

И. А. Кадырова¹, А. Ж. Орынбасар^{1*}, Д. А. Солянов¹, А. Р. Алина², А. А. Мурзабаев³

ВЛИЯНИЕ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ IFN- γ , IL-4, TLR4, TLR7 В МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТКАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

¹Научно-исследовательская лаборатория, НАО «Карагандинский медицинский университет» (100008, Республика Казахстан, г. Караганда, ул. Гоголя 40; e-mail: info@qmu.kz)

²Кафедра внутренних болезней, НАО «Карагандинский медицинский университет» (100008, Республика Казахстан, г. Караганда, ул. Гоголя 40; e-mail: info@qmu.kz)

³Отделение ревматологии, КГП Областная клиническая больница (100000, Республика Казахстан, г. Караганда, ул. Ерубаева, 43; e-mail: okb@okbkar.kz)

*Айнұр Жаркынбекқызы Орынбасар – НАО «Медицинский Университет Караганды»; 100008, Республика Казахстан, г. Караганда, ул. Гоголя, 40; e-mail: ainurorynbassar@gmail.com

Цель. Определение влияния малых интерферирующих РНК на экспрессию генов иммунного ответа в мононуклеарных клетках периферической крови у пациентов с ревматоидным артритом.

Материалы и методы. методом центрифугирования в градиенте плотности были получены мононуклеарные клетки периферической крови у пациентов с ревматоидным артритом. Введение миРНК (Silencer® Pre-designed siRNA, Ambion, by Life Technologies, USA) в мононуклеарные клетки периферической крови осуществлялось методом трансфекции с использованием коммерческих реагентов (липофектамин). Оценка экспрессии генов методом полимеразной цепной реакции в реальном времени ($\Delta\Delta C_t$, $\log_2$ Fold Change) осуществлялась через 48 ч после нокдауна гена. Экспрессия GAPDH оценивалась в качестве эндогенного контроля. Статистическая обработка включала в себя непараметрический U-критерий Манна – Уитни ($p=0,05$).

Результаты и обсуждение. Результаты показали, что проведенная трансфекция полученных мононуклеарных клеток из периферической крови специфическими миРНК, направленными на гены IFN- γ , IL-4, TLR4 и TLR7, снизила экспрессию TLR4 на 43,9% (p -value=0.0286), экспрессию TLR7 – на 38,4% (p -value=0.0211).

Заключение. Проведенное исследование подтвердило релевантность использования мононуклеарных клеток периферической крови как *in vitro* модели для изучения молекулярных механизмов, показав возможность воспроизведения особенностей иммунного ответа. Успешная трансфекция целевых миРНК, направленных на ключевые гены, продемонстрировала высокую точность и эффективность выбранного метода и привело к значительному снижению экспрессии.

Особенное внимание стоит уделить выявленной способности миРНК к эффективному подавлению экспрессии TLR4 и TLR7, это демонстрирует как работу самих миРНК, так и сам факт того, что исследуемые мишени чувствительны к сайленсингу. Снижение мРНК на этапе после транскрипции, имеет фундаментальное значение, выявляя TLR-рецепторы перспективными кандидатами для молекулярного вмешательства.

Ключевые слова: экспрессия генов; трансфекция, миРНК; ревматоидный артрит; ген IFN- γ ; ген IL-4; ген TLR4; ген TLR7; PBMC

ВВЕДЕНИЕ

Ревматоидный артрит (РА) – воспалительное аутоиммунное заболевание неизвестной этиологии, поражающее суставы, ткани и органы. Системное воспаление синовиальной ткани с симметричным поражением периферических суставов рук, ног и запястья, приводящее к их повреждению и потере функции [1].

По данным на 2023 г. РА страдали 18 млн. человек во всем мире [2]. Порядка 70% больных РА составляют женщины, что в два-три раза больше, чем мужчин, 55% – больные в возрасте старше 55 лет [3]. Распространенность РА выше в промышленно развитых странах, что объясняется демографическими особенностями (чем выше средний возраст, тем выше

распространенность), воздействием экзогенных токсинов и факторов риска, связанных с образом жизни. Недостаточная диагностика заболевания в странах с низким и средним уровнем дохода также влияет на учет числа пациентов [4].

РА характеризуется нарушением регуляции врожденного и адаптивного иммунитета. В патогенезе РА ключевую роль играют CD4⁺ Т-хелперы, особенно подмножества Th1 и Th2. Th1-клетки продуцируют провоспалительные цитокины, такие как интерферон- γ (IFN- γ), интерлейкин-2 (IL-2) и фактор некроза опухоли- α (TNF- α), способствуя активации макрофагов и усилению клеточного иммунного ответа. В то же время Th2-клетки секретируют IL-4, IL-5, IL-10 и IL-13,

поддерживая гуморальный иммунитет и оказывая модулирующее влияние на воспаление [5]. При РА наблюдается дисбаланс между про- и противовоспалительными цитокинами. Ключевые провоспалительные цитокины включают IL-1, IL-6, TNF- α и IL-17, которые способствуют воспалению и разрушению суставных тканей. С другой стороны, IL-4 и IL-10 обладают противовоспалительными свойствами, подавляя активность Th1-клеток и продукцию провоспалительных цитокинов [6].

Дисбаланс между этими цитокинами приводит к усиленному воспалению и повреждению суставов, что подчеркивает необходимость восстановления цитокинового равновесия в терапии РА. Учитывая ключевую роль врожденного иммунитета в активации воспалительного процесса при РА, особый интерес представляют толл-подобные рецепторы (toll-like receptors (TLR)).

