/siRNA_{5/4} охарактеризован более подробно. Мы оценили влияние siRNA, НЧ Si~NH₂ в свободном состоянии и в составе наноконплекса Si~NH₂/siRNA_{5/4} на выживаемость незаражённых клеток MDCK (рис. 2). Не связанная с НЧ siRNA_{5/4}, как и следовало ожидать, оказалась нетоксичной в исследуемом диапазоне концентраций. Цитотоксичность наноконплекса Si~NH₂/siRNA_{5/4} совпадает с токсичностью НЧ Si~NH₂. Следовательно, можно сделать вывод о том, что цитотоксичность наноконплексов определяется токсичностью входящих в них НЧ. Цитотоксическая концентрация препарата, при которой разрушается 50% клеток в неинфицированном монослое, определённая из данных рис. 2, составила 38 мМ в расчёте на Si~NH₂ и 38 мкМ в расчёте на siRNA.

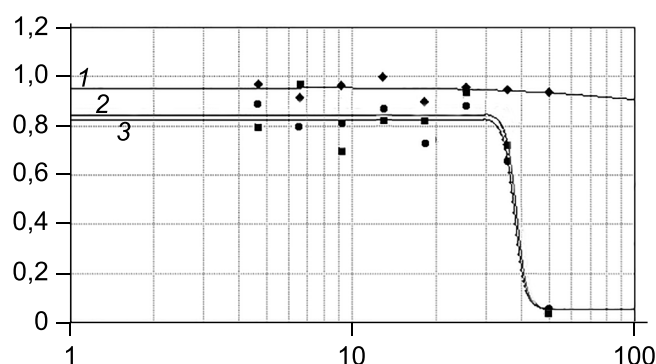


Рис. 2. Жизнеспособность клеток MDCK при обработке образцами siRNA и Si~NH₂ в свободном состоянии и в составе наноконплекса Si~NH₂/siRNA.

1 — siRNA_{5/4}; 2 — Si~NH₂; 3 — Si~NH₂/siRNA_{5/4}. На оси абсцисс приведена концентрация siRNA в свободном состоянии или в составе наноконплекса (мкМ) и наночастиц Si~NH₂ в свободном состоянии или в составе наноконплекса (мМ). На оси ординат приведена оптическая плотность раствора МТТ.

Fig. 2. Viability of MDCK cells when treated with siRNA and Si~NH₂ samples in the free state and as part of the Si~NH₂/siRNA nanocomplex.

1, siRNA_{5/4}; 2, Si~NH₂; 3, Si~NH₂/siRNA_{5/4}. The x-axis shows the concentration of siRNA in the free state or as part of a nanocomplex (μM) and Si~NH₂ nanoparticles in the free state or as part of a nanocomplex (mM). The y-axis shows optical density of the MTT solution.

Таблица 2. Зависимость противовирусной активности наноконплекса Si-NH₂/siRNA_{5/4} от концентрации siRNA при множественности заражения 0,01 ТЦД₅₀/кл**Table 2.** Dependence of antiviral activity of Si-NH₂/siRNA_{5/4} nanocomplex on siRNA concentration with MOI 0.01 TCID₅₀/cell

Концентрация siRNA _{5/4} в наноконплексе, мкМ Concentration of siRNA _{5/4} in nanocomplex, μM	Инфекционный титр вируса гриппа IgTCID ₅₀ /мл Infection titer of influenza A virus IgTCID ₅₀ /mL	Подавление продукции вируса гриппа, % Inhibition of influenza A virus replication, %
1,00	4,50	99,99
0,50	5,75	99,82
0,10	7,00	97
0,05	7,50	90
0,01	7,50	90
Контроль вируса Virus control	8,50	–

В таблице 2 приведены результаты подавления продукции вируса гриппа в зависимости от концентрации наноконплекса Si-NH₂/siRNA_{5/4} в среде культивирования клеток с вирусом гриппа.

