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

**НОВОЕ НАПРАВЛЕНИЕ В ЛЕЧЕНИИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ. АКЦЕНТ НА СИСТЕМУ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ.**

*Л.И. Черникова., Н.И. Коваленко*

*Харьковский национальный медицинский университет*

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

ВИЧ-инфекция является важной проблемой охраны здоровья во всем мире. В Восточной Европе и Центральной Азии масштабы эпидемии ВИЧ-инфекции продолжают расти. Украина занимает одно из первых мест среди стран Европы по количеству ВИЧ-серопозитивных лиц. По состоянию на сентябрь 2014 года кумулятивное количество официально зарегистрированных случаев ВИЧ-инфекции в Украине, начиная с 1987 года, составило 260 198 случаев, из них на диспансерном учете с диагнозом ВИЧ-инфекция состояло 144655 лиц и 32825 больных СПИДом [1].

С начала применения первых антиретровирусных препаратов в лечении ВИЧ-инфекции достигнут существенный прогресс. Сегодня при адекватно выбранном режиме высокоактивной антиретровирусной терапии пациенты могут жить десятки лет [10]. Но, несмотря на успехи, достигнутые в лечении ВИЧ-инфекции, еще не удается полностью элиминировать вирус из организма инфицированного человека [3]. Ситуация осложняется тем, что в ответ на применение антиретровирусных препаратов, ВИЧ может селекционировать определенные мутации, которые часто приводят к формированию штаммов, резистентных к отдельному классу препаратов [4, 19, 21, 29], что в свою очередь требует назначения новых антиретровирусных препаратов.

Эксперты в области СПИДа считают, что в лечении ВИЧ-инфекции еще может наступить новый прорыв благодаря новым подходам и технологиям. Потенциальные методы лечения были представлены в марте 2014 года в США на 21-й Конференции, посвященной ретровирусам и оппортунистическим инфекциям [6].

Сегодня перспективным направлением в лечении ВИЧ-инфекции является генотерапии. Основа современной генотерапии - это использование природных механизмов клеток, которые регулируют экспрессию генов. Одним из принципиально новых подходов в борьбе с ВИЧ-инфекцией является метод, основанный на использовании механизма РНК-интерференции - избирательного отключения отдельных генов при помощи интерферирующих РНК.

РНК-интерференция - универсальный способ регуляции активности генов в живых организмах. В 2006 году американские ученые Эндрю Файер и Крейг Мелло получили Нобелевскую премию в области физиологии и медицины за работы по изучению РНК-интерференции у нематоды Caenorhabditis elegans, результаты которых были опубликованы в 1998 году [12, 35]. РНК-интерференция (англ. RNA interference, RNAi) - процесс подавления экспрессии гена с помощью малых молекул РНК. Она обнаружена в клетках многих эукариот, в том числе у животных, растений и грибов. Система РНК-интерференции играет важную роль в защите от транспозонов и вирусов, а также в регуляции развития, дифференциации и экспрессии генов организма [13, 26, 27].

Механизм РНК-интерференции заключается в индукции двухцепочечными РНК процессов распознавания и деградации клеточной м-РНК. Процесс начинается с разрезания двухцепочечных РНК на короткие одноцепочечные микро-РНК (англ. Small interfering RNA, siRNA) с помощью фермента Dicer. Далее одноцепочечная РНК включается в состав РНК-белкового комплекса RISC (комплекс сайлесинга, индуцированный РНК, англ. RNA-induced silencing complex), в результате активности которого РНК присоединяется к комплементарной мРНК и вызывает разрезания мРНК белком Argonaute. Эти процессы вызывают угнетение экспрессии (сайленсинга) соответствующего гена [7]. Кроме регуляции активности собственных генов, специальные микро-РНК направляют белок Argonaute на чужеродную РНК, которую вносят в клетку вирусы. Это своеобразная защитная система, которая существует не только в высокоорганизованных животных, но и у растений и примитивных организмов.

Открытие РНК-интерференции позволяет блокировать активность нежелательных генов без какого-либо вмешательства в геном, направляя свой защитный аппарат клетки RISC на определенную информационную РНК, таким образом блокируя синтез нежелательного продукта. Правильно сконструированный интерферирующий фрагмент РНК может «выключить» ненужный ген и остановить тем самым развитие болезни на ранней стадии.

РНК-интерференция используется в широкомасштабных исследованиях в области молекулярной биологии, биохимии, биотехнологии и медицины [32].