Ген TLR4 активирует врожденный иммунный ответ, выступая в качестве рецептора, распознающего липополисахариды грамотрицательных бактерий. После активации TLR4 запускается цепочка сигнальных путей, таких как MyD88-зависимый и TRIF-зависимый, что приводит к продукции провоспалительных цитокинов и интерферонов I типа [7]. TLR4 активируется как экзогенными лигандами (липпополисахаридом), так и эндогенными молекулами, высвобождающимися при повреждении тканей (DAMPs), включая фибриноген, HSP60/70, HMGB1 и фрагменты гиалуроновой кислоты. Эти молекулы присутствуют в синовиальной жидкости и ткани пациентов с РА и способны запускать сигнальные пути через TLR4, способствуя продукции провоспалительных цитокинов и хемокинов [8].

TLR7 – другой представитель семейства, в отличие от TLR4 распознает вирусную РНК, локализуется, как считалось ранее, в эндосомах. Однако недавние исследования показывают присутствие TLR7 на клеточной поверхности иммунных клеток, включая макрофаги (BM-MCs), дендритные клетки (BM-cDCs, BM-pDCs, спленоцитарные ДК) и В-клетки. Эти результаты указывают, что TLR7 на поверхности клеток является перспективной целью для терапевтического вмешательства при аутоиммунных заболеваниях [9].

РНК-интерференция (RNAi) – это высокоспецифичный клеточный механизм посттранскрипционной регуляции экспрессии генов, впервые описанный в 1998 г. у *Caenorhabditis elegans* [10]. Процесс опосредован короткими двуцепочечными РНК (малые интерферирующие РНК, миРНК) длиной 30-20 нуклеотидов, которые регулируют разрешение или ингибирование трансляции комплементарной мРНК [11]. Механизм основан на точном распознавании двуцепочечной РНК комплементарной мРНК через РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RNA-induced silencing complex (RISC) и последующем ее разрушении [12]. РНК-интерференция имеет важнейшее значение для эмбрионального развития и реакций на стрессовые факторы, включая вирусные инфекции, не только является природным механизмом регуляции экспрессии генов, но также сильным экспериментальным инструментом в молекулярной биологии.

Таким образом, модуляция экспрессии ключевых генов иммунного ответа с использованием миРНК представляет перспективное направление для изучения молекулярных механизмов ревматоидного артрита и разработки таргетных подходов к терапии данного заболевания.

Цель работы – определение влияния малых интерферирующих РНК на экспрессию генов иммунного ответа в мононуклеарных клетках периферической крови у пациентов с ревматоидным артритом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В рамках исследования были использованы мононуклеарные клетки периферической крови (peripheral blood mononuclear cells (PBMC)) выделенные из образцов венозной крови пациентов КГП «Областная клиническая больница» Управления здравоохранения Карагандинской области (г. Караганда, Республика Казахстан) с верифицированным клиническим диагнозом РА. Исследование проводилось в соответствии с этическими стандартами, протокол был одобрен локальным этическим комитетом НАО «Карагандинский медицинский университет» (№68 от 08.10.2024). Работа проведена в 2023 – 2024 гг. на базе Научно-исследовательской лаборатории НАО «Карагандинский медицинский университет» (г. Караганда, Республика Казахстан) и КГП «Областная клиническая больница» (г. Караганда, Республика Казахстан).

Критериями включения в исследование являлись: возраст старше 18 лет, подтвержденный диагноз РА согласно классификационным критериям, стабильная противовоспалительная терапия (метотрексат и метилпреднизолон) на протяжении не менее 4 нед. до момента забора крови. Критерием исключения являлось наличие острого инфекционно-воспалительного заболевания на момент включения в исследование (например, пневмония, острый бронхит, пиелонефрит, инфекция кожи и мягких тканей), а также аллергических реакций, повышения температуры тела выше 37 °C, невозможности проведения венопункции и забора 8 мл крови, онкологических заболеваний или туберкулеза.

В исследование были включены 10 пациентов в возрасте от 29 до 63 лет (средний возраст 53,4 г.), 70% из которых составили женщины. По полученным данным, 25% пациентов были в возрасте старше 59 лет, 75% пациентов – младше 48 лет. У всех пациентов была зарегистрирована стадия клинической активности заболевания, несмотря на использование базисной терапии. Все пациенты получали метотрексат и метилпреднизолон в качестве лечения.

Забор венозной крови в объеме 8 мл проводился в утренние часы, из кубитальной вены, в пробирки с антикоагулянтом (гепарин). Процедура выполнялась квалифицированным медицинским персоналом с соблюдением санитарно-гигиенических норм. Обработка образцов осуществлялась не позднее чем через 2 ч после взятия крови.

PBMC были выделены методом градиентного центрифугирования и подсчитаны с помощью автоматического счетчика TC-10 (Bio-Rad, США). Выделенные клетки замораживали (при -80 °C) для последующего

использования. Нормализацию данных порового цикла проводили относительно гена домашнего хозяйства GAPDH для обеспечения сопоставимости результатов и снижения биологической вариативности. В исследовании была обеспечена клиническая и техническая однородность исследуемой выборки.

Для подавления экспрессии целевых генов IFN- γ , IL-4, TLR4, TLR7 проводили трансфекция соответствующих миРНК с использованием Липофектамина (Lipofectamine RNAiMAX, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, США), по протоколу Lipofectamine® RNAiMAX Reagent Protocol 2013 [13].

Специфичные миРНК были синтезированы строго комплементарно целевым генам, с учетом их нуклеотидной последовательности. Каждая миРНК была растворена в стерильной безнуклеазной воде до рабочей концентрации в 100 нМ. В качестве объектов исследования использовались культивированные клетки РВМС.