Показано, что в диапазоне концентраций siRNA_{5/4} в наноконплексе Si-NH₂/siRNA_{5/4} от 0,01 до 1,00 мкМ подавление продукции вируса гриппа составляло 90,00–99,99%.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что НЧ АПС могут быть использованы для доставки siRNA в клетки в составе наноконплексов Si-NH₂/siRNA. Цитотоксичность наноконплекса Si-NH₂/siRNA_{5/4} определяется токсичностью НЧ Si-NH₂. Цитотоксическая концентрация препарата, при которой разрушается 50% клеток в неинфицированном монослое, для наноконплекса Si-NH₂/siRNA_{5/4} составила 38 мМ в расчёте на Si-NH₂ и 38 мкМ в расчёте на siRNA. Наноконплекс Si-NH₂/siRNA_{9/10}, содержащий неспецифическую для вируса гриппа A siRNA_{9/10}, был полностью неактивен. Это свидетельствует о селективности действия наноконплексов Si-NH₂/siRNA, несущих siRNA_{1/4}, siRNA_{3/4}, siRNA_{5/4} и siRNA_{7/4}, специфических к mRNA вируса гриппа. Таким образом, показано успешное использование предложенных наноконплексов, содержащих siRNA, нацеленных на выбранный участок 5-го сегмента мРНК вирусного генома, для подавления продукции вируса A/H5N1 в клеточной системе. Наиболее эффективный наноконплекс Si-NH₂/siRNA_{5/4} снижал репликацию вируса гриппа A в культуре клеток почти на 3 порядка.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Belgrad J., Fakhri H.H., Khvorova A. Nucleic acid therapeutics: successes, milestones, and upcoming innovation. *Nucl. Acid Ther.* 2024;34(2):52–72. DOI: <https://doi.org/10.1089/nat.2023.0068>
- Singh L., Kruger H.G., Maguire G.E.M., et al. The role of nanotechnology in the treatment of viral infections. *Ther. Adv. Infect. Dis.* 2017;4(4):105–31. DOI: <https://doi.org/10.1177/2049936117713593>
- Springer A.D., Dowdy S.F. GalNAc-siRNA conjugates: leading the way for delivery of RNAi therapeutics. *Nucl. Acid Ther.* 2018;28(3):109–19. DOI: <https://doi.org/10.1089/nat.2018.0736>
- Adesina S.K., Akala E.O. Nanotechnology approaches for the delivery of exogenous siRNA for HIV therapy. *Mol. Pharm.* 2015;12(12):4175–87. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00335>
- Anwar S., Mir F., Yokota T. Enhancing the effectiveness of oligonucleotide therapeutics using cell-penetrating peptide conjugation, chemical modification, and carrier-based delivery strategies. *Pharmaceutics* 2023;15(4):1130. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041130>
- Kaczmarek J.C., Kowalski P.S., Anderson D.G. Advances in the delivery of RNA therapeutics: from concept to clinical reality. *Genome Med.* 2017;9(1):60. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0450-0>
- Uchida S., Perche F., Pichon C., Cabral H. Nanomedicine-based approaches for mRNA delivery. *Mol. Pharm.* 2020;17(10):3654–84. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00618>
- Hajj K.A., Whitehead K.A. Tools for translation: non-viral materials for therapeutic mRNA delivery. *Nat. Rev. Mater* 2017;2(10):1–17. DOI: <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2017.56>
- Sato Y., Okabe N., Note Y., et al. Hydrophobic scaffolds of pH-sensitive cationic lipids contribute to miscibility with phospholipids and improve the efficiency of delivering short interfering RNA by small-sized lipid nanoparticles. *Acta Biomater.* 2020;102(15):341–50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.11.022>
- Cox A., Lim S.A., Chung E.J. Strategies to deliver RNA by nanoparticles for therapeutic potential. *Mol. Aspect. Med.* 2022;83:100991. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2021.100991>
- Levina A.S., Repkova M.N., Netesova N.A., et al. Substantial antiviral potential of deoxyribozymes fixed on anatase nanoparticles against influenza A viruses *in vitro* and *in vivo*. *J. Pharm. Sci.* 2024;113(5):1202–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2023.10.028>
- Repkova M.N., Levina A.S., Ismagilov Z.R., et al. Effective inhibition of newly emerged A/H7N9 virus with oligonucleotides targeted to conserved regions of the virus genome. *Nucleic Acid Ther.* 2021;31(6):436–42. DOI: <https://doi.org/10.1089/nat.2021.0061>
- Levina A., Repkova M., Shikina N., et al. Pronounced therapeutic potential of oligonucleotides fixed on inorganic nanoparticles against highly pathogenic H5N1 influenza A virus *in vivo*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2021;162:92–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.03.006>

