

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/LettersVJ-2022-8-09

Обзор

## Биологические эффекты экзогенной РНК

В.П. Николин<sup>1</sup>✉, Н.А. Попова<sup>1, 2</sup>

**Аннотация:** В настоящее время важное значение имеет исследование РНК с целью ее использования в генотерапии различных заболеваний. Серьезные успехи достигнуты в химической модификации мРНК, повышающей ее стабильность и снижающей способность активировать нежелательные иммунные реакции. Прогресс в технологии мРНК наряду с развитием нанотехнологий позволил исследовать мРНК для ее применения в различных сферах биомедицины. Вместе с тем многие биологические эффекты РНК остаются неизученными, но могут быть важны не только с практической точки зрения, но и для понимания молекулярных процессов. В связи с этим заслуживают внимания результаты экспериментальных исследований, инициированных академиком Д.К. Беляевым и проведенных более 40 лет назад. Эти результаты свидетельствуют о способности естественной немодифицированной РНК без применения трансфекционных агентов повышать иммуногенность опухолевых клеток и менять резистентность мышей к трансплантатам костного мозга. Значительный интерес представляют данные о возможности естественного вовлечения экзогенной поли-(А)<sup>+</sup>мРНК печени крыс в процесс обратной транскрипции в опухолевых клетках. Цель данной обзорной статьи – привлечь внимание к пионерским работам, выполненным в ИЦиГ СО РАН, и обсудить механизмы действия описанных в них препаратов РНК с учетом результатов современных исследований. Можно полагать, что изучение естественных РНК с применением биотехнологий позволит выявить их новые функциональные особенности и более эффективные методы создания препаратов на основе РНК.

**Ключевые слова:** мРНК; экспрессия ксеноантигенов; Krebs-2; спонтанная опухоль мышей; цитотоксический тест; трансплантация костного мозга.

**Благодарности:** Работа выполнена по бюджетному проекту FWNR-2022-0016.

**Для цитирования:** Николин В.П., Попова Н.А. Биологические эффекты экзогенной РНК. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;8(2):206-213. DOI 10.18699/LettersVJ-2022-8-09

Review

## Biological effects of exogenous RNA

V.P. Nikolin<sup>1</sup>✉, N.A. Popova<sup>1, 2</sup>


**Abstract:** Currently, great importance is attached to the research of RNA in order to use it in the gene therapy of various diseases. Significant progress has been made in the chemical modification of mRNA, which increases its stability and reduces its ability to activate unwanted immune reactions. Progress in mRNA technology, along with the development of nanotechnology, has made it possible to study mRNA for its use in various fields of biomedicine. At the same time, many biological effects of RNA remain unexplored, but may be of significant interest not only from a practical point of view, but also from the point of view of understanding molecular processes. In this regard, the results of experimental studies initiated by Academician D.K. Belyaev and conducted more than 40 years ago deserve attention. These results indicate the ability of natural unmodified RNA without the use of transfection agents to increase the immunogenicity of tumor cells and change the resistance of mice to bone marrow transplants. Of significant interest are the data on the possibility of involving exogenous rat liver poly-(A)<sup>+</sup>mRNA in the process of reverse transcription in tumor cells. The purpose of this review article is to draw attention to the pioneering work carried out many years ago at the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, and try to discuss the mechanisms of action of RNA preparations used in these works, based on the results of modern research. In general, there is reason to believe that the study of natural RNAs using modern biotechnologies will reveal their new functional features and more effective ways to create drugs based on RNA.

**Key words:** mRNA; Krebs-2; mice of the high-cancer C3H/He line; spontaneous breast tumor; cytotoxic test; bone marrow transplantation.

**For citation:** Nikolin V.P., Popova N.A. Biological effects of exogenous RNA. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;8(2):206-213. DOI 10.18699/LettersVJ-2022-8-09 (in Russian)

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия  
Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия  
Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 nikolin@bionet.nsc.ru © Николин В.П., Попова Н.А., 2022

## Введение

Хотя интерес к нуклеиновым кислотам и их применение в лечении различных патологических процессов известны давно (Федянина и др., 2007), исследование РНК как нового класса терапевтических средств началось сравнительно недавно: после того как было показано, что прямая инъекция транскрибированной *in vitro* мРНК приводит к экспрессии кодируемого белка в мышцах мыши (Wolff et al., 1990). При этом использование мРНК в генотерапии вызывает у исследователей наибольший интерес (Miao et al., 2021), так как считается, что она выступает более удобным, по сравнению с ДНК, терапевтическим инструментом из-за преходящей экспрессии, отсутствия необходимости проникновения в ядро и риска инсерционного мутагенеза. Исследование мРНК как терапевтического средства получило всеобщее распространение, когда было обнаружено, что мРНК, содержащие псевдоуридины, обладают более высокой трансляционной способностью, чем немодифицированные мРНК. Результаты показали, что подобная модификация нуклеозидов способствует повышению стабильности и трансляционной способности мРНК при одновременном снижении ее иммуногенности *in vivo* (Kariko et al., 2008). Такая модификация делает мРНК подходящим инструментом как для замены генов, так и вакцинации.

Прогресс в технологии мРНК наряду с развитием нанотехнологий позволил исследовать мРНК с целью ее использования в различных сферах биомедицины: 1) как нановакцины, получаемые на основе кодирующей антиген мРНК для активации иммунной системы; 2) в заместительной белковой терапии для лечения заболеваний с генетическими нарушениями, вызванными мутацией; 3) при редактировании генов, достигаемом за счет совместной доставки мРНК и гРНК, кодирующих Cas9; 4) при программировании и инженерии клеток путем введения мРНК, кодирующей факторы транскрипции или другие функциональные молекулы (Xiong et al., 2018).

Приведенный выше перечень возможного применения мРНК не является полным. Следует иметь в виду, что функции РНК многообразны и связанные с ними многие биологические эффекты пока не исследованы, но могут быть важны не только с практической точки зрения, но и для понимания молекулярных процессов. В связи с вышесказанным представляют интерес результаты инициированных академиком Д.К. Беляевым и проведенных более 40 лет назад исследований по тормозящему влиянию препаратов РНК на рост спонтанной опухоли у мышей высококорактовых линий. В действительности это был первый опыт иммунотерапии опухоли с использованием препаратов РНК. Изучение этого феномена привело к раскрытию уникальных особенностей функционирования экзогенной РНК. Однако указанные работы не привлекли должного внимания, так как считалось, что функции РНК ограничены ее связью с внутриклеточными процессами и не распространяются за пределы клетки.