В 6-луночные плашки были культивированы клетки РВМС в количестве $0,25 \cdot 10^6$. Липофектамин в объеме 3 мкл разбавляли в 50 мкл среды Optimem, миРНК (Silencer, Pre-designed siRNA, Ambion by life technologies) в объеме 3 мкл разбавляли в 50 мкл среды Optimem. Далее разбавленные компоненты смешивали для образования комплекса миРНК-липид. Спустя 15 мин комплекс добавляли в клетки со средой. Аккуратными движениями комплекс миРНК-липид смешивали с клетками в лунке. Далее клетки культивировали 48 ч в термостате при температуре 37 °C. В качестве контроля использовали группу РВМС без трансфекции и группу РВМС только с реагентом доставки миРНК для оценки воздействия липофекционного реагента.

После 48 ч культивирования клетки переносили в пробирки без ферментов, расщепляющих РНК. Выделение РНК проводилось с помощью набора для выделения (Aurum™ Total RNA Mini Kit (Bio-Rad, Франция). Пробирки с клетками центрифугировали со скоростью 2 000 g (rcf) 5 мин при комнатной температуре. Затем осуществляли лизис с помощью 350 мкл лизирующего буфера с 2-меркаптоэтанолом (свежеприготовленным) из набора, перемешивали. Процесс гомогенизации проводился ультразвуком в течение 45 с. Центрифугировали со скоростью 20 000 rpm в течение 10 мин. После супернатант переносили в пробирки без РНКаз. Добавляли 70% этанола в соотношении 1:1. Перемешивали вортиксированием, из раствора с клетками переносили 700 мкл жидкости в пробирки с мембранами и центрифугировали со скоростью 12 000 g в течение 15 с. Очищали и высушивали пробирку с фильтром, сохраняя РНК. Повторяли действия до тех пока не закончится раствор с клетками. Промывали 2 раза фильтр Wash Buffer 2 с этанолом в объеме 500 мкл. Центрифугировали 12 000 g в течение 15 с. Высушивали этанол в пробирках в течение 1 мин. Центрифугировали 1 мин со скоростью 12 000 g. Добавили ТЕ-буфер в объеме 30 мкл, инкубировали 1 мин и центрифугировали 1 мин со скоростью 12 000 g. Концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре NanoPhotometerP330 (IMPLEN, Германия). Проводили стабилизацию концентрации между всеми образцами.

Реакции с использованием нуклеиновых кислот часто требуют минимальных стандартов чистоты. Чистая ДНК и РНК после очистки имеют соотношения A260/280 близкие к 1,8 и 2,0 соответственно [14].

Реакция обратной транскрипции проводилась для получения кДНК из РНК (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, США).

Для оценки уровня экспрессии использовалась полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени с применением флуоресцентных зондов системы TaqMan. ПЦР проводилась на матрице кДНК (кДНК разводили в 2-3 раза в зависимости от первоначальной концентрации РНК). Для каждой пробирки использовались готовые праймеры, использовался набор TaqMan Gene Expression MasterMix (Applied Biosystems, США). В качестве эндогенного контроля выступали праймеры GAPDH, которые добавляли в одну лунку с образцами и праймерами целевых генов, флуоресценция двух генов считывалась по разным каналам FAM и VIC. Объем реагентов рассчитывали соответственно протоколу (TaqMan® Gene Expression MasterMix User Guide) [15].

Расчет значений пороговых циклов был выполнен для каждой пробы и использован для анализа изменений в уровне экспрессии. Реакцию проводили на системе Applied Biosystems QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, США).

Анализ данных RT-qPCR проводили на встроенном программном обеспечении Design and Analysis 2 (DA2, Thermo Fisher Scientific, США). Пороговый цикл определяли автоматически на основе уровня флуоресценции. Для каждой пробы был рассчитан показатель ΔC_t – разность между C_t значения исследуемого гена и C_t значения эндогенного контрольного гена GAPDH по следующей формуле:

$$\Delta C_t = C_{t_{\text{целевой ген}}} - C_{t_{\text{GAPDH}}}$$

Для определения относительных изменений экспрессии между опытными и контрольными группами использовали формулу:

$$\Delta \Delta C_t = \Delta C_{t_{\text{опыт}}} - \Delta C_{t_{\text{контроль}}}$$

Относительный уровень экспрессии целевых генов рассчитывали по методу $2^{-\Delta \Delta C_t}$, что отражает кратность изменения экспрессии по сравнению с контролем.

Обработку данных RT-qPCR для выявления статистической значимости проводили с использованием программного обеспечения GraphPadPrism (версия XX, GraphPadSoftware, США).

Перед выбором метода статистического анализа была проведена оценка распределения данных, так как объем выборок был небольшой и не во всех случаях данные строго соответствовали нормальному распределению, для сравнения групп использовали непараметрический U-критерий Манна – Уитни. Сравнение проводилось между контрольной группой без

трансфекции (относительная экспрессия которой принималась за 1) и группами после трансфекции миРНК. Уровень значимости установлен на уровне $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

По данным анализа методом $\Delta\Delta Ct$ было выявлено, что в результате трансфекции наблюдалось снижение экспрессии гена TLR4 на 43,9%, TLR7 – на 38,3%.

Согласно данным таблицы 1, значения ΔCt после трансфекции для большинства образцов продемонстрировали устойчивое увеличение по сравнению с контрольными значениями, увеличение ΔCt означает снижение экспрессии гена. Например, если ΔCt до трансфекции составляло (-1.76478) а после трансфекции (-1.27776) . Увеличение значения ΔCt прямо указывает на снижение количества мРНК исследуемого гена. Для всех образцов были получены положительные значения $\Delta\Delta Ct$, варьирующие от 0.487 до 1.474. В дальнейшем расчет относительной экспрессии ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) показал значительное снижение уровня мРНК, значения снижения варьировались от 0.360 до 0.713. Следовательно, средняя относительная экспрессия составила ~ 0.560 , что указывает на снижение уровня мРНК TLR4 $\sim$ в 1.78 раза.