Так, например, были проведены клинические исследования систем на основе РНК-интерференции для лечения инфекций, вызванных респираторно-синцитиальный вирусом [31] и вирусом простого герпеса 2-го типа [18], угнетение генов гепатита А [22] и гепатита В [17 ], генов вируса гриппа [25], подавление репликации вируса кори [14]. РНК-интерференцию также считают возможным способом лечения опухолей путем исключения генов, которые активно экспрессируются в клетках опухолей, или генов, которые участвуют в делении клеток [18, 30]. Была показана эффективность системы РНК-интерференции в подавлении роста опухолевых клеток и экспрессии онкобелков вируса папилломы человека 16-го типа Е6 и Е7 [37].

С открытием РНК-интерференции появилась новая надежда, что СПИД можно преодолеть. Возможно, использование терапии siRNA вместе с традиционной антиретровирусной терапией позволит достичь эффект потенцирования, когда два фактора дают более выраженный лечебный эффект. Сейчас разрабатываются способы использования РНК-интерференции в лечении персистирующей ВИЧ-инфекции первого типа [27]. ВИЧ является сложной мишенью и требует сочетания нескольких путей использования РНК-интерференции [9, 27, 36]. Поэтому ученые разрабатывают пути воздействия на различные этапы репликации ВИЧ в уже зараженной клетке, в частности на стадии интеграции, сбора и выхода вируса из клетки.

В начале изучения явления РНК-интерференции исследователи показали возможность блокировать репликацию ВИЧ с помощью siRNA в культуре клеток лимфоцитов человека на этапе синтеза провирусной ДНК [16].

Знание принципов РНК-интерференции теоретически позволяет приостановить размножение вируса с помощью выборочного отключения генов, которые он использует. Однако для предотвращения нежелательных побочных реакций необходимо найти способы безопасной выборочной доставки интерферирующих РНК в инфицированные клетки [24]. Решением этой проблемы занимается целая отрасль современной науки (drug delivery). Существует две стратегии: во-первых, использование «готовых» систем доставки РНК в клетки, полученных из некоторых вирусов, во-вторых, создание искусственных конструкций из молекул.

Исследователи из медицинской школы Гарварда использовали синтетические антитела для доставки к Т-лимфоцитам интерферирующих РНК, способных блокировать активность вирусных генов, ответственных за проникновение вируса в клетку и синтез вирусных белков. На модели ВИЧ-инфекции иммунодефицитных мышей с пересаженными стволовыми клетками костного мозга человека было показано угнетение размножения вируса [20].

O. ter Brake и др. использовали лентивирусний вектор для доставки противовирусной интерферирующей РНК в стволовые клетки, которые затем вводили мышам. Т-хелперы таких мышей оказались резистентными к ВИЧ [33-34].

Другим возможным клиническим применением РНК-интерференции является блокирование рецепторов и ко-рецепторов к ВИЧ. Так, использование siRNA вызывало угнетение экспрессии ко-рецепторов CXCR4 и CCR5 и блокировки проникновения ВИЧ-1 в чувствительные клетки [8, 28].

Сотрудники Института молекулярной биологии им. В.А.Енгельгардта РАН и ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» создали и испытали на культуре клеток три генетические конструкции, способные подавлять размножение ВИЧ с помощью РНК-интерференции. Данные конструкции производят siPHK ингибиторы репродукции ВИЧ-1 и гена CCR5 человека [2].

Интерферирующие РНК были использованы для подавления синтеза ко-рецепторов CCR5 на макрофагах. Для этого лентивирусний вектор таких РНК был введен в гемопоэтические клетки-предшественники, которые затем трансформировались в макрофаги, резистентные к штамму R5 ВИЧ-1 [23].

На приматах была показана стабильная экспрессия siRNA против ко-рецепторов CCR5, введенных путем трансплантации гематопоэтических стволовых клеток-предшественников. Указанные клетки проявляли резистентность к вирусу иммунодефицита обезьян Simian ex vivo [5].

Для лечения лимфомы у больных СПИДом были использованы гемопоэтические клетки-предшественники, часть которых была геномодифицированна и была способна на экспрессию антивирусных интерферирующих РНК благодаря лентивирусному вектору. Ученые обнаружили стабильную экспрессию таких РНК в клетках крови больных в течение 24 месяцев. Введенные интерферирующие РНК блокировали синтез ко-рецепторов CCR5 и репликацию вируса [11].