В обзорной статье представлены основные результаты этих исследований и обсуждение возможных механизмов действия РНК с учетом данных современных работ.

## Материалы и методы

В экспериментах использованы лиофильно высушенные суммарные препараты РНК, полученные из печени крупного рогатого скота или печени мышей (Kirby, 1956). Препараты РНК, полученные из печени мышей, очищали от полисахаридов и низкополимерных РНК трех- или четырехкратным переосаждением 1М NaCl. Поли-(А)<sup>+</sup>мРНК выделяли из полисом клеток печени крыс линии Wistar с помощью аффинной хроматографии на поли-У-сефарозе 4В (Ильдуганова и др., 1977). Полученные препараты поли-(А)<sup>+</sup>мРНК были функционально активными при их тестировании в бесклеточной системе трансляции и обратной транскрипции. Иммунную сыворотку к крысиным антигенам получали путем четырехкратной иммунизации мышей СЗНА клетками селезенки крыс Wistar с месячными интервалами между каждой иммунизацией. Для получения антисыворотки к поверхностным антигенам клеток опухоли Кребс-2 мышей СЗНА иммунизировали (четырекратно) опухолевыми клетками (как обработанными, так и необработанными РНК), облученными на гамма-установке в дозе 150 Гр. Цитотоксический тест проводили по методу P.A. Gorer и P. O'Gorman (1956). В качестве источника компонента использовали сыворотку кролика. Для более подробного ознакомления с описаниями методов см. ссылки на соответствующие работы.

### Изменение антигенных свойств опухолевых клеток после воздействия экзогенной поли(А)<sup>+</sup>мРНК

Д.К. Беляев и коллеги (Беляев и др., 1966; Матиенко и др., 1970; Николин и др., 1980) впервые показали, что полученные из печени животных препараты РНК при длительном парентеральном введении проявляют противоопухолевую активность в отношении спонтанной опухоли молочной железы у мышей высококорактовых линий. Исследователи высказали предположение, что противоопухолевое действие препаратов связано с влиянием РНК на генетический аппарат опухолевой клетки. К тому времени в ряде работ при воздействии РНК на клетки *in vitro* или *in vivo* продемонстрированы результаты, свидетельствовавшие о способности препаратов РНК вызывать в опухолевых и нормальных клетках фенотипические изменения, заключающиеся в появлении ранее не свойственных этим клеткам соединений, в том числе антигенов со специфичностью ткани-источника РНК (Amos, Kearns, 1962; Niu et al., 1962; Копылова-Свиридова и др., 1964; Tuohimaa et al., 1972).

В связи с этим предстояло выяснить, обладают ли полученные в наших условиях препараты РНК способностью вызывать изменение в антигенной специфичности опухолевых клеток. При трансплантации мышам опухолевых клеток пяти штаммов опухолей после их предварительной инкубации с препаратом алло- или ксеногенной суммарной РНК ни в одном случае не выявлено достоверного снижения прививаемости или торможения роста опухолей, как это можно было ожидать при появлении в клетках опухоли новых антигенов. Однако у мышей, предварительно иммунизированных антигенами доноров РНК (гомогенатом ткани печени), отмечено статистически значимое торможение роста (40–50 %) опухолевых трансплантатов (Николин,

**Таблица 1.** Тестирование способности функционально различных классов РНК печени крыс менять антигенные свойства клеток опухоли Кребс-2, прививаемых внутримышечно мышам, иммунизированным гомогенатом крысиной печени (из: Николин и др., 1992)

**Table 1.** Testing of functionally different classes of rat liver RNA for the ability to change the antigenic properties of Krebs-2 tumor cells inoculated intramuscularly to mice immunized with rat liver homogenate (Nikolin et al., 1992)

Группа	n	Иммунизация	Прививка	Средняя масса опухоли, мг	% торможения роста опухоли
1	20	–	ОК	620 ± 50	–
2	10	–	ОК + тРНК	710 ± 70	–
3	10	–	ОК + поли-А	570 ± 70	8.1
4	20	–	ОК + поли(А) <sup>+</sup> мРНК	580 ± 40	6.5
5	20	+	ОК	580 ± 40	6.5
6	10	+	ОК + тРНК	610 ± 70	–
7	10	+	ОК + поли-А	630 ± 90	–
8	20	+	ОК + поли(А) <sup>+</sup> мРНК	380 ± 40*	38.7
1	10	–	ОК	460 ± 55	–
2	9	–	ОК + рРНК	578 ± 40	–
3	10	–	ОК + поли(А) <sup>+</sup> мРНК	420 ± 33	–
4	10	+	ОК	420 ± 62	–
5	10	+	ОК + рРНК	560 ± 54	–
6	10	+	ОК + поли(А) <sup>+</sup> мРНК	190 ± 48*	58.7

Примечание. Опухолевые клетки (ОК) инкубировали в среде Игла с одним из препаратов 1 ч при 4 °С и 30 мин при 37 °С. Концентрация РНК в инкубационной смеси составила 10 мкг/мл. \* Различия с контролем статистически достоверны ( $p < 0.01$ )

**Таблица 2.** Цитотоксическая активность антисывороток, абсорбированных ОК или МОК, в отношении опухолевых клеток и клеток лимфоузлов крысы (из: Николин и др., 1994)

**Table 2.** Cytotoxic activity of antisera absorbed by TC or MTC against tumor cells and lymph node cells of rats (Nikolin et al., 1994)