Полученные данные убедительно демонстрируют эффективность использования миРНК TLR4 к подавлению гена на уровне мРНК.

Статистический анализ с использованием U-критерия Манна – Уитни показал, что снижение экспрессии гена TLR4 на 43,9% после трансфекции было статистически значимым ($p=0.0286$) (рис. 1 (А)).

Пороговые циклы экспрессии гена TLR7 варьировались в диапазоне от 27,3 до 31,5. Среднее значение Ct равнялось 28,8. Значения ΔCt до трансфекции составляли: -3.13 , -0.52 , -2.58 , -1.45 . Однако после трансфекции увеличились до -2.1 , 0.12 , -1.29 , -1.35 соответственно. Среднее значение ΔCt показало увеличение с -1.92 до 0.15 . По расчетам значений $\Delta\Delta Ct$, данные относительной экспрессии варьировались с 0.09 до 1.29, при дальнейших вычислениях относительной экспрессии гена ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) был выявлен диапазон данных от 0.40 до 0.93. Средняя относительная экспрессия составила 0,61 (табл. 2).

Статистический анализ показал значимое снижение экспрессии гена TLR7 на 38,3%.

Для оценки статистической значимости понижения значений между группами контроль и опытной группами проведен анализ с U-критерия Манна – Уитни, полученное значение p -value, равнялось 0,0211, что указывает на достоверность результатов (рис. 1 (В)).

Согласно полученным данным, в контрольной группе значения Ct INF- γ находилось в диапазоне от 26.6 до 29.95, среднее Ct составило 28.28, в то время как Ct GAPDH составляло от 28.36 до 30.84. Далее проводился расчет ΔCt , который показал, что без влияния трансфекции значение ΔCt составляло между -0.89 и -2.02 , что указывает на более высокую экспрессию INF- γ по отношению к внутреннему контролю, который соответствовал значениям: -0.48 , 0.89 , -1.41 . Дальнейший расчет $\Delta\Delta Ct$ между ΔCt в

трансфицированных образцах и ΔCt в контрольной группе показал положительное значение от 0.40 до 0.96 (табл. 3).

Статистическая значимость различий между двумя независимыми группами оценивалась с использованием U-критерия Манна – Уитни, с полученным значением p -value=0,1. Это указывает на отсутствие статистически значимых различий между контрольной группой и экспериментальной, даже если существует тенденция к снижению экспрессии INF- γ (рис. 1 (С)).

При количественной оценке экспрессии IL-4 методом ПЦР в реальном времени не удалось получить достоверных результатов.

ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе настоящего исследования была проведена оценка эффективности подавления экспрессии генов TLR4, TLR7 и INF- γ в PBMC человека с использованием специфических малых интерферирующих РНК (миРНК). Анализ результатов показал, что наиболее чувствительным к сайленсингу оказался ген TLR4, за которым следовал TLR7, тогда как подавление INF- γ было менее выраженным и не достигло статистической значимости.

Ген TLR4 продемонстрировал наиболее выраженное снижение экспрессии после трансфекции миРНК. Среднее значение относительной экспрессии составило 0.560 ± 0.153 , что соответствует снижению на 43,9 % по сравнению с контрольной группой. Статистический анализ с использованием U-критерия Манна – Уитни подтвердил значимость наблюдаемого снижения ($p=0.0286$). Эти результаты согласуются с данными других исследований, демонстрирующих эффективность миРНК в подавлении экспрессии TLR4 и последующем снижении продукции провоспалительных цитокинов.

Высокая эффективность сайленсинга TLR4 может быть обусловлена особенностями структуры мРНК этого гена, наличием доступных сайтов связывания для миРНК и высокой базовой экспрессией TLR4 в PBMC, что делает его более восприимчивым к механизму РНК-интерференции.

Ген TLR7 также продемонстрировал снижение экспрессии после трансфекции миРНК, со средним значением относительной экспрессии 0.610 ± 0.123 , что соответствует снижению на 38,3 % по сравнению с контролем. Статистический анализ подтвердил значимость этого снижения ($p=0.0211$). TLR7 играет ключевую роль в распознавании одноцепочечной РНК и активации врожденного иммунного ответа, а его гиперэкспрессия ассоциируется с развитием аутоиммунных заболеваний, включая системную красную волчанку.

Умеренная эффективность подавления TLR7 может быть связана с его локализацией в эндосомах, что затрудняет доступ миРНК, а также с особенностями структуры его мРНК, которые могут снижать эффективность связывания миРНК.

В отличие от TLR4 и TLR7, подавление экспрессии INF- γ после трансфекции миРНК оказалось менее выраженным и не достигло статистической значимости ($p=0.1$). Среднее значение относительной экспрессии составило

Таблица 1 – Значения относительной экспрессии гена TLR4 без и после трансфекции миРНК

TLR4	ΔCt без трансфекции (контроль)	ΔCt после трансфекции (миРНК)	Разница ($\Delta\Delta Ct$)	Относительная экспрессия $2^{-\Delta\Delta Ct}$
1	-1.76478	-1.27776	0.48702	0.71349
2	-0.78757	-0.18534	0.60223	0.65873
3	1.71149	2.67815	0.96665	0.51169
4	-2.10967	-0.63483	1.47484	0.35977

Таблица 2 – Значения относительной экспрессии гена TLR7 без и после трансфекции миРНК

TLR7	ΔCt без трансфекции (контроль)	ΔCt после трансфекции (миРНК)	Разница ($\Delta\Delta Ct$)	Относительная экспрессия $2^{-\Delta\Delta Ct}$
1	-3.13309	-2.10112	1.031978	0.489039194
2	-0.52377	0.128673	0.652442	0.636202524
3	-2.58805	-1.29511	1.292943	0.408117647
4	-1.45077	-1.35554	0.095228	0.936124293