Интерферирующие РНК, которые подавляют синтез обратной транскриптазы ВИЧ-1, были использованы для преодоления резистентности вируса к ламивудину. Совместное использование ламивудина и siRNA подавляло репликацию мутантного штамма вируса, резистентного к данному препарату [15].

Таким образом, знание принципов РНК-интерференции позволяет прекратить размножение вируса с помощью выборочного исключения тех генов, которые он использует. Это подтверждает возможность терапии препаратами на основе компонентов системы РНК-интерференции. Однако для предотвращения тяжелых побочных реакций необходимо еще найти способы избирательной доставки интерферирующих РНК в инфицированные клетки. Кроме того, остается нерешенным вопрос о безопасности таких методов лечения, в том числе, относительно побочных эффектов подавления генов с подобными нуклеотидными последовательностями. В настоящее время исследователи работают над созданием генетических конструкций, которые можно использовать в генотерапии ВИЧ-инфекции, в том числе и таких, которые способны преодолеть высокую скорость мутаций вируса. Новые методы борьбы с ВИЧ могут быть использованы для лечения больных, которым не помогает стандартная терапия.

**Літературa**:

1. ВІЛ-інфекція в Україні. Інформаційний бюлетень. – Київ, 2014. – № 41. – 95 с.

2. Пат. № 2425150, RU, МПК C12N15/63, A61K39/21. /[Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН](http://www.findpatent.ru/byowners/124977/) [РФ](http://www.findpatent.ru/byowners/134218/), [Чуриков Н.А.](http://www.findpatent.ru/byauthors/335644/), [Кретова О.В.](http://www.findpatent.ru/byauthors/335645/) – З. № 2009142859/10; заявл. 23.11.2009; опубл. 27.07.2011. Кассетная генетическая конструкция, экспрессирующая три биологически активные siRNA, эффективно атакующие транскрипты вируса иммунодефицита человека и гена CCR5 с помощью РНК-интерференции.

3. Поляков А.Н. Резистентность вируса иммунодефицита человека к антиретровирусным препаратам / А.Н. Поляков, В.В. Рассохин // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессия. – 2010. – Т. 2, № 2. – С. 48-57.

4. Пукіш Н.С. Аналіз молекулярних особливостей українських ізолятів ВІЛ-1 / Н.С. Пукіш, А.М. Щербінська, Н.О. Бабій [та ін.] // Біополімери і клітини. – 2009. – Т. 25, № 1. – С. 50-55.

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. – V. 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. – Access mode: <http://www.aidsmap.com/Protected-T-cells-persist-and-proliferate-in-HIV-gene-therapy-study/page/2834010/>

7. [Cheng](http://eu.wiley.com/WileyCDA/Section/id-302479.html?query=Kun+Cheng) K., Advanced delivery and therapeutic applications of RNAi / K. [Cheng](http://eu.wiley.com/WileyCDA/Section/id-302479.html?query=Kun+Cheng), [R. I. Mahato](http://eu.wiley.com/WileyCDA/Section/id-302479.html?query=Ram+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.](http://www.medscape.com/viewarticle/467320) / S.Crowe // AIDS. – 2003. – V. 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. – V. 1. – P. 22-25.

10. Deeks S.G. Antiretroviral treatment of HIV infected adults / S.G. Deeks // BMJ. – 2006. – V. 332. – Access mode: http://dx.doi.org/10.1136/bmj.332.7556.1489.

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. V. 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. – V. 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. – V. 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. – V. 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.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Inhibition+of+drug-resistant+HIV-1+by+RNA+interference.+Huelsmann+PM%2C+Rauch+P%2C+Allers+K%2C+John+MJ%2C+Metzner+KJ.+Antiviral+Res.+2006+Jan%3B+69(1)%3A1-8.+Epub+2005+Nov+2.) – 2006. – V. 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. – V. 418. – P. 435-438.

17. Jia F. A retrovirus-based system to stably silence hepatitis B virus genes by RNA interference / F. Jia, C. Liu // Biotechnol. Lett. – 2006. – V. 28, № 20. – P. 1679-1685.

18. 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. – V. 21, № 39. – P. 6041-6048.

19. 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. – V. 17, № 5. – P. 138-145.

20. Kumar P. T cell-specific siRNA delivery suppresses HIV-1 infection in humanized mice / P. Kumar, H.S. [Ban](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ban%20HS%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=18691745), S.S. [Kim](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kim%20SS%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=18691745) [et al.] // Cell. – 2008. – V. 134, № 4. – P. 577-586.