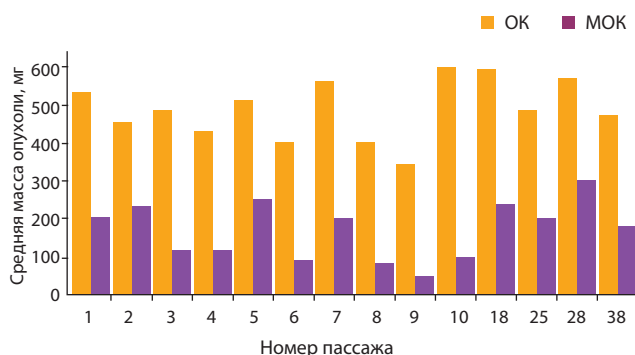
Антисыворотка	Цитотоксический индекс, %		
	Клетки лимфоузлов крысы	МОК	ОК
Анти-ОК	0	80 ± 6.8	83 ± 5.1
Анти-МОК, абсорбированная ОК	27 ± 2.0	47 ± 2.6	0
Анти-Wistar, абсорбированная ОК	88 ± 0.4	49 ± 3.1	0
Анти-Wistar, абсорбированная МОК	53 ± 3.8	0	0

Примечание. ОК – немодифицированные опухолевые клетки; МОК – опухолевые клетки, модифицированные поли-(А)<sup>+</sup>мРНК

1980; Николин и др., 1984). Подобная иммунизация носила специфический характер: не влияла на рост опухоли, не подвергавшейся воздействию РНК или обработанной РНК из ткани, отличающейся по генотипу от иммунизирующего материала. РНКазы, в отличие от проназы, отменяла эффект препарата. Поскольку препараты освобождались от низкополимерных РНК (см. Материалы и методы), действие некодирующих РНК исключается. Тестирование трех функционально различных классов РНК (поли(А)<sup>+</sup>мРНК, тРНК, рРНК), полученных из печени крыс Wistar, показало, что иммунизация мышей гомогенатом крысиной печени эффективна только в отношении опухолевых клеток, инкубированных с поли(А)<sup>+</sup>мРНК (табл. 1).

Специфический характер иммунизации, вызывающей повышение резистентности животных к обработанным РНК опухолевым клеткам, свидетельствует об экспрес-

сии на них крысиных антигенных структур, индуцируемых поли-(А)<sup>+</sup>мРНК. В настоящее время неоднократно показано и не вызывает сомнений, что мРНК при локальном применении приводят к экспрессии кодируемых пептидов в клетках различных тканей (Weide et al., 2008; Van der Jeught et al., 2015; Van Hoescke et al., 2021). В свете этих данных представляется вероятным, что экспрессия на мышинных опухолевых клетках крысиных антигенов служит результатом трансляции поли-(А)<sup>+</sup>мРНК, которая интернализуется в опухолевые клетки при инкубации. Однако в работе не исследована трансляция крысиной поли-(А)<sup>+</sup>мРНК в мышинных опухолевых клетках, как и не изучен характер крысиных антигенных детерминант. Однако присутствие крысиных антигенных детерминант на модифицированных поли-(А)<sup>+</sup>мРНК опухолевых клетках определено в цитотоксическом тесте с мышинной антисывороткой, полученной в результате имму-

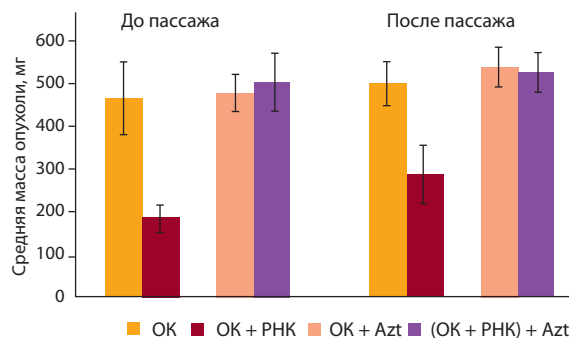


**Рис. 1.** Средняя масса внутримышечных трансплантатов опухоли Krebs-2 через 12 сут после прививки ОК или МОК разных пассажей (из: Николин и др., 1994)

**Fig. 1.** Average mass of intramuscular tumor Krebs-2 transplants 12 days after inoculation with TC or MTC of different passages (Nikolin et al., 1994)

низации мышей клетками лимфоузлов крыс Wistar. После абсорбции немодифицированными опухолевыми клетками мышиная антисыворотка проявляла значительную активность в отношении клеток лимфоузлов крыс Wistar, вызывая комплемент-зависимый лизис до 88 % клеток, а также в отношении модифицированных клеток (цитотоксический индекс 40–50 %), но не реагировала с опухолевыми клетками. В то же время абсорбция антисыворотки модифицированными клетками приводила к заметному снижению цитотоксического эффекта в отношении клеток лимфоузлов и полностью отменяла его в отношении модифицированных поли-(A)<sup>+</sup>мРНК опухолевых клеток (табл. 2).

Таким образом, крысиная поли-(A)<sup>+</sup>мРНК индуцирует на мышинных опухолевых клетках экспрессию антигенных структур, которые в норме в них не экспрессируются, но являются стандартными компонентами поверхностной мембраны клеток крысы. Это не противоречит современным данным об экспрессии в клетках пептидов, кодируемых мРНК при ее непосредственном взаимодействии с клетками. Неожиданно, что наличие на МОК крысиных антигенных структур регистрировали по данным цитотоксического теста не менее чем после 70 клеточных генераций (Николин и др., 1994). Аналогичный вывод можно сделать на основании результатов параллельных экспериментов, в которых исследовано влияние индуцированных поли-(A)<sup>+</sup>мРНК изменений в клетках опухоли Krebs-2 на их рост при внутримышечной трансплантации мышам линии СВА. Используемая в экспериментах концентрация поли-(A)<sup>+</sup>мРНК 20 мкг/мл приводила к торможению роста опухоли без предварительной иммунизации (рис. 1). При этом торможение роста опухоли наблюдали и при ее прививке модифицированными опухолевыми клетками после 38-го внутрибрюшинного пассажа на иммунодепрессированных циклофосфаном мышах. У мышей, которым для подавления иммунитета за 48 ч до прививки вводили циклофосфан (200 мг/кг), модифицированные опухолевые клетки росли так же, как немодифицированные, из чего следует, что поли-(A)<sup>+</sup>мРНК не влияла на пролиферативные потенции опухолевых клеток и наблюдаемое торможение роста, очевидно, обусловлено иммунологической реакцией ре-



**Рис. 2.** Влияние Azt на антиген-модифицирующее действие поли-(A)<sup>+</sup>мРНК (из: Николин и др., 1994)

**Fig. 2.** The influence of Azt on the antigen-modifying effect of poly-(A)<sup>+</sup>mRNA (Nikolin et al., 1994)

ципиента. Таким образом, согласно представленным результатам цитотоксического и трансплантационного тестов, индуцированные поли-(A)<sup>+</sup>мРНК изменения в антигенной структуре опухолевых клеток сохраняются на протяжении многих клеточных генераций.

