

Sukhikh GT. Hyaluronic Acid in Vascular and Immune Homeostasis during Normal Pregnancy and Preeclampsia. *Acta Naturae* 2016; 8(3), 59-71.

13. Sukhikh GT, Ziganshina MM, Nizyaeva NV, Kulikova GV, Volkova JS, Yarotskaya EL, Kan NE, Shchyogolev AI, Tyutyunnik VL. Differences of glycocalyx composition in the structural elements of placenta in preeclampsia. *Placenta* 2016; 43, 69-76.

14. Tupitsyn NN, Udalova YA, Galanina OE, Kadagidze ZG, Borovkova NB, Obukhova P, Shilova NV,

Bovin NV. Tumor-associated glycan LewisC in breast cancer. *Hematopoiesis immunology* 2009; 2, 45-54.

15. Bello-Gil D, Manez R. Exploiting natural anti-carbohydrate antibodies for therapeutic purposes. *Biochemistry (Mosc)* 2015; 80(7), 836-845.

16. Whalen GF, Sullivan M, Piperdi B, Wasseff W, Galili U. Cancer immunotherapy by intratumoral injection of α -gal glycolipids. *Anticancer Res* 2012; 32(9), 3861-3868.

КОМПЛЕКС КАТИОННОГО ПЕПТИДА И МОЛЕКУЛ МИРНК ПРОТИВ ИЛ-4 ЭФФЕКТИВНО СНИЖАЮТ ГИПЕРРЕАКТИВНОСТЬ БРОНХОВ И АЛЛЕРГИЧЕСКОЕ ВОСПАЛЕНИЕ НА МЫШИНОЙ МОДЕЛИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

Шиловский И.П., Сундукова М.С., Гайсина А.Р., Зарецкая М.А., Камышников О.Ю. Хаитов М.Р.

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва

CELL PENETRATING PEPTIDE COMPLEXED WITH SIRNA TARGETED TO IL-4 DECREASE AIRWAY INFLAMMATION AND AIRWAY HYPER RESPONSIVENESS IN A MOUSE MODEL OF ALLERGIC ASTHMA

Shilovskiy I.P., Sundukova M.S, Gaisina A.R., Zaretskaya V.A., Kamyshnikov O.Y., Khaitov M.R.

National Research Center – Institute of Immunology Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow

Бронхиальная астма (БА) является одним из самых распространенных хронических воспалительных заболеваний дыхательных путей, от которого страдают как взрослые, так и дети. Данное заболевание распространено среди разных слоев населения, имеет высокий уровень смертности, а при отсутствии квалифицированной помощи приводит к ухудшению качества жизни населения и экономическим потерям для государства [1]. В виду продолжающегося роста заболеваемости БА остается актуальной задача поиска значимых биологических мишеней с целью разработки новых способов терапии.

Недавние успехи в области молекулярной иммунологии, генетики и биоинформатики позволили выявить гены, вовлеченные в патогенез БА. Исследования на нокаутных животных, а также с применением моноклональных антител, установили ключевую роль ИЛ-4 в патогенезе данного заболевания. В частности, ИЛ-4 способствует синтезу В-клетками специфических IgE-антител,

миграции эозинофилов в участок воспаления и гиперреактивности бронхов [2–5]. Данные исследования создали предпосылки для появления лекарственных препаратов нового типа, способных регулировать активность патогенетически-значимых генов.

К настоящему моменту известен ряд технологий для сиквенс-специфической регуляции генов (АСО, Рибозимы, ДНКзимы, EGS, ДНК-ловушки, U1-адапторы), однако использование феномена интерференции РНК является наиболее перспективным с точки зрения эффективности и экономической целесообразности [6]. Под интерференцией РНК понимают естественный механизм регуляции экспрессии генов в клетке с участием фермента Dicer и молекул малых интерферирующих РНК (миРНК). Однако одна из главных проблем на пути внедрения миРНК-содержащих препаратов в медицинскую практику является низкая эффективность их проникновения в клетки-мишени. Поэтому для доставки

молекул миРНК разрабатываются различные носители (полимеры, липосомы и наночастицы), однако наиболее перспективными с точки зрения безопасности являются катионные пептиды. Они способны электростатически взаимодействовать с миРНК, формируя нано-структурные комплексы, которые за счет эндоцитоза проникают в клетки, при этом ввиду био-совместимости, пептиды не проявляют токсических эффектов на организм человека.

В ходе предыдущих экспериментальных работ был создан комплекс, состоящий из катионного дендримерного пептида (LTP) и молекул миРНК, подавляющих ИЛ-4 (siIL4) [7–9]. Поэтому целью данного исследования было изучить эффекты созданного комплекса siIL-4/LTP на мышинной модели аллергической бронхиальной астмы.

