УДК [616.98:578.828:577.214/.217:575.116.1]-08

Л. І. Черпікова, И. І. Коваленко
Харківський національний медичний університет, м. Харків

ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ РНК-ІНТЕРФЕРЕНЦІЇ У ЛІКУВАННІ ВІЛ-ІНФЕКЦІЇ

У статті проведено аналіз результатів досліджень використання системи РНК-інтерференції для пригнічення репродукції ВІЛ у чутливих клітинах на різних етапах життєвого циклу вірусу та для блокування ко-рецепторів CCR5 клітин людини.

Ключові слова: генотерапія, РНК-інтерференція, ВІЛ-інфекція.

ВІЛ-інфекція є важливою проблемою охорони здоров'я в усьому світі. У Східній Європі і Центральній Азії масштаби епідемії ВІЛ-інфекції продовжують зростати. Сьогодні Україна посідає одне з перших місць серед країн Європи за кількістю ВІЛ-позитивних осіб. Станом на початок 2014 року кумулятивна кількість офіційно зареєстрованих випадків ВІЛ-інфекції в Україні, починаючи з 1987 року, становила 245 216 випадків, з них на диспансерному обліку з діагнозом ВІЛ-інфекція перебувало 139 573 особи та 29 005 хворих на СНІД [1].

З початку застосування перших антиретровірусних препаратів у лікуванні ВІЛ-інфекції досягнуто суттєвого прогресу. Сьогодні при адекватно вибраному режимі високоактивної антиретровірусної терапії пацієнти можуть жити десятки років [10]. Але, незважаючи на успіхи, досягнуті в лікуванні ВІЛ-інфекції, ще не вдається повністю елімінувати вірус з організму інфікованої людини [4]. Ситуація ускладнюється тим, що у відповідь на застосування антиретровірусних препаратів, ВІЛ може селекціонувати певні мутації, які часто призводять до формування штамів, резистентних до окремого класу препаратів [3, 19, 22, 29], що у свою чергу вимагає призначення нових антиретровірусних препаратів. Експерти в галузі СНІДу вважають, що в лікуванні ВІЛ-інфекції ще може настати новий прорив завдяки новим підходам і технологіям. Потенційні методи лікування були представлені у березні 2014 року в США на 21-й Конференції, присвяченій ретровірусам та опортуністичним інфекціям [6].

Сьогодні перспективним напрямком у лікування ВІЛ-інфекції є генотерапія. Основа сучасної генотерапії – це використання природних механізмів клітин, які регулюють експресію генів. Одним із принципово нових підходів до боротьби із ВІЛ-інфекцією є метод, який ґрунтується на використанні механізму РНК-інтерференції – вибіркового відключення окремих генів за допомогою інтерферуючих РНК.

РНК-інтерференція – універсальний спосіб регуляції активності генів у живих організмах. У 2006 році американські вчені Ендрю Файер і Крейг Мелло отримали Нобелівську премію в галузі фізіології та медицини за роботи з вивчення РНК-інтерференції у нематоди Caenorhabditis elegans, результати яких були опубліковані у 1998 році [12, 35]. РНК-інтерференція (англ. RNA interference, RNAi) – процес пригнічення експресії гена за допомогою малих молекул РНК. Вона виявлена у клітинах багатьох еукаріот, у тому числі у тварин, рослин і грибів. Система РНК-інтерференції відіграє важливу роль у захисті від транспозонів і вірусів, а також у регуляції розвитку, диференціації та експресії генів організму [13, 27, 28].

Механізм РНК-інтерференції полягає в індукції дволанцюговими РНК процесів розпізнавання і деградації клітинної м-РНК. Процес починається з розрізання дволанцюгових РНК на короткі одноланцюгові мікро-РНК (англ. small interfering RNA, siRNA) за допомогою ферменту Dicer. Далі одноланцюгова РНК включається до складу РНК-білкового комплексу RISC (комплекс сайлесингу, індукований РНК, англ. RNA-induced silencing complex), у результаті активності якого РНК приєднується до комплементарної мРНК і викликає розрізання мРНК білком Argonaute. Ці процеси спричиняють пригнічення експресії (сайленсингу) відповідного гена [7]. Крім регуляції активності власних генів, спеціальні мікро-РНК спрямовують білок Argonaute на чужорідну РНК, яку вносять до клітини віруси. Це своєрідна захисна система, яка існує не тільки у високоорганізованих тварин, але й в рослин та примітивних організмів.