14. Levina A., Repkova M., Kupryushkin M., et al. In vivo hypotensive effect of aminosilanol-based nanocomposites bearing antisense oligonucleotides. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2022;75:103612.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103612>
15. 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;9:2516–25.
DOI: <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.234>
16. Репкова М.Н., Мазурков О.Ю., Филиппова Е.И. и др. Олигорибонуклеотид-содержащие нанокомплексы на основе наночастиц аминопропилсиланола как эффективные ингибиторы репликации вируса гриппа А. *Вестник Московского университета. Серия 16: Биология.* 2023;78(4):267–72.
Repkova M.N., Mazurkov O.YU., Filippova E.I., et al. Oligoribonucleotide-containing nanocomplexes based on aminosilanol nanoparticles as effective inhibitors of influenza A virus replication. *Herald of Moscow University. Series 16: Biology.* 2023;78(4):267–72.
DOI: <https://doi.org/10.55959/MSU0137-0952-16-78-4-8>
EDN: <https://elibrary.ru/bqvsft>
17. Liu Y., Lou C., Yang H., et al. Silica nanoparticles as promising drug/ gene delivery carriers and fluorescent nano-probes: recent advances. *Curr. Cancer Drug Targets.* 2011;11(2):156–63.
DOI: <https://doi.org/10.2174/156800911794328411>
18. Portela A., Digard P. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J. Gen. Virol.* 2002;83(Pt. 4):723–34.
DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-4-723>
19. 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;100(5):2718–23.
DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0437841100>
20. Khantasup K., Kopermsub P., Chaichoun K., Dharakul T. Targeted small interfering RNA-immunoliposomes as a promising therapeutic agent against highly pathogenic Avian Influenza A (H5N1) virus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014;58(5):2816–24.
DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.02768-13>
21. Stoppani E., Bassi I., Dotti S., et al. Expression of a single siRNA against a conserved region of NP gene strongly inhibits *in vitro* replication of different influenza A virus strains of avian and swine origin. *Antiviral. Res.* 2015;120:16–22.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.04.017>
22. Volkov A.A., Kruglova N.S., Meschaninova M.I., et al. Selective protection of nuclease-sensitive sites in siRNA prolongs silencing effect. *Oligonucleotides.* 2009;19(2):191–202.
DOI: <https://doi.org/10.1089/oli.2008.0162>
23. Petrova Kruglova N.S., Meschaninova M.I., Venyaminova A.G., et al. 2'-O-methyl-modified anti-MDR1 fork-siRNA duplexes exhibiting high nuclease resistance and prolonged silencing activity. *Oligonucleotides.* 2010;20(6):297–308.
DOI: <https://doi.org/10.1089/oli.2010.0246>
24. Anwar S., Mir F., Yokota T. Enhancing the effectiveness of oligonucleotide therapeutics using cell-penetrating peptide conjugation, chemical modification, and carrier-based delivery strategies. *Pharmaceutics.* 2023;15(4):1130.
DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041130>
25. Crooke S.T., Baker B.F., Crooke R.M., Liang X.H. Antisense technology: an overview and prospectus. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2021;20(6):427–53.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00162-z>
26. Fàbrega C., Aviñó A., Navarro N., et al. Lipid and peptide-oligonucleotide conjugates for therapeutic purposes: from simple hybrids to complex multifunctional assemblies. *Pharmaceutics.* 2023;15(2):320.
DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020320>
27. Setten R.L., Rossi J.J., Han S.P. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2019;18(6):421–46.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0023-6>
28. Chernikov I.V., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L. Current development of siRNA bioconjugates: from research to the clinic. *Front. Pharmacol.* 2019;11:444.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00444>
29. Anguela X.M., High K.A. Entering the modern era of gene therapy. *Annu. Rev. Med.* 2019;70:273–88.
DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-med-012017-043332>