Материалы и методы. В работе использована ранее созданная мышинная модель аллергической БА [10,11]. Для этого самки мышей BALB/c были разделены на 3 группы. Группы 1 и 2 иммунизировали внутрибрюшинным введением OVA (20 мкг/мышь), эмульгированного в Al(OH)₃ (2 мг/мышь) в 0, 14 и 28 дни эксперимента. Провокации путем интраназального (и/н) введения 1% OVA (50 мкл/мышь) проводились в 41–43 дни. Группа 1 получала аэрозольно 88 мкг/мышь siIL-4/LTP в дни 37–43. Группа 2 получала аналогичным курсом контрольный препарат миРНК против гена GFP в комплексе с тем же самым пептидом LTP (siGFP/LTP). Группа 3 никаким манипуляциям не подвергалась. Измерялись уровни сывороточных OVA-специфических IgE, IgG1, IgG2a антител методом ELISA в день 44. Гиперреактивность дыхательных путей (ГРБ) измерялась с помощью неинвазивной плетизмографии на 44 день. Бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) собирали на 45 день и анализировали с помощью световой микроскопии. Левое легкое отбирали для гистологического анализа, правое – для анализа генной экспрессии методом ПЦР.

Результаты. Мыши, получавшие 7 ингаляций siIL-4/LTP, демонстрировали снижение экспрессии гена ИЛ-4 в клетках БАЛ на 30% в сравнении с животными, получавшими ингаляционно контрольный неспецифический препарат siGFP/LTP. Однако несмотря на снижение ИЛ-4 в легких уровни сывороточных OVA-специфических антител классов IgE, IgG2a и IgG1 были сходными у первых двух групп. По всей видимости комплекс siIL-4/LTP действует локально, не всасываясь в системный кровоток. У мышей, получавших ингаляционно siIL-4/LTP, происходило снижение гиперреактивности бронхов в среднем на 20% в сравнении с животными после ингаляции siGFP/

LTP. Анализ клеточного состава БАЛ показал, что ингаляционное введение siIL-4/LTP приводит к снижению инфильтрации эозинофилов на 38%, что указывает на нивелирование аллергического воспаления в легких. Гистологический анализ ткани легких подтвердил снижение уровня аллергического воспаления, а также выявил снижение уровня ремоделирования бронхов, что заключалось в подавлении гиперплазии бокаловидных клеток.

Заключение. Аэрозольное введение комплекса siIL-4/LTP, подавляющего экспрессию про-воспалительного цитокина - ИЛ-4, нивелирует признаки экспериментальной бронхиальной астмы, в частности, снижает уровень гиперреактивности бронхов и степень аллергического воспаления в легких. Все это свидетельствует о том, что применение молекул миРНК для регуляции экспрессии про-воспалительных генов является перспективным направлением в создании генно-терапевтических лекарственных средств нового поколения.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Holgate S.T. The sentinel role of the airway epithelium in asthma pathogenesis. // *Immunol. Rev.* 2011. Vol. 242, № 1. P. 205–219.
2. Grünig G. et al. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. // *Science.* 1998. Vol. 282, № 5397. P. 2261–2263.
3. Perkins C., Wills-Karp M., Finkelman F.D. IL-4 induces IL-13-independent allergic airway inflammation. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006. Vol. 118, № 2. P. 410–419.
4. Maes T., Joos G.F., Brusselle G.G. Targeting interleukin-4 in asthma: lost in translation? // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2012. Vol. 47, № 3. P. 261–270.
5. Chatila T.A. Interleukin-4 receptor signaling pathways in asthma pathogenesis // *Trends in Molecular Medicine.* 2004. Vol. 10, № 10. P. 493–499.
6. Шиловский И.П. и др. Интерференция РНК - новый подход в терапии аллергической бронхиальной астмы // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2016. Vol. 79, № 4. P. 35–44.
7. Koloskova O.O. et al. Synthesis and evaluation of novel lipopeptide as a vehicle for efficient gene delivery and gene silencing // *Eur J Pharm Biopharm.* 2016. Vol. 102. P. 159–167.
8. Шиловский И.П. и др., Разработка модели РНК-опосредованной супрессии гена интерлейкина-4 in vitro // *Физиология и патология иммунной системы.* 2011. Vol. 15, № 6. P. 3–12.
9. Шиловский И.П. и др., Синтетические siRNA эффективно подавляют экспрессию провоспалительного цитокина интерлейкина-4 мыши in vitro // *Иммунология.* 2012. Vol. 2. P. 66–70.
10. Шиловский И.П. и др., Разработка безадрьювантной модели хронической бронхиальной астмы у мышей // *Российский иммунологический журнал.* 2014. Vol. 3, № 17. P. 638–641.
11. Shilovskiy I.P. et al. Adjuvant and adjuvant-free protocols produce similar phenotypes of allergic asthma in mice // *Curr. Trends Immunol.* 2015. Vol. 16. P. 79–91.