Відкриття РНК-інтерференції дає можливість блокувати активність небажаних генів без будь-якого втручання в геном, спрямовуючи власний захисний апарат клітини RISC на певну інформаційну РНК, таким чином блокуючи синтез небажаного продукту. Правильно сконструйований інтерферуючий фрагмент РНК може «виключити» непотрібний ген і зупинити тим самим розвиток хвороби на ранній стадії.

РНК-інтерференція використовується у широкомасштабних дослідженнях в галузі молекулярної біології, біохімії, біотехнології та медицини [32].

Так, наприклад, були проведені клінічні дослідження систем на основі РНК-інтерференції для лікування інфекцій, викликаних респіраторно-синцитіальним вірусом [31] і вірусом простого герпесу 2-го типу [18], пригнічення генів гепатиту А [22] і гепатиту В [18], генів вірусу грипу [23], пригнічення реплікації вірусу кору [14]. РНК-інтерференцію також вважають можливим способом лікування пухлин шляхом виключення генів, які активно експресуються в клітинах пухлин, або генів, які беруть участь у поділі клітин [17, 30]. Була показана ефективність системи РНК-інтерференції щодо пригнічення росту пухлинних клітин та експресії онкобілків вірусу папіломи людини 16-го типу Е6 і Е7 [37].

З відкриттям РНК-інтерференції з'явилася нова надія, що СНІД можна подолати. Можливо, використання терапії siRNA разом із традиційною антиретровірусною терапією дасть змогу досягти ефекту потенціювання, коли два чинники дають більш виражений лікувальний ефект. Зараз розробляються способи використання РНК-інтерференції щодо лікування персистуючої ВІЛ-інфекції першого типу [27]. ВІЛ є складною мішенню і потребує поєднання декількох шляхів застосування РНК-інтерференції [9, 27, 36]. Тому вчені розробляють шляхи впливу на різні етапи реплікації ВІЛ у вже зараженій клітині, зокрема на стадії інтеграції, збирання і виходу вірусу із клітини.

На початку вивчення явища РНК-інтерференції дослідники показали можливість блокувати реплікацію ВІЛ за допомогою siRNA в культурі клітин лімфоцитів людини на етапі синтезу провірусної ДНК [16]. Знання принципів РНК-інтерференції теоретично дозволяє припинити розмноження вірусу за допомогою вибіркового виключення генів, які він використовує. Проте для запобігання небажаних побічних реакцій необхідно знайти способи безпечної вибіркової доставки інтерферуючих РНК до інфікованих клітин [24]. Вирішенням цієї проблеми займається ціла галузь сучасної науки (drug delivery). Існує дві стратегії: по-перше, використання «готових» систем доставки РНК до клітини, отриманих із деяких вірусів, по-друге, створення штучних конструкцій із молекул.

Дослідники із медичної школи Гарварда використали синтетичні антитіла для доставки до Т-лімфоцитів інтерферуючих РНК, здатних блокувати активність вірусних генів, відповідальних за проникнення вірусу в клітину та синтез вірусних білків. На моделі ВІЛ-інфекції імунодефіцитних мишей з пересадженими стовбуровими клітинами кісткового мозку людини було показано пригнічення розмноження вірусу [19].

O. ter Brake та ін. використали лентивірусний вектор для доставки противірусної інтерферуючої РНК до стовбурових клітин, які потім вводили мишам. Т-хелпери таких мишей виявилися резистентними до ВІЛ [33-34].

Іншим можливим клінічним застосуванням РНК-інтерференції є блокування рецепторів і ко-рецепторів до ВІЛ. Так, використання siRNA спричинювало пригнічення експресії ко-рецепторів CXCR4 і CCR5 та блокування проникнення ВІЛ-1 до чутливих клітин [8, 26].

Співробітники Інституту молекулярної біології ім. В.А.Енгельгардта РАН и ДНЦ вірусології та біотехнології «Вектор» створили і випробували на культурі клітин три генетичні конструкції, здатні пригнічувати розмноження ВІЛ за допомогою РНК-інтерференції. Дані конструкції продукують siРНК-інгібітори репродукції ВІЛ-1 і гену CCR5 людини [2].

Інтерферуючі РНК були використані для пригнічення синтезу ко-рецепторів CCR5 на макрофагах. Для цього лентивірусний вектор таких РНК був введений у гемопоетичні клітини-попередники, які потім трансформувалися в макрофаги, резистентні до штаму R5 ВІЛ-1 [25].

На приматах була показана стабільна експресія siRNA проти ко-рецепторів CCR5, введених шляхом трансплантації гематопоетичних стовбурових клітин-попередників. Зазначені клітини проявляли резистентність до вірусу імунодефіциту мавп Simian ex vivo [5].