О сохранении новых биосинтетических особенностей у потомков клеток, обработанных РНК, сообщалось ранее в отдельных работах (Копылова-Свиридова и др., 1964; Ершов и др., 1976). Так, показано, что после обработки клеток опухоли L-1210 мРНК из клеток курицы, продуцирующих интерферон, опухолевые клетки становились продуцентами «куриного» интерферона, что, по мнению авторов, является результатом интеграции гена интерферона в геном чужеродного хозяина (Ершов и др., 1976). Подобное предположение также высказал А.В. Смирнов (1988) при обсуждении специфической функции и механизмов действия экзогенной РНК.

Возможно, информация, внесенная в клетки мРНК, закрепляется на генетическом уровне путем встраивания в геном обратного транскрипта. Для оценки такой возможности исследовано влияние ингибитора обратной транскрипции Azt (3'-Azido-3'-deoxythymidine, "Aldrich") на эффект, вызываемый в опухолевых клетках поли-(A)<sup>+</sup>мРНК. Известно, что Azt проникает в эукариотические клетки и эффективно подавляет в них размножение ретровирусов, использующих в своей репликации обратную транскриптазу (Nakashima et al., 1986; Ruprecht et al., 1986). Предполагалось, что если для проявления эффекта поли-(A)<sup>+</sup>мРНК необходима обратная транскрипция, то Azt должен приводить к отмене эффекта. Для этого Azt в концентрации 20 мкМ вносили в суспензию клеток опухоли Krebs-2, отмытых после инкубации с поли-(A)<sup>+</sup>мРНК, и инкубировали еще 15 мин при 37 °С. Модифицирующее действие поли-(A)<sup>+</sup>мРНК, проявляющееся в значительном торможении роста внутримышечных трансплантатов опухоли, при воздействии Azt полностью отменялось (рис. 2). Признаки антигенной модификации отсутствовали и в следующих генерациях опухолевых клеток после их внутрибрюшинного пассажа на иммунодепрессированных циклофосфаном мышах. Это означает, что Azt не влияет на фенотипические проявления индуцированных

изменений – его блокирующее действие, очевидно, связано с нарушением начальных процессов, инициируемых в клетках экзогенной поли-(A)<sup>+</sup>мРНК.

Приведенные данные свидетельствуют об участии обратной транскрипции в амплификации эффекта поли-(A)<sup>+</sup>мРНК. Известно, что в опухолевых клетках млекопитающих источником обратной транскриптазы являются полноразмерные элементы *LINE-1*, кодирующие собственный фермент обратную транскриптазу (Rosser et al., 2012; Sciamanna et al., 2013). Эта обратная транскриптаза инициирует обратную транскрипцию мРНК ретроэлементов, образуя гибриды РНК:ДНК. *LINE-1* хорошо экспрессируются в раковых клетках и слабо – в нормальных (Sciamanna et al., 2013). Вероятно, интернализация в опухолевые клетки поли-(A)<sup>+</sup>мРНК служит сигналом для ее обратной транскрипции в кДНК, которая, встраиваясь в геном, передается следующим поколениям опухолевых клеток. Это предположение в определенной степени умозрительно, но факт, свидетельствующий об обратной транскрипции гетерологичной поли-(A)<sup>+</sup>мРНК в опухолевых клетках, нуждается в исследовании конкретных механизмов этого процесса вследствие возможного существенного общебиологического значения, а также в связи с расширением экспериментальной сферы применения мРНК при различных заболеваниях.

#### Изменение резистентности облученных мышей к трансплантируемым кроветворным клеткам, модифицированным препаратами РНК

С помощью препаратов высокополимерной РНК, обладающей способностью вызывать специфические изменения в антигенной структуре опухолевых клеток, исследована принципиальная возможность регуляции резистентности реципиента к трансплантируемым кроветворным клеткам путем их направленной антигенной модификации (Николин и др., 2000). Для сохранения резистентности к аллотрансплантатам костного мозга (КМ) мышей облучали не абсолютно летальными дозами.

В табл. 3 приведены результаты трансплантации мышам линий А/Не и СС57ВR клеток сингенного КМ, подвергавшихся воздействию РНК из печени мышей той же линии, что и реципиент (сингенная РНК), или другой линии (аллогенная РНК).

Обработка клеток сингенного КМ сингенной РНК не влияет на их способность защищать животных от радиационной гибели, о чем можно судить по 7–90-дневной выживаемости мышей. В отличие от этого клетки, обработанные аллогенной РНК, не проявляют защитного эффекта. Это значит, что кроветворные клетки, обработанные аллогенной РНК, подвергаются инактивации в сингеном реципиенте. Аллотрансплантация КМ мышам, облученным в среднелетальной дозе, также неэффективна вследствие сохранения у реципиентов резистентности к аллогенным гемопоэтическим стволовым клеткам и их отторжения (Masouridi-Levrat et al., 2016). Приживление клеток аллогенного КМ, судя по защитному эффекту, отмечено только в случае их инкубации с РНК мышей линии-реципиента. Для приживления клеток интактного аллогенного КМ, обеспечивающего сходную 30-дневную выживаемость, требовалась абсолютно летальная доза облучения реципиентов (7.4 Гр), при этом все мыши, пере-

жившие «острый» период, к 60-м сут погибали с признаками хронической реакции «трансплантат против хозяина».

Результаты, свидетельствующие о снижении резистентности реципиентов к аллогенным клеткам КМ, обработанным реципиентской РНК, также получены в другой аллогенной комбинации СЗН (Н-2к) → BALB/с (Н-2d), а также при трансплантации мышам крысиного КМ (Николин и др., 2000).