Таблица 3 – Значения относительной экспрессии гена IFN- γ без и после трансфекции миРНК

IFN- γ	ΔCt без трансфекции (контроль)	ΔCt после трансфекции (миРНК)	Разница ($\Delta\Delta Ct$)	Относительная экспрессия $2^{-\Delta\Delta Ct}$
1	-0.89306	-0.48898	1.031978	0.755716486
2	-0.06563	0.89881	0.652442	0.512478008
3	-2.01568	-1.4101	1.292943	0.657206202

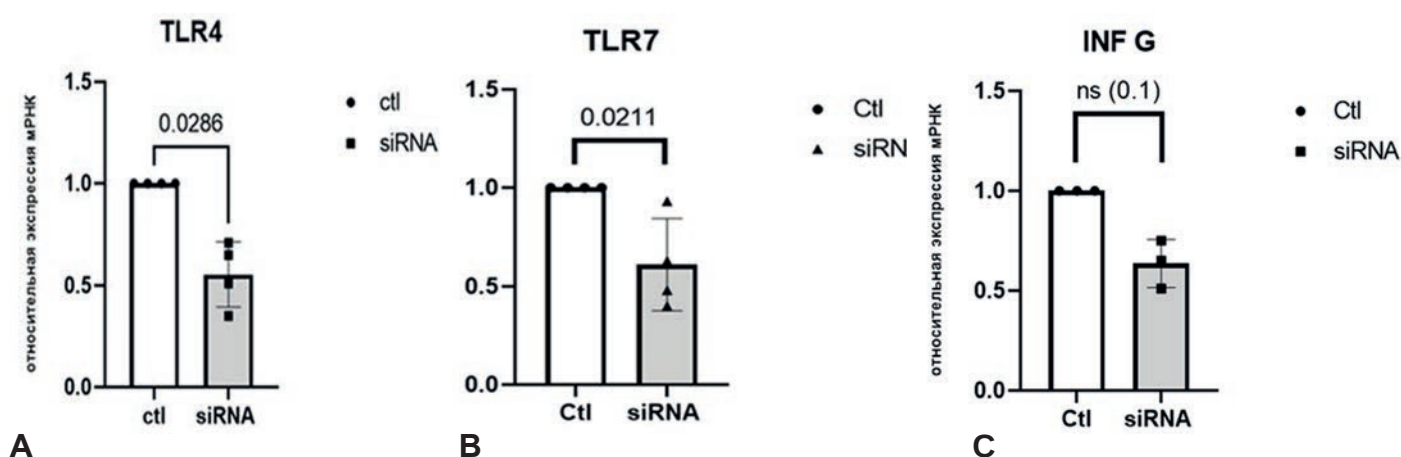


Рисунок 1 – Относительная экспрессия мРНК на образцах клеток пациентов с ревматоидным артритом без и после трансфекции миРНК. А – снижение экспрессии TLR4; В – снижение экспрессии TLR7; С – снижение экспрессии IFN- γ

0.642±0.123, что соответствует снижению на 36% по сравнению с контрольной группой. IFN-γ является ключевым цитокином, участвующим в регуляции иммунного ответа и воспаления, и его роль в патогенезе аутоиммунных заболеваний остается предметом активных исследований

Низкая эффективность подавления IFN-γ может быть обусловлена его низкой базовой экспрессией в покоящихся PBMC, что затрудняет достижение значимого снижения уровня мРНК. Кроме того, структура мРНК IFN-γ может содержать элементы, препятствующие эффективному связыванию и действию миРНК.

Для оценки эффективности сайленсинга были рассчитаны средние значения экспрессии, а также стандартное отклонение (SD) и стандартная ошибка (SE), отражающие вариативность данных и надёжность средних показателей.

Для гена TLR4 среднее значение составило 0.56092 (SD) со стандартной ошибкой ± 0.0626 (SE). Стандартное отклонение было сравнительно невысоким (0.1252). Эти результаты указывают на хорошую воспроизводимость данных между образцами.

Экспрессия TLR7 имела более большую вариативность: среднее значение составило 0.6174±0.0844 (SE) при стандартном отклонении 0.1688.

Для IFN-γ средний уровень экспрессии составил 0.6418±0.0498 (SE) с наименьшим SD среди всех трех генов (0.0862), что указывает на стабильный и воспроизводимый результат подавления (табл. 4).

Полученные данные демонстрируют, что эффективность сайленсинга генов с помощью миРНК может существенно варьироваться в зависимости от молекулярных и клеточных факторов.

Проведение исследований на небольшой выборке пациентов с РА является одним из ключевых ограничений. В работу было включено всего 10 пациентов, что может повлиять на обобщаемость и статистическую мощность результатов. Несмотря на то, что использование непараметрического критерия Манна – Уитни было обоснованным для такой выборки, малый размер не позволяет полностью исключить влияния случайных факторов, таких как индивидуальная особенность и смещенные результаты. Учитывая упомянутые ограничения, в будущем необходимо провести исследования на более крупной выборке пациентов с РА с формированием контрольной группы (здоровыми пациентами). Это позволит увеличить статистическую мощность исследования и в дальнейшем подтвердит или опровергнет результаты.

Результаты настоящего исследования имеют важное значение для клинической практики, демонстрируют потенциал применения миРНК для подавления экспрессии ключевых иммунных генов, таких как TLR4 и TLR7, в мононуклеарных клетках периферической крови. Такой подход может стать основой для разработки новых персонализированных методов терапии ревматоидного артрита, направленных на модуляцию патологической активности иммунной системы без системного угнетения ее функций. В дальнейшем перспективным направлением является проведение доклинических и клинических исследований эффективности и безопасности терапии точечного подавления генов иммунного ответа при аутоиммунных заболеваниях.