Для лікування лімфоми у хворих на СНІД були використані гемопоетичні клітини-попередники, частина яких була геномодифікована і була здатна на експресію антивірусних інтерферуючих РНК завдяки лентивірусному вектору. Вчені виявили стабільну експресію таких РНК у клітинах крові хворих протягом 24 місяців. Введені інтерферуючі РНК блокували синтез ко-рецепторів CCR5 і реплікацію вірусу [11].

Інтерферуючі РНК, які пригнічують синтез зворотної транскриптази ВІЛ-1, були використані для подолання резистентності вірусу до ламівудину. Спільне використання ламівудину та siRNA пригнічувало реплікацію мутантного штаму вірусу, резистентного до даного препарату [15].

Підсумок

Знання принципів РНК-інтерференції дозволяє припинити розмноження вірусу за допомогою вибіркового виключення тих генів, які він використовує. Це підтверджує можливість терапії препаратами на основі компонентів системи РНК-інтерференції. Проте для запобігання тяжких побічних реакцій необхідно ще знайти способи вибіркової доставки інтерферуючих РНК до інфікованих клітин. Дослідники працюють над створенням генетичних конструкцій, які можна використовувати в генотерапії ВІЛ-інфекції, у тому числі і таких, які здатні подолати високу швидкість мутацій вірусу. Нові методи боротьби з ВІЛ можуть бути використані для лікування хворих, яким не допомагає стандартна антиретровірусна терапія.

Перспективи подальших досліджень. *Залишається невирішеним питання щодо безпеки таких методів лікування, у тому числі, щодо побічних ефектів репресії генів з подібними нуклеотидними послідовностями.*