Предполагается, что изменение антигенного фенотипа трансплантируемых гемопоэтических стволовых клеток – экспрессии антигенов линии-донора РНК – оказывает специфическое влияние как на эффективность их взаимодействия с кроветворным микроокружением хозяина, так и эффекторную функцию клеток резистентности (Галактионов, Горбачева, 1980).

#### Влияние препарата ксеногенной РНК на резистентность мышей к спонтанной опухоли

Способность РНК менять антигенные свойства опухолевых клеток указывает на возможность повышения противоопухолевой резистентности мышей в механизме влияния препаратов РНК на рост спонтанной опухоли. Для исследования этой возможности использованы мыши высокоразовой линии СЗН/Не со спонтанными опухолями молочной железы. Иммунизирующим материалом служила гепатома ГА-1, клетки которой для индукции в них ксеноантигенов инкубировали с РНК печени крупного рогатого скота. Эта опухоль линейноспецифическая и не растет на мышах СЗН/Не. Она слабо иммуногенна, но в то же время иммунизация модифицированными РНК клетками этой опухоли индуцировала у сингенных мышей резистентность к последующей ее прививке аналогичным образом модифицированными клетками (Николин, 1980).

В рассматриваемом эксперименте у мышей-самок спонтанно возникшие опухоли, достигшие 8 мм в диаметре, удаляли и всех оперированных мышей распределяли по группам. В день операции двум группам мышей подкожно с целью иммунизации инокулировали по 200 мкл 40 % взвеси клеток аллогенной опухоли ГА-1, предварительно инкубированной с суммарным препаратом РНК из печени крупного рогатого скота. Спустя 7 дней одной группе мышей ежедневно в течение 10 дней внутрибрюшинно вводили по 10 мг препарата РНК в 500 мкл физиологического раствора, другой группе – только физиологический раствор. В табл. 4 представлены результаты эксперимента через 50 дней после его начала.

Достоверное снижение частоты появления вторичных опухолей и существенное торможение их роста (63.6 %) происходило только в случае, если инъекциям препарата РНК предшествовала «иммунизация» модифицированными РНК клетками гепатомы (см. табл. 4). По аналогии с результатами, полученными при инкубации опухолевых клеток с поли-(A)<sup>+</sup>мРНК, можно предположить, что препараты РНК при их внутрибрюшинном введении также способны менять антигенные свойства клеток спонтанной опухоли в условиях ее естественного возникновения и роста. Однако для этого мРНК должна накапливаться в опухолевой ткани. Как это происходит на самом деле, неизвестно. Возможно, при создании высокой концентрации молекул мРНК в орга-

**Таблица 3.** Выживаемость облученных мышей после трансплантации сингенного или аллогенного КМ, обработанного препаратами сингенной или аллогенной РНК (по: Николин и др., 2000)**Table 3.** Survival of irradiated mice after transplantation of syngenic or allogeneic BM treated with syngenic or allogeneic RNA preparations (Nikolin et al., 2000)

Линия мышей, доза облучения	Группа	Трансплантация	Число мышей	Выживаемость по дням, %					
				7	14	21	30	60	90
A/He, 5.4 Гр.	1	–	19	74	42	32	16	16	16
	2	КМ A/He	19	100	89	84	79	68	68
	3	КМ A/He + РНК A/He	20	100	90	80	70	60	60
	4	КМ A/He + РНК C57BR	20	75	40	30	25*	20*	20
CC57BR, 7.9 Гр.	1	–	20	85	20	20	20	20	20
	2	КМ CC57BR	20	100	90	70	70	70	70
	3	КМ + РНК CC57BR	20	100	100	80	80	80	80
	4	КМ + РНК A/He	20	75	50	50	25*	25*	25*
A/He, 4.7 Гр.	1	–	63	100	61	54	54	54	54
	2	КМ CC57BR	69	99	69	51	51	51	47
	3	КМCC57BR + РНК CC57BR	20	95	60	60	50	50	50
	4	КМ CC57BR + РНК A/He	20	100	100	100	95**	90	90*
A/He, 7.4 Гр	1	–	10	10	70	0			
	2	КМ CC57BR	10	10	100	100	100	90	0

Примечание. КМ + РНК – клетки КМ, инкубированные с РНК печени соответствующей линии мышей. Мышей-реципиентов облучали X-лучами на RUP-150/300-10-1 при мощности дозы 0.47 Гр/мин. Статистически достоверные различия между группами 4–2: \*  $p < 0.01$ ; \*\*  $p < 0.001$

**Таблица 4.** Влияние иммунизации модифицированными клетками GA-1 на возникновение и рост вторичных опухолевых узлов у мышей C3H/He после удаления спонтанных опухолей и введения препарата гетерологичной РНК (из: Николин и др., 1974)**Table 4.** Effect of immunization with modified GA-1 cells on the occurrence and growth of secondary tumor nodes in C3H/He mice after removal of spontaneous tumors and administration of a heterologous RNA preparation (Nikolin et al., 1974)

Группа	Иммунизация	Воздействие	Возникновение опухолей		Средний вес опухолей, г
			число мышей	%	
1	–	Физраствор	37/40	92.5	1.1 ± 0.18
2	–	РНК	14/16	87.5	1.8 ± 0.45
3	GA + РНК	Физраствор	9/11	81.8	1.0 ± 0.22
4	GA + РНК	РНК	9/16*	56.2	0.4 ± 0.14**

Примечание. GA + РНК – клетки опухоли GA-1, инкубированные с РНК. Концентрация препарата РНК в инкубационной смеси составляла 5 мг/мл. Достоверность различий с контролем: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.001$

низме часть из них в ассоциации с белком или липопротеином может избежать ферментативного разрушения (Rukova et al., 1994; Pös et al., 2018) и захватываться опухолевыми клетками в биологически активной форме. С другой стороны, при внутрибрюшинном введении гетерологичной РНК основная ее часть (в том числе мРНК) депонируется в печени, как это показано для мРНК при ее системном введении в составе липидных наночастиц (Zhu et al., 2019). При этом в основном в печени происходит и трансляция вводимой мРНК (Pardi et al., 2015). Кроме того, как следует из данных работы М. Mauderi и коллег (2019), клетки, которые эндоцитировали мРНК, секретируют внеклеточные пузырьки (экзосомы), содержащие мРНК, что может служить механизмом доставки мРНК между клетками. В настоящее время известными естественными носителями РНК являются экзосомы,