ВЫВОДЫ

Проведенное исследование подтвердило релевантность использования PBMC как *in vitro* модели для изучения молекулярных механизмов, продемонстрировав возможность воспроизведения особенностей иммунного ответа. Успешная трансфекция целевых миРНК, направленных на ключевые гены, продемонстрировала высокую точность и эффективность выбранного метода и привело к значительному снижению экспрессии.

На основе результатов были сделаны следующие выводы:

1. Проведенные трансфекции полученных мононуклеарных клеток из периферической крови специфическими малыми интерферирующими РНК, направленными на гены TLR4 и TLR7 снизили экспрессию TLR4 на 43,9%, TLR7 – на 38,3% для ($p < 0.05$).

2. Статистический анализ показал достоверность различий в экспрессии генов иммунного ответа после воздействия строго комплементарных миРНК. Уменьшение экспрессии гена TLR4 составило 1.85 раза, гена TLR7 – 1.64 раза. Это свидетельствует об эффективности трансфекции и точности миРНК, в особенности снижение экспрессии подтверждает уменьшение количества мРНК.

3. Извлечено общее количество РНК после трансфекции в соответствии с необходимой чистотой и концентрацией. Синтезирована кДНК на матрице РНК. Осуществлена количественная оценка уровня экспрессии целевых генов на основе метода ПЦР в реальном времени. Проведено сравнение уровня экспрессии указанных генов между контрольными и обработанными миРНК образцами с использованием подхода $\Delta\Delta C_t$ для

Таблица 4 – Показатели экспрессии генов TLR4, TLR7 и IFN-γ после трансфекции миРНК: средние значения, стандартное отклонение и стандартная ошибка

Ген	Образец 1	Образец 2	Образец 3	Образец 4	Среднее значение (mean)	Стандартное отклонение (SD)	Стандартная ошибка (SE)
TLR4	0.71349	0.65873	0.51169	0.35977	0.56092	0.12519	0.062595
TLR7	0.48904	0.63620	0.40812	0.93612	0.61737	0.16879	0.084396
INF-γ	0.75572	0.51248	0.65721	–	0.6418	0.08621	0.049776

анализа изменений. Определены наиболее чувствительные к нокдауну мишени.

4. Несмотря на положительные результаты, исследование имеет ряд ограничений, в том числе малый размер выборки, который не позволяет в полной мере оценить статистическую значимость и обобщить полученные данные на всю популяцию пациентов. Для преодоления этих ограничений, необходимо проведение дальнейших исследований на большей когорте пациентов с детальной клинической характеристикой. Это позволит подтвердить результаты, изучить влияние различных факторов (например, стадия заболевания, сопутствующая терапия) на эффективность подавления экспрессии генов, а также исследовать другие гены, вовлечённые в патогенез ревматоидного артрита.

5. Использование миРНК может эффективно снижать экспрессию ключевых генов иммунного ответа в мононуклеарных клетках периферической крови у пациентов с ревматоидным артритом. Это подтверждает потенциал применения РНК-интерференции как инструмента для изучения молекулярных механизмов заболевания и как перспективного направления для разработки новых таргетных методов терапии, поскольку блокирование ключевых медиаторов иммунной активации нарушает патологическую цепочку событий, лежащую в основе аутоиммунной агрессии, и тем самым приближает создание более селективных и эффективных подходов к лечению ревматоидного артрита.

Вклад авторов:

А. Ж. Орынбасар – сбор и обработка материала, написание текста.

А. Ж. Орынбасар, И. А. Кадырова, Д. А. Солянов – обработка статистических данных, редактирование.

А. А. Мурзабаев – сбор биоматериала.

Все авторы принимали участие в разработке концепции и дизайна исследования. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.

Конфликт интересов:

Конфликт интересов не заявлен.

Данный материал ранее не был представлен для публикации в других изданиях и не рассматривается другими издательствами.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Arthritis statistics 2025*. <https://www.singlecare.com/blog/news/arthritis-statistics/#arthritis-and-overall-health> (дата обращения: 05.02.2025)
2. GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 2020; 396 (10258):1204-1222. [https://doi:10.1016/S0140-6736\(20\)30925-9](https://doi:10.1016/S0140-6736(20)30925-9)
3. *Rheumatoid arthritis*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/rheumatoid-arthritis> (дата обращения: 05.02.2025)

4. Плахова А.О., Сороцкая В.Н., Вайсман Д.Ш., Балабанова Р.М. Ревматоидный артрит: распространенность и заболеваемость в разных странах. *Современная ревматология*. 2025; 19 (1): 7-11.

5. Luo P., Wang P., Xu J., Hou W., Xu P., Xu K., Liu L. Immunomodulatory role of T helper cells in rheumatoid arthritis: a comprehensive research review. *Bone Joint. Res.* 2022; 11 (7): 426-438.

6. Lubberts E., van den Berg W.B. Cytokines in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis and Collagen-Induced Arthritis. *Madame Curie Bioscience Database* [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6288/> (дата обращения: 05.02.2025)

7. Arjumand S., Shahzad M., Shabbir A., Yousaf M.Z. Thymoquinone attenuates rheumatoid arthritis by down-regulating TLR2, TLR4, TNF- α , IL-1, and NF κ B expression levels. *Biomed. Pharmacother.* 2019; 111: 958-963. <https://doi:10.1016/j.biopha.2019.01.006>

8. Huang Q.Q., Pope R.M. The role of toll-like receptors in rheumatoid arthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 2009; 11 (5): 357-364.