21. [Kuritzkes D.R. Drug resistance in HIV-1 / D.R. Kuritzkes // Cur. Opin. Virol. – 2011. – V. 1, № 6. – P. 582-589.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22162985)

22. Kusov Y. Silencing of hepatitis A virus infection by small interfering RNAs / Y. Kusov, T. Kanda, A. Palmenberg [et al.] // J. Virol. – 2006. – V. 80, № 11. – P. 5599-5610.

23. Liang M. Inhibition of HIV-1 infection by a unique short hairpin RNA to chemokine 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. – [V. 12, Issue 3. –](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jgm.v12:3/issuetoc) P. 255-265.

24. [Li C.X](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Li%20CX%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=16940756). Delivery of RNA interference / C.X. [Li](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Li%20CX%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=16940756), A. [Parker](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Parker%20A%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=16940756), E.[Menocal](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Menocal%20E%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=16940756) [et al.] // [Cell Cycle.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16940756" \o "Cell cycle (Georgetown, Tex.).) – 2006. – V. 5, № 18. – P. 2103-2109.

25. 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. – V. 549, № 4. – P. 562-573.

26. Maillard P.V. Antiviral RNA interference in mammalian cells / P.V. Maillard, C. Ciaudo, A. Marchais [et al.] // Science. - 2013. – V. 342, № 6155. – P. 235-238.

27. Martinez [M.A.](http://www.amazon.com/s/ref=dp_byline_sr_book_1?ie=UTF8&field-author=Miguel+Angel+Mart%C3%83%C2%83%C3%82%C2%ADnez&search-alias=books&text=Miguel+Angel+Mart%C3%83%C2%83%C3%82%C2%ADnez&sort=relevancerank) RNA Interference and viruses: current innovations and future trends / M.A. Martinez – Caister Academic Press, 2010. – 252 p.

28. 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. – V. 16, Issue 18. – P. 2385-2390](http://journals.lww.com/aidsonline/toc/2002/12060).

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. – V. 32, № 6. – P. 644-647.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23303240)

30. Putral L. RNA interference for the treatment of cancer / L. Putral, W. Gu, N. McMillan // Drug News Perspect. – 2006. – V. 19, № 6. – P. 317-324.

31. Sah D. Therapeutic potential of RNA interference for neurological disorders / D. Sah // Life Sci. – 2006. – V. 79, № 19. – P. 1773-1780.

32. Sullenger B. A. Emerging clinical applications of RNA / B.A.Sullenger, E. Gilboa. // Nature. – 2002. – V. 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. – V. 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. – V. 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. – V. 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. – V. 15. – P. 140-153.

**НОВИЙ НАПРЯМОК У ЛІКУВАННІ ВІЛ-ІНФЕКЦІЇ. АКЦЕНТ НА СИСТЕМУ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦІЇ.**

*Л.І. Чернікова., Н.І. Коваленко*

*Харківський національний медичний університет*

У статті представлений огляд літератури з досліджень можливого застосування РНК-інтерференції у лікуванні ВІЛ-інфекції. 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 CXCR4 і CCR5 клітин людини з метою попередження проникнення вірусу. Доказана ефективність сумісного використання ламівудину та siRNA-інгібіторів синтезу зворотної транскриптази вірусу для пригнічення реплікації мутантного штаму вірусу, резистентного до даного препарату.

Розглядаються способи безпечної вибіркової доставки інтерферуючих РНК в інфіковані клітини за допомогою синтетичних антитіл, лентивірусного вектора або трансплантації гематопоетичних стовбурових клітин-попередників, які експресують siRNA.

**NEW DIRECTION IN THE TREATMENT OF HIV-INFECTION. THE EMPHASIS ON THE SYSTEM OF RNA-INTERFERENCE.**

*Chernikova L.I., Kovalenko N.I.*

*Kharkiv National Medical University, Kharkіv*

The article presents a review of the literature on the study of possible application of RNA-isnterference in the treatment of HIV infection. 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 of CXCR4 and CCR5 co-receptor of human cells to prevent penetration of the virus were conducted. The efficacy of lamivudine and joint siRNA-reverse transcriptase synthesis inhibitors to inhibit viral replication of mutant strains of the virus resistant to the drug has been proven.

The methods of safe selectively delivering of interfering RNA in the infected cells by using synthetic antibodies, a lentiviral vector or transplantation of hematopoietic progenitor stem cells which express siRNA are considered.