которые не только защищают РНК от деградации, но и могут доставлять ее в клетки-мишени (Valadi et al., 2007). Можно предположить, что вводимая парентерально мРНК мышам со спонтанной опухолью доставляется в опухолевую ткань в ассоциации с экзосомами, секретируемыми клетками печени. Также не исключено наличие факторов, участвующих в доставке РНК в определенные ткани. Так, антимикробный пептид LL37 может связываться с РНК, высвобождаемой из клеток, защищать ее от внеклеточной деградации и транспортировать в эндосомальные компартменты дендритных клеток (Ganguly et al., 2009). Однако все эти предположения, а также возможность изменения антигенных свойств клеток спонтанной опухоли при внутрибрюшинном введении препаратов РНК нуждаются в экспериментальном подтверждении. Вместе с тем независимо от механизмов наблюдаемого

эффекта следует признать, что в рассматриваемом эксперименте впервые показана возможность эффективной иммунотерапии спонтанной опухоли с использованием ксеногенной РНК.

### Заключение

Инкубация клеток мышинной опухоли с поли-(А)<sup>+</sup>мРНК печени крыс значительно повышает их иммуногенность, что, согласно результатам цитотоксического и трансплантационного тестов, связано с появлением в опухолевых клетках крысиных антигенных структур, способных стимулировать противоопухолевую активность иммунной системы. В результате в эксперименте на мышах высококораквой линии впервые продемонстрирована возможность эффективной иммунотерапии спонтанной опухоли с использованием ксеногенной РНК. Хотя в работах нет прямых доказательств того, что экспрессия в опухолевых клетках чужеродных антигенов представляет собой результат трансляции мРНК, повышение иммуногенности клеток опухоли указывает на возможность использования ксеногенной мРНК как одного из вариантов противоопухолевой иммунотерапии.

Вместе с тем изменения в антигенной структуре опухолевых клеток, индуцированные поли-(А)<sup>+</sup>мРНК, могут сохраняться на протяжении многих клеточных генераций, что связано с обратной транскрипцией поли-(А)<sup>+</sup>мРНК, детерминирующей в клетках синтез ксеноантигена. Этот факт является важным с общепроцессуальной точки зрения, но в то же время указывает на возможность инсерционного мутагенеза ограничивать клиническое применение указанной мРНК. Дальнейшее исследование этого вопроса поможет выяснить, в каких клетках происходит обратная транскрипция экзогенной мРНК – только в опухолевых или и в нормальных.

Другой важной, но неисследованной особенностью экзогенной высокополимерной РНК служит ее модулирующее влияние на приживание у облученных мышей трансплантатов костного мозга. Показано, что в зависимости от источника используемой РНК можно индуцировать резистентность реципиентов к сингенным либо, наоборот, снизить резистентность к алло- или ксеногенным клеткам костного мозга. По-видимому, эта зависимость согласуется со способностью РНК вызывать специфические изменения в антигенной структуре гемопоэтических стволовых клеток – появление антигенов, свойственных донору РНК. Такие изменения в трансплантируемых гемопоэтических стволовых клетках могут оказывать специфическое влияние как на эффективность их взаимодействия с кроветворным микроокружением хозяина, так и эффекторную функцию клеток резистентности.

Приведенные в настоящей обзорной статье результаты дают основание полагать, что исследование естественных РНК с применением современных биотехнологий позволит выявить их новые функциональные особенности и наиболее эффективные пути создания лекарственных препаратов на основе РНК.

### Список литературы / References

Беляев Д.К., Мартынова Р.П., Матиенко Н.А., Роничевская Г.М., Салганик Р.И. Влияние парентерального введения рибонуклеопротеидов из тканей мышей низкоракковой и высококораквой линии на

спонтанные опухоли молочной железы мышей высококораквых линий А и СЗН. Докл. АН СССР. 1966;169(3):728-730.