9. Kanno A., Tanimura N., Ishizaki M., Ohko K., Motoi Y., Onji M., Fukui R., Shimozato T., Yamamoto K., Shibata T., Sano S., Sugahara-Tobinai A., Takai T., Ohto U., Shimizu T., Saitoh S., Miyake K. Targeting cell surface TLR7 for therapeutic intervention in autoimmune diseases. *Nat. Commun.* 2015; 6: 6119. <https://doi:10.1038/ncomms7119>

10. Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998; 391 (6669): 806-811. <https://doi:10.1038/35888>

11. Wilson R.C., Doudna J.A. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu. Rev. Biophys.* 2013; 42: 217-239. <https://doi:10.1146/annurev-biophys-083012-130404>

12. Hammond S.M., Bernstein E., Beach D., Hannon G.J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 2000; 404 (6775): 293-296. <https://doi:10.1038/35005107>

13. Thermo Fisher Scientific. *Lipofectamine™ RNAi-MAX Transfection Reagent Protocol*. https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/Lipofectamine_RNAiMAX_Reag_protocol.pdf (дата обращения: 05.06.2025)

14. University of Georgia. *Note on the 260/280 and 260/230 Ratios*. https://dna.uga.edu/wp-content/uploads/sites/51/2019/02/Note-on-the-260_280-and-260_230-Ratios.pdf (дата обращения: 05.06.2025)

15. Thermo Fisher Scientific. *Gene Expression Single Tube User Guide*. https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/4333458_GeneEx_sgltube_UG.pdf (дата обращения: 05.06.2025)

ТРАНСЛИТЕРАЦИЯ

1. *Arthritis statistics 2025*. <https://www.singlecare.com/blog/news/arthritis-statistics/#arthritis-and-overall-health> (дата обращения: 05.02.2025)

2. GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 2020; 396 (10258):1204-1222. [https://doi:10.1016/S0140-6736\(20\)30925-9](https://doi:10.1016/S0140-6736(20)30925-9)
3. *Rheumatoid arthritis*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/rheumatoid-arthritis> (дата обращения: 05.02.2025)
4. Plahova A.O., Sorockaja V.N., Vajsman D.Sh., Balabanova R.M. Revmatoidnyj artrit: rasprostranennost' i zaboлеваemost' v raznyh stranah. *Sovremennaja revmatologija*. 2025; 19 (1): 7-11.
5. Luo P., Wang P., Xu J., Hou W., Xu P., Xu K., Liu L. Immunomodulatory role of T helper cells in rheumatoid arthritis: a comprehensive research review. *Bone Joint. Res*. 2022; 11 (7): 426-438.
6. Lubberts E., van den Berg W.B. Cytokines in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis and Collagen-Induced Arthritis. *Madame Curie Bioscience Database* [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6288/> (дата обращения: 05.02.2025)
7. Arjumand S., Shahzad M., Shabbir A., Yousaf M.Z. Thymoquinone attenuates rheumatoid arthritis by downregulating TLR2, TLR4, TNF- α , IL-1, and NF κ B expression levels. *Biomed. Pharmacother*. 2019; 111: 958-963. <https://doi:10.1016/j.biopha.2019.01.006>
8. Huang Q.Q., Pope R.M. The role of toll-like receptors in rheumatoid arthritis. *Curr. Rheumatol. Rep*. 2009; 11 (5): 357-364.
9. Kanno A., Tanimura N., Ishizaki M., Ohko K., Motoi Y., Onji M., Fukui R., Shimozato T., Yamamoto K., Shibata T., Sano S., Sugahara-Tobinai A., Takai T., Ohto U., Shimizu T., Saitoh S., Miyake K. Targeting cell surface TLR7 for therapeutic intervention in autoimmune diseases. *Nat. Commun*. 2015; 6: 6119. <https://doi:10.1038/ncomms7119>
10. Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998; 391 (6669): 806-811. <https://doi:10.1038/35888>
11. Wilson R.C., Doudna J.A. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu. Rev. Biophys*. 2013; 42: 217-239. <https://doi:10.1146/annurev-biophys-083012-130404>
12. Hammond S.M., Bernstein E., Beach D., Hannon G.J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 2000; 404 (6775): 293-296. <https://doi:10.1038/35005107>
13. Thermo Fisher Scientific. *Lipofectamine™ RNAi-MAX Transfection Reagent Protocol*. https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/Lipofectamine_RNAiMAX_Reag_protocol.pdf (дата обращения: 05.06.2025)
14. University of Georgia. *Note on the 260/280 and 260/230 Ratios*. https://dna.uga.edu/wp-content/uploads/sites/51/2019/02/Note-on-the-260_280-and-260_230-Ratios.pdf (дата обращения: 05.06.2025)
15. Thermo Fisher Scientific. *Gene Expression Single Tube User Guide*. https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/4333458_GeneEx_sgltube_UG.pdf (дата обращения: 05.06.2025)

Поступила 29.12.2024

Направлена на доработку 16.01.2025, 28.03.25

Принята 04.05.2025

Опубликована online 30.09.2025

I. A. Kadyrova¹, A. Zh. Orynbassar^{1*}, D. A. Solyanov¹, A. R. Alina², A. A. Murzabayev³**STUDY OF THE EFFECT OF SMALL INTERFERING RNAs ON THE EXPRESSION OF IFN- γ , IL-4, TLR4, AND TLR7 GENES IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS OF PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS**¹Scientific Research Laboratory, Karaganda Medical University NC JSC (100008, Republic of Kazakhstan, Karaganda city, Gogolya str., 40; e-mail: info@qmu.kz)²Department of Internal Diseases, Karaganda Medical University NC JSC (100008, Republic of Kazakhstan, Karaganda city, Gogolya str., 40; e-mail: info@qmu.kz)³Department of Rheumatology, Regional Clinical Hospital MSE (100000, Republic of Kazakhstan, Karaganda, Yerubayeva str., 43, e-mail: okb@okbkaz.kz)***Ainur Zharkynbekkyzy Orynbassar** – Karaganda Medical University NC JSC; 100008, Republic of Kazakhstan, Karaganda city, Gogolya str., 40; e-mail: ainurorynbassar@gmail.com**Aim.** To determine the effect of small interfering RNAs on the expression of immune response genes in peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis.**Materials and methods.** Peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis were isolated by density gradient centrifugation. Small interfering RNAs were introduced into peripheral blood mononuclear cells via transfection using commercial reagents (Lipofectamine). Gene expression was evaluated by real-time PCR ($\Delta\Delta C_t$, log₂ Fold Change) 48 hours after gene knockdown. GAPDH expression was used as an endogenous control. Statistical analysis included the nonparametric Mann – Whitney U test ($p = 0.05$).