Список літератури

1. VIL-infekcija v Ukraïni. Informacijnij bjuleten'. – Kiïv, - 2014. – № 41. – 95 s.
2. Pat. № 2425150, RU, MPK C12N15/63, A61K39/21. /Institut molekuljarnoj biologii im. V.A. Jengel'gardta RAN RF, Churikov N.A., Kretova O.V. – Z. № 2009142859/10; zajavl. 23.11.2009; opubl. 27.07.2011. Kassetnaja geneticheskaja konstrukcija, jekspressirujushhaja tri biologicheski aktivnye siRNA, jeffektivno atakujushhie transkripty virusa immunodeficita cheloveka i gena CCR5 s pomoshh'ju RNK-interferencii.
3. Pukish N. S. Analiz molekuljarnih osoblivostej ukraïns'kih izoljativ VIL-1 / N. S. Pukish, A. M. Shherbins'ka, N. O. Babij [ta in.] // Biopolimeri i klitini. – 2009. – T. 25, № 1. – S. 50-55.
4. Poljakov A. N. Rezistentnost' virusa immunodeficita cheloveka k antiretrovirusnym preparatam / A. N. Poljakov, V. V. Rassohin // VICh-infekcija i immunosupressija. – 2010. – T. 2, № 2. – S. 48-57.
5. An D.S. Stable reduction of CCR5 by RNAi through hematopoietic stem cell transplant in non-human primates / D.S. An, R.E. Donahue, M. Kamata [et al.] // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2007. – Vol. 104. – P. 13110–13115.
6. Blick G. Protected T-cells persist and proliferate in HIV gene therapy study / G. Blick // 21st Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI). – Abstract 91LB. – Boston, - 2014.
7. Cheng K., Advanced delivery and therapeutic applications of RNAi / K. Cheng, R. I. Mahato. – Wiley, - 2013. – 536 p.
8. Crowe S. Suppression of chemokine receptor expression by RNA interference allows for inhibition of HIV-1 replication, by Martínez et al. / S.Crowe // AIDS. – 2003. – Vol. 17, Suppl 4. – P. 103-105.
9. Cullen B.R. Does RNA interference have a future as a treatment for HIV-1 induced disease? / B.R. Cullen // AIDS Rev. – 2005. – Vol. 1. – P. 22-25.
10. Deeks S. G. Antiretroviral treatment of HIV infected adults / S.G. Deeks // BMJ. – 2006. – Vol. 332.
11. DiGiusto D.L. RNA-based gene therapy for HIV with lentiviral vector-modified CD34+cells in patients undergoing transplantation for AIDS related lymphoma / D.L. DiGiusto, A. Krishnan, L. Li [et al.] // Sci. Transl. Med. – 2010. Vol. 2, Issue 36. – P. 36-43.
12. Fire A. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans / A. Fire, SiQun Xu, M. K. Montgomery [et al.] // Nature. – 1998. – Vol. 391. – P. 806-811.
13. Fritz J.H. Innate immune defense through RNA interference / J.H.Fritz, S.E. Girardin, D.J. Philpott // Sci. STKE. – 2006. – Vol. 2006, Issue 339. – P. 27-30.
14. Hu L. Inhibition of measles virus multiplication in cell culture by RNA interference / L. Hu, Z. Wang, C. Hu [et al.] // Acta Virol. – 2005. – Vol. 49, № 4. – P. 227-234.
15. Huelsmann P.M. Inhibition of drug-resistant HIV-1 by RNA interference / P.M. Huelsmann, P. Rauch, K. Allers [et al.] // Antiviral Res. – 2006. – Vol. 69, № 1. – P. 1-8.
16. Jacque J.-M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference / J.-M. Jacque, K. Triques, M. Stevenson // Nature. – 2002. – Vol. 418. – P. 435-438.
17. Jiang M. Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference / M. Jiang, J. Milner // Oncogene. – 2002. – Vol. 21, № 39. – P. 6041-6048.
18. Jia F. A retrovirus-based system to stably silence hepatitis B virus genes by RNA interference / F. Jia, C. Liu // Biotechnol. Lett. – 2006. – Vol. 28, № 20. – P. 1679-1685.
19. Kusov Y. Silencing of hepatitis A virus infection by small interfering RNAs / Y. Kusov, T. Kanda, A. Palmenberg [et al.] // J. Virol. – 2006. – Vol. 80, № 11. – P. 5599-5610.
20. Johnson V.A. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: December 2009 / V.A. Johnson, F. Brun-Vezinet, B. Clotet [et al.] // Top HIV Med. – 2009. – Vol. 17, № 5. – P. 138-145.
21. Kumar P. T cell-specific siRNA delivery suppresses HIV-1 infection in humanized mice / P. Kumar, H.S. Ban, S.S. Kim [et al.] // Cell. – 2008. – Vol. 134, № 4. – P. 577-586.
22. Kuritzkes D. R. Drug resistance in HIV-1 / D. R. Kuritzkes // Cur. Opin. Virol. – 2011. – Vol. 1, № 6. – P. 582-589.
23. Li Y. Construction of influenza virus siRNA expression vectors and their inhibitory effects on multiplication of influenza virus / Y. Li, L. Kong, B. Cheng [et al.] // Avian Dis. – 2005. – Vol. 549, № 4. – P. 562-573.
24. Li C.X. Delivery of RNA interference / C.X. Li, A. Parker, E.Menocal [et al.] // Cell Cycle. – 2006. – Vol. 5, № 18. – P. 2103-2109.
25. Liang M. Inhibition of HIV-1 infection by a unique short hairpin RNA to cheokine receptor 5 delivered into macrophages through hematopoietic progenitor cell transduction / M. Liang, M. Kamata, K. N. Chen [et al.] // The Journal of Gene Medicine. – 2010. – Vol. 12, Issue 3. – P. 255-265.
26. Martínez M. A. Suppression of chemokine receptor expression by RNA interference allows for inhibition of HIV-1 replication / M. A. Martínez, A. Gutiérrez, M. Armand-Ugón // AIDS. – 2002. – Vol. 16, Issue 18. – P. 2385-2390.

27. Martinez M. A. RNA Interference and viruses: current innovations and future trends / M. A. Martinez // – Caister Academic Press, - 2010. – 252 p.
28. Maillard P.V. Antiviral RNA interference in mammalian cells / P.V. Maillard, C. Ciaudo, A. Marchais [et al.] // Science. - 2013. – Vol. 342, № 6155. – P. 235-238.
29. Orrell C. Resistance in pediatric patients experiencing virologic failure with first-line and second-line antiretroviral therapy / C. Orrell, J. Levison, A.Ciaranello // Pediatr Infect Dis J. – 2013. – Vol. 32, № 6. – P. 644-647.
30. Putral L. RNA interference for the treatment of cancer / L. Putral, W. Gu, N. McMillan // Drug News Perspect. – 2006. – Vol. 19, № 6. – P. 317-324.
31. Sah D. Therapeutic potential of RNA interference for neurological disorders / D. Sah // Life Sci. – 2006. – Vol. 79, № 19. – P. 1773-1780.
32. Sullenger B. A. Emerging clinical applications of RNA / B. A. Sullenger, E. Gilboa. // Nature. – 2002. – Vol. 418. – P. 252-258.
33. ter Brake O. Lentiviral vector design for multiple shRNA expression and durable HIV-1 inhibition / O. ter Brake, K. Hooft, Y. Po Liu [et al.] // Molecular Therapy. – 2008. – Vol. 16, №3. – P. 557-564.
34. ter Brake O. Evaluation of safety and efficacy of RNAi against HIV-1 in the human immune system (Rag-2-/-γc-/-) mouse model / O. ter Brake, N. Legrand, K.J. von Eije [et al.] // Gene Therapy. – 2009. – Vol. 16. – P. 148-153.
35. The 2006 Nobel Prize in physiology or medicine. – Access mode: http://www.webcitation.org/61CfnnPLi.
36. Wolkowicz R. Gene therapy progress and prospects: Novel gene therapy approaches for AIDS / R. Wolkowicz, G.P. Nolan // Gene Therapy. - 2005. – Vol. 12. – P. 467-476.
37. Yamato K. New highly potent and specific E6 and E7 siRNAs for treatment of HPV16 positive cervical cancer / K. Yamato, T. Yamada, M. Kizaki // Cancer Gene Therapy. – 2008. – Vol. 15. – P. 140-153.