- [Beliaev D.K., Martynova R.P., Matienko N.A., Ronichevskaja G.M., Salganik R.I. Effect of parenteral administration of ribonucleoproteins from tissues of low-cancerous and high-cancerous mice strains on spontaneous mammary gland neoplasms in mice of the high-cancerous strains A and СЗН. *Doklady Akademii Nauk SSSR = Proceedings of the USSR Academy of Sciences*. 1966;169(3):728-730. (in Russian)]
- Галактионов В.Г., Горбачева Л.Д. Преодоление несингенных отношений между взаимодействующими клетками лимфо-миелоидного комплекса с помощью аллогенной РНК. *Журнал общей биологии*. 1980;41(4):532-546.
- [Galaktionov V.G., Gorbacheva L.D. Overcoming nonsyngenic relations among interacting lympho-myeloid complex cells by using "allogenic" RNA. *Zhurnal Obshchey Biologii*. 1980;41(4):532-546. (in Russian)]
- Ершов Ф.И., Тазулахова Е.Б., Соколова Т.М., Кадирова А.А., Новохатский А.С. Выделение мРНК для интерферона и ее интеграция в геном чужеродного хозяина. *Вопросы вирусологии*. 1976;6:707-713.
- [Ershov F.I., Tazulakhova E.B., Sokolova T.M., Kadyrova A.A., Novokhatskii A.S. Isolation of the mRNA for interferon and its integration into the genome of a foreign host. *Voprosy Virusologii = Problems of Virology*. 1976;6:707-713. (in Russian)]
- Ильдуганова Н.А., Блинова Н.Н., Мертвецов Н.П. Выделение матричной РНК из полирибосом из печени крыс путем аффинной хроматографии на поли-У-сефарозе 4В. *Известия СО АН СССР. Серия химических наук*. 1977;3(15):72-80.
- [Ilduganova N.A., Blinova N.N., Mertvetsov N.P. Isolation of matrix RNA from polyribosomes from the liver of rats by affine chromatography on poly-U-sepharosis 4B. *Izvestiya SO AN SSSR. Seriya Khimicheskikh Nauk*. 1977;3(15):72-80. (in Russian)]
- Копылова-Свиридова Т.Н., Немчинская В.Л., Фель В.Я., Оленов Ю.М. Синтез органоспецифического антигена печени клетками переливаемой крысиной лимфосаркомы под влиянием РНК, выделенной из печени крыс. *Цитология*. 1964;6(4):501-504.
- [Kopylova-Sviridova T.N., Nemchinskaja V.L., Fel V.I.a., Olenov Iu.M. The synthesis of organ-specific liver antigens by rat transplantable lymphosarcoma cells under the influence of at liver RNA. *Tsitologiya*. 1964;6(4):501-504. (in Russian)]
- Матиенко Н.А., Роничевская Г.М., Мартынова Р.П., Беляев Д.К., Салганик Р.И. Влияние различных препаратов гетерологичной РНК на рост спонтанных опухолей молочных желез у мышей линий А и СЗН. *Известия СО АН СССР. Серия биологических наук*. 1970;1(5):102-108.
- [Matienko N.A., Ronichevskaja G.M., Martynova R.P., Beliaev D.K., Salganik R.I. Effect of various heterologous RNA preparations on the growth of spontaneous tumors breast in mice of lines A and СЗН. *Izvestiya SO AN SSSR. Seriya Biologicheskikh Nauk*. 1970;1(5):102-108. (in Russian)]
- Николин В.П. Влияние препарата гетерологичной РНК на антигенные свойства опухолевых клеток. В: Гетерогенизация опухолей. Рига: Зинатне, 1980;118-125.
- [Nikolin V. Effect of heterologous RNA preparation upon antigenic properties of tumor cells. In: *Heterogenization of tumors*. Riga: Zinatne, 1980;118-125. (in Russian)]
- Николин В.П., Ильницкая С.И., Вишневский С.Н., Мертвецов Н.П. Влияние экзогенной poly(A)<sup>+</sup> мРНК на антигенные свойства и рост клеток опухоли Кребс-2. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1992;113(3):301-303.
- [Nikolin V.P., Il'nitskaia S.I., Vishnivetskii S.N., Mertvetsov N.P. Effects of exogenous poly(A)<sup>+</sup> mRNA on antigenic properties and growth of Krebs-2 tumor cells. *Byulleten' Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1992;113(3):301-303. (in Russian)]
- Николин В.П., Ильницкая С.И., Груntenko Е.В., Томсон В.П. Появление новых трансплантационных антигенов в опухолевых клетках, обработанных препаратами РНК. *Экспериментальная онкология*. 1984;6(1):42-47.
- [Nikolin V.P., Il'nitskaia S.I., Gruntenko E.V., Tomsons V.P. Appearance of new transplantation antigens in tumor cells treated with RNA. *Eksperimental'naya Onkologiya = Experimental Oncology*. 1984;6(1):42-47. (in Russian)]
- Николин В.П., Ильницкая С.И., Попова Н.А., Каракин Е.И. Резистентность тотально облученных мышей к трансплантированным