Results and discussion. Transfection of peripheral blood mononuclear cells with specific small interfering RNAs targeting IFN- γ , IL-4, TLR4, and TLR7 resulted in 43,9% decrease in TLR4 expression ($p=0.0286$) and 38,4% decrease in TLR7 expression ($p=0.0211$).

Conclusion. The study confirmed the relevance of peripheral blood mononuclear cells using as an *in vitro* model for investigating molecular mechanisms, demonstrating their ability to reproduce features of the immune response. Successful transfection of target small interfering RNAs against key genes showed high precision and efficiency of the chosen method and led to a significant reduction in gene expression. Particular attention should be paid to the identified ability of small interfering RNAs to effectively suppress TLR4 and TLR7 expression, which demonstrates both the functionality of the small interfering RNAs and the susceptibility of these targets to silencing. Post-transcriptional reduction of mRNA levels is of fundamental importance, indicating that toll-like receptors are promising candidates for molecular intervention.

Key words: gene expression; transfection; siRNAs; rheumatoid arthritis; IFN- γ gene; IL-4 gene; TLR4 gene; TLR7 gene; PBMC

И. А. Кадырова¹, А. Ж. Орынбасар^{1*}, Д. А. Солянов¹, А. Р. Алина², А. А. Мурзабаев³

РЕВМАТОИДТЫ АРТРИТПЕН АУЫРАТЫН НАУҚАСТАРДЫҢ ПЕРИФЕРИЯЛЫҚ ҚАНЫНЫҢ МОНОНУКЛЕАРЛЫҚ ЖАСУШАЛАРЫНДАҒЫ IFN- γ , IL4, TLR4, TLR7 ГЕНДЕРІНІҢ ЭКСПРЕССИЯСЫНА КІШІ ИНТЕРФЕРЕНЦИЯЛЫҚ РНҚ-НЫҢ ӘСЕРІН ЗЕРТТЕУ

¹«Қарағанды медицина университеті» КеАҚ Ғылыми-зерттеу зертханасы (100008, Қазақстан Республикасы, Қарағанды қ., Гоголь к-сі, 40; e-mail: info@qmu.kz)

²Ішкі аурулар кафедрасы, «Қарағанды медицина университеті» КеАҚ (100008, Қазақстан Республикасы, Қарағанды қ., Гоголь көш., 40; e-mail: info@qmu.kz)

³Облыстық клиникалық аурухана, Ревматология бөлімшесі (100000, Қазақстан Республикасы, Қарағанды қ., Ерубаев көш., 43; e-mail: okb@okbkar.kz)

***Айнұр Жаркынбекқызы Орынбасар** – «Қарағанды медицина университеті» КеАҚ; 100008, Қазақстан Республикасы, Қарағанды қ., Гоголь к-сі, 40; e-mail: ainurorynbassar@gmail.com

Мақсаты. Ревматоидты артриті бар науқастардың перифериялық қанының моноклеарлық жасушаларындағы иммундық жауап гендерінің экспрессиясына кіші интерференциялық РНҚ-ның әсерін анықтау.

Материалдар және әдістер. РА-мен ауыратын науқастардың перифериялық қанының моноклеарлық жасушалары тығыздық градиентінде центрифугалау әдісімен алынды. Синтетикалық миРНК РВМС-ге трансфекция әдісімен енгізілді. Трансфекция үшін коммерциялық реагенттер (мысалы, липофектамин) қолданылды. Ген экспрессиясы нақты уақыттағы ПТР әдісімен ($\Delta\Delta C_t$, $\log_2$ Fold Change) ген нокдауынан кейін 48 сағаттан соң бағаланды. GAPDH экспрессиясы эндогендік бақылау ретінде қолданылды. Статистикалық өңдеуге Манн–Уитнидің параметрлік емес U-критерийі ($p=0,05$) енгізілді.

Нәтижелер және талқылау. INF- γ , IL-4, TLR4 және TLR7 гендерін нысанаға алған арнайы кіші интерференциялық РНҚ-мен трансфекциялау TLR4 экспрессиясының 43,9%-ға ($p=0,0286$) және TLR7 экспрессиясының 38,4%-ға ($p=0,0211$) төмендеуіне әкелді.

Қорытынды. Зерттеу РВМС-ні молекулалық механизмдерді зерттеудің *in vitro* моделі ретінде пайдаланудың өзектілігін растады, иммундық жауаптың ерекшеліктерін қайта жаңғырту мүмкіндігін көрсетті. Нысаналы гендерге бағытталған миРНК-ның сәтті трансфекциясы таңдалған әдістің жоғары дәлдігі мен тиімділігін көрсетті және ген экспрессиясының айтарлықтай төмендеуіне алып келді. миРНК-ның TLR4 және TLR7 экспрессиясын тиімді басу қабілеті, бұл нысаналардың сайленсингке сезімтал екенін және TLR-рецепторлардың молекулалық араласу үшін перспективалы кандидаттар екенін көрсетеді.

Кілт сөздер: ген экспрессиясы; трансфекция; миРНК; ревматоидты артрит; IFN- γ гені; IL-4 гені; TLR4 гені; TLR7 гені; РВМС