Информация об авторах

Репкова Марина Николаевна — к. х. н., н. с. лаб. нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7108-9036>

Левина Ася Сауловна — к. х. н., с. н. с. лаб. нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2423-3805>

Мазурков Олег Юрьевич — к. б. н., н. с. отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций ГНЦ ВБ «Вектор», р. п. Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8164-4091>

Макаревич Елена Викторовна — н. с. отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций ГНЦ ВБ «Вектор», р. п. Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5146-8979>

Филиппова Екатерина Игоревна — к. б. н., н. с. отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций ГНЦ ВБ «Вектор», р. п. Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9554-4462>

Мазуркова Наталья Алексеевна — д. б. н., в. н. с. отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций ГНЦ ВБ «Вектор», р. п. Кольцово, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1896-2684>

Зарытова Валентина Филипповна[✉] — д. х. н., г. н. с. лаб. нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия, zarytova@niboch.ncs.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9579-9972>

Участие авторов: Репкова М.Н. — синтез наночастиц и нанокомплексов; Левина А.С. — написание статьи; Мазурков О.Ю., Макаревич Е.В., Филиппова Е.И. — проведение экспериментов по оценке противовирусной активности и токсичности наноком-

Information about the authors

Marina N. Repkova — Cand. Sci. (Chem.), researcher, Laboratory of nucleic acids, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7108-9036>

Asya S. Levina — Cand. Sci. (Chem.), senior researcher, Laboratory of nucleic acids, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2423-3805>

Oleg Yu. Mazurkov — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Department of prevention and treatment of especially dangerous infections, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8164-4091>

Elena V. Makarevich — researcher, Department of prevention and treatment of especially dangerous infections, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5146-8979>

Ekaterina I. Filippova — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Department of prevention and treatment of especially dangerous infections, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9554-4462>

Natalya A. Mazurkova — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Department of prevention and treatment of especially dangerous infections, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1896-2684>

Valentina F. Zarytova[✉] — D. Sci. (Chem.), leading researcher, Laboratory of nucleic acids, Institute of Chemical Biology and Fundamen-

плексов; *Мазуркова Н.А.* — анализ данных; *Зарытова В.Ф.* — концепция исследования, научное редактирование статьи. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 15.08.2024;
принята к публикации 25.10.2024;
опубликована 30.12.2024

tal Medicine, Novosibirsk, Russia,
zarytova@niboch.ncs.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9579-9972>

Author contribution: *Repkova M.N.* — synthesis of nanoparticles and nanocomplexes; *Levina A.S.* — writing an article; *Mazurkov O. Yu.*, *Makarevich E.V.*, *Filippova E.I.* — experiments to assess the antiviral activity and toxicity of nanocomplexes; *Mazurkova N.A.* — data analysis; *Zarytova V.F.* — research concept, editing the article. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the article, acquisition, analysis, interpretation of data for the article, drafting and revising the article, final approval of the version to be published.

The article was submitted 15.08.2024;
accepted for publication 25.10.2024;
published 30.12.2024