- кроветворным клеткам, модифицированным РНК. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2000;129(6):672-676. DOI 10.1007/BF02434880.
- [Nikolin V.P., Il'inskaya S.I., Popova N.A., Karakin E.I. Resistance of mice exposed to whole-body irradiation to transplanted hemopoietic cells modified with RNA. *Byulleten' Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2000;129(6):672-676. DOI 10.1007/BF02434880. (in Russian)]
- Николин В.П., Ильницкая С.И., Попова Н.А., Мертвецов Н.П. Индукция наследуемых изменений в антигенной структуре опухолевых клеток экзогенной поли-(А)<sup>+</sup>мРНК. *Экспериментальная онкология*. 1994;16:335-341.
- [Nikolin V.P., Il'inskaya S.I., Popova N.A., Mertvetsov N.P. Induction of heritable alterations in the antigenic structure of tumor cells by exogenous poly-(A)<sup>+</sup>mRNA. *Eksperimental'naya Onkologiya = Experimental Oncology*. 1994;16:335-341. (in Russian)]
- Николин В.П., Матиенко Н.А., Беляев Д.К. Влияние препарата РНК на иммунитет к спонтанной опухоли у мышей линии СЗН/He. *Докл. АН СССР*. 1974;215(3):718-720.
- [Nikolin V.P., Matienko N.A., Beliaev D.K. Effect of an RNA preparation on immunity to spontaneous tumors in СЗН-He mice. *Doklady Akademii Nauk SSSR = Proceedings of the USSR Academy of Sciences*. 1974;215(3):718-720. (in Russian)]
- Николин В.П., Томсон В.П., Веревкина К.Н., Беляев Д.К. Высокополимерная ксеногенная РНК как стимулятор противоопухолевого иммунитета. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1980;90(8):199-201.
- [Nikolin V.P., Tomsons V.P., Verevkin K.N., Beliaev D.K. High-polymeric xenogenic RNA as an antitumor immunity stimulator. *Byulleten' eksperimental'noy Biologii i Meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1980;90(8):199-201. (in Russian)]
- Смирнов А.В. Специфические эффекты и возможные механизмы действия экзогенных РНК. *Успехи современной биологии*. 1988;106(4):20-36.
- [Smirnov A.V. Specific effects and possible mechanisms of action of exogenous RNA. *Uspekhi Sovremennoy Biologii*. 1988;106(4):20-36. (in Russian)]
- Федянина Л.Н., Беседнова Н.Н., Эпштейн Л.М., Каленик Т.К., Блинов Ю.Г. Лекарственные препараты и биологически активные добавки к пище на основе нуклеиновых кислот различного происхождения. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2007;4:9-12.
- [Fedyanina L.N., Besednova N.N., Epstein L.M., Kalenik T.K., Blinov Yu.G. Various nucleic acids-containing drugs and dietary supplements. *Pacific Medical Journal*. 2007;4:9-12. (in Russian)]
- Amos H., Kearns K.E. Synthesis of 'bacterial' protein by cultured chick cells. *Nature*. 1962;25(195):806-88. DOI 10.1038/195806a0.
- Ganguly D., Chamilo G., Lande R., Gregorio J., Meller S., Facchinetti V., Homey B., Barrat F.J., Zal T., Gilliet M. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J. Exp. Med.* 2009;206(9):1983-1994. DOI 10.1084/jem.20090480.
- Gorer P.A., O'Gorman P. The cytotoxic activity of isoantibodies in mice. *Transpl. Bull.* 1956;3(14):142-143.
- Kariko K., Muramatsu H., Welsh F.A., Ludwig J., Kato H., Akira S., Weissman D. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol. Ther.* 2008;16:1833-1840. DOI 10.1038/mt.2008.200.
- Kirby K.S. A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. *Biochem. J.* 1956;64(3):405-408. DOI 10.1042/bj0640405.
- Masouridi-Levrat S., Simonetta F., Chalandon Y. Immunological basis of bone marrow failure after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Front. Immunol.* 2016;7:362. DOI 10.3389/fimmu.2016.00362.
- Maugeri M., Nawaz M., Papadimitriou A., Angerfors A., Camponeschi A., Na M., Hölttä M., Skantze P., Johansson S., Sundqvist M., Lindquist J., Kjellman T., Mårtensson I.L., Jin T., Sunnerhagen P., Östman S., Lindfors L., Valadi H. Linkage between endosomal escape of LNP-mRNA and loading into EVs for transport to other cells. *Nat. Commun.* 2019;10:4333-4348. DOI 10.1038/s41467-019-12275-6.
- Miao L., Zhang Y., Huang L. mRNA vaccine for cancer immunotherapy. *Mol. Cancer*. 2021;20:41-64. DOI 10.1186/s12943-021-01335-5.
- Nakashima H., Matsui T., Harada S., Kobayashi N., Matsuda A., Ueda T., Yamamoto N. Inhibition of replication and cytopathic effect of human T cell lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus by 3'-azido-3'-deoxythymidine *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1986;30(6):933-937. DOI 10.1128/AAC.30.6.933.
- Niu M.C., Cordova C.C., Niu L.C., Radbill C.L. Rna-induced biosynthesis of specific enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1962;48(11):1964-1969. DOI 10.1073/pnas.48.11.1964.
- Pardi N., Tuyishime S., Muramatsu H., Kariko K., Mui B.L., Tam Y.K., Madden T.D., Hope M.J., Weissman D. Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. *J. Control Release*. 2015;217:345-351. DOI 10.1016/j.jconrel.2015.08.007.
- Pös O., Biró O., Szemes T., Nagy B. Circulating cell-free nucleic acids: characteristics and applications. *Eur. J. Hum. Genet.* 2018;26(7):937-945. DOI 10.1038/s41431-018-0132-4.
- Rosser J.M., An W. L1 expression and regulation in humans and rodents. *Front. Biosci. (Elite Ed.)*. 2012;4(6):2203-2225. DOI 10.2741/537.
- Ruprecht R.M., O'Brien L.G., Rossoni L.D., Nusinoff-Lehrman S. Suppression of mouse viraemia and retroviral disease by 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Nature*. 1986;323(6087):467-469. DOI 10.1038/323467a0.
- Rykova E.Y., Pautova L.V., Yakubov L.A., Karamishev V.N., Vlassov V.V. Serum immunoglobulins interact with oligonucleotides. *FEBS Lett.* 1994;344:96-98. DOI 10.1016/0014-5793(94)00360-2.
- Sciamanna I., Gualtieri A., Cossetti C., Osimo E.F., Ferracin M., Macchia G., Aricò E., Prosseda G., Vitullo P., Misteli T., Spadafora C. A tumor-promoting mechanism mediated by retrotransposon encoded reverse transcriptase is active in human transformed cell lines. *Oncotarget*. 2013;4(12):2270-2287. DOI 10.18632/oncotarget.1403.
- Tuohimaa P., Segal S.J., Koide S.S. Induction of avidin synthesis by RNA obtained from chick oviduct. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1972;69(10):2814-2817. DOI 10.1073/pnas.69.10.2814.
- Valadi H., Ekström K., Bossios A., Sjöstrand M., Lee James J., Lötvall J.O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell. Biol.* 2007;9(6):654-659. DOI 10.1038/ncb1596.
- Van der Jeught K., Van Lint S., Thielemans K., Breckpot K. Intratumoral delivery of mRNA: Overcoming obstacles for effective immunotherapy. *Oncimmunology*. 2015;4(5):e1005504. DOI 10.1080/2162402X.2015.1005504.
- Van Hoecke L., Verbeke R., Dewitte H., Lentacker I., Vermaelen K., Breckpot K., Van Lint S. mRNA in cancer immunotherapy: beyond a source of antigen. *Mol. Cancer*. 2021;20(1):48. DOI 10.1186/s12943-021-01329-3.
- Weide B., Carralot J.P., Reese A., Scheel B., Kurt E.T., Hoerr I., Ramnensee H.G., Garbe C., Pascolo S. Results of the first phase I/II clinical vaccination trial with direct injection of mRNA. *J. Immunother.* 2008;31(2):180-188. DOI 10.1097/CJI.0b013e31815ce501.
- Wolff J.A., Malone R.W., Williams P., Chong W., Acsadi G., Jani A., Felgner P.L. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science*. 1990;247(4949 Pt. 1):1465-1468. DOI 10.1126/science.1690918.
- Xiong Q., Lee G.Y., Ding J., Li W., Shi J. Biomedical applications of mRNA nanomedicine. *Nano Res.* 2018;11(10):5281-5309. DOI 10.1007/s12274-018-2146-1.
- Zhu X., Yin L., Theisen M., Zhuo J., Siddiqui S., Levy B., Presnyak V., Frassetto A., Milton J., Salerno T., Benenato K.E., Milano J., Lynn A., Sabnis S., Burke K., Besin G., Lukacs C.M., Guey L.T., Finn P.F., Martini P.G.V. Systemic mRNA therapy for the treatment of fabry disease: preclinical studies in wild-type mice, fabry mouse model, and wild-type non-human primates. *Am. J. Hum. Genet.* 2019;104:625-637. DOI 10.1016/j.ajhg.2019.02.003.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 23.03.2022. После доработки 04.05.2022. Принята к публикации 06.05.2022.