Реферати

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ В ЛЕЧЕНИИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ
Черникова Л. И., Коваленко Н. И.

Проведен анализ результатов исследований применения системы РНК-интерференции для подавления репродукции ВИЧ в чувствительных клетках на разных этапах жизненного цикла вируса и для блокирования ко-рецепторов CCR5 клеток человека.

Ключевые слова: генотерапия, РНК-интерференция, ВИЧ-инфекция.

Стаття надійшла 3.02.2015 р.

PROSPECTS OF RNA-INTERFERENCE IN THE TREATMENT OF HIV-INFECTION
Chernikova L. I., Kovalenko N. I.

The results of trials of RNA-interference system to inhibit HIV replication in sensitive cells at different stages of the viral life cycle and blocking CCR5 co-receptor of human cells were conducted.

Key words: gene therapy, RNA interference, HIV infection.

Рецензент Кущ О.Г.

УДК 616 – 006.6 : 577.2

О. В. Харченко
Полтавський національний педагогічний університет ім. В. Г. Короленка, м. Полтава

МІКРОСАТЕЛІТНІ ЕКСПАНСІЇ – МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНИЙ ФЕНОМЕН ДІАГНОСТИКИ ПЕРЕДПУХЛИННИХ І ПУХЛИННИХ ПРОЦЕСІВ

Насиченість геномів мікросателітними послідовностями є результатом дії факторів, які визначають їх композиційні, структурні та термодинамічні особливості. Мікросателіти можуть знаходитись в геномі скрізь, як в некодуючих, так і в кодуючих послідовностях, впливаючи на транскрипційну активність. Поліморфізм мікросателітів може бути виявлений їх морфологічними характеристиками. Інтенсивне подовжання мікросателітних послідовностей за рахунок реплікаційних помилок має назву мікросателітної експансії. Здатність повторів до експансії залежить від довжини мікросателітної послідовності. Співвідношення між мутаційними подіями, що призводять до збільшення мікросателітних послідовностей за рахунок додавання повтору, співвідносяться з кількістю мутацій, що призводять до зменшення кількості повторів в мікросателітах людини як 10:4.

Поліморфізм мікросателітів може визначатись їх локалізацією та орієнтацією в геномі. Вторинна структура ДНК розглядається сьогодні як причина експансії мікросателітних послідовностей. Сама вторинна структура ДНК є похідною термодинамічних характеристик її послідовності. Розрахунки термодинамічних характеристик повторюваних послідовностей дозволили розробити ряд модельних систем, оцінюючих здатність мікросателітних послідовностей впливати на модифікації ДНК, формуючи різні вторинні структури, пов'язані з нестабільністю мікросателітів. Існує дві групи маркерів, що отримують в результаті PCR: перша –відома як STSs (sequence-tagged sites) з праймерами, сконструйованими з відомих послідовностей, і друга – що базується на довільних праймерах. Найінформативніший або поліморфний STS-маркер з'являється тоді, коли ампліфікується дільниця ДНК, що вміщує послідовності мікросателітних повторів. Такий маркер, базується на STS, і позначений як simpl-sequence length polymorphism (SSLP) або sequence-tagged microsatellit site (STMS). Кожний STMS-маркер детектує успадковані кодомінантні алелі в одиничному локусі в геномі.

Ключові слова: мікросателітні послідовності, мікросателітні експансії, помилки реплікації, нестабільність мікросателітів, маркери на основі PCR.

Робота є фрагментом НДР «Формування сучасних методів хірургічного лікування і профілактики ускладнень захворювань і травм органів грудної клітки і черевної порожнини» (№ держреєстрації 0110U002649).

Раніше, з метою діагностики онкологічних новоутворень, активно використовувались тільки класичні методи цитології та гістології. Але, останні десятиліття класичні підходи швидко