

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ МРНК-ЛНЧ-ВАКЦИН НА НЕЙРОВОСПАЛЕНИЕ У BALB/C МЫШЕЙ

А. С. Киршина¹, А. А. Казакова¹, Е. С. Колосова¹, Е. А. Имашева¹, О. О. Васильева^{1,2}, О. В. Заборова^{1,2}, И. М. Теренин^{1,3}, А. Р. Муслимов^{1,4}, В. В. Решетников^{1,5} ✉

¹ Научный центр трансляционной медицины, «Научно-технологический университет «Сириус», Сириус, Россия

² Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

⁴ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

⁵ Институт цитологии и генетики, Новосибирск, Россия

Доказана высокая эффективность мРНК-вакцин в борьбе с эпидемией COVID-19, продемонстрирована низкая частота развития побочных эффектов. Тем не менее существует еще много пробелов в нашем понимании биологии и биобезопасности нуклеиновых кислот в составе липидных наночастиц (ЛНЧ), наиболее часто используемых в качестве системы внутриклеточной доставки вакцин на основе мРНК. Известно, что ЛНЧ приводят к сильному воспалительному ответу в месте введения, имеют широкий профиль биораспределения и обнаруживаются после введения во многих тканях организма, в том числе в головном мозге. Роль новых препаратов с такой фармакокинетикой в воспалительных процессах, развивающихся в забарьерных органах изучена недостаточно. Целью исследования было оценить влияние различных доз мРНК-ЛНЧ, экспрессирующих репортерный белок (0, 5, 10 и 20 мкг мРНК, кодирующей люциферазу светлячка) на экспрессию маркеров нейровоспаления (*Tnfa*, *Il1β*, *Gfap*, *Aif1*) в префронтальной коре и гипоталамусе лабораторных животных через 4, 8 и 30 ч после внутримышечной инъекции наноземulsion ЛНЧ. Показано, что мРНК-ЛНЧ-вакцины в дозе 10–20 мкг мРНК способны усиливать экспрессию *Aif1* в гипоталамусе через 8 ч после вакцинации, но через 30 ч эти различия не определялись. Обнаружено, что уровень экспрессии *Gfap*, *Il1β*, *Tnfa* в экспериментальных группах различался в различных временных точках в гипоталамусе. Согласно полученным результатам, введенные парентерально мРНК-ЛНЧ могут стимулировать временную активацию микроглии в определенных временных промежутках дозо- и регион-зависимым образом.

Ключевые слова: мРНК-вакцины, нейровоспаление, липидные наночастицы, *Aif1*, *Gfap*

Финансирование: исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-10-2021-113, уникальный идентификатор проекта РФ----193021X0001).

Вклад авторов: А. С. Киршина — выделение РНК, постановка ПЦР реакций; А. А. Казакова, Е. С. Колосова, Е. А. Имашева, О. О. Васильева — получение генетических конструкций, выделение РНК, написание статьи; О. В. Заборова — формулировка РНК в ЛНЧ, написание статьи; И. М. Теренин — синтез РНК, написание статьи; А. Р. Муслимов — эксперимент с животными, редактирование текста; В. В. Решетников — эксперимент с животными, анализ данных, подготовка рисунков, написание статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ПСПБГМУ им. И. П. Павлова (протокол № 83 от 21 сентября 2022 г.); проведено в соответствии с Европейской конвенцией ETS № 123 о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в научных целях (Страсбург) (1986 г. с приложением от 2006), Международным соглашением о гуманном обращении с животными (1986 г.), Guide for the care and use of laboratory animals, 8th ed. (Руководством по уходу и использованию лабораторных животных, 2010 г.); Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the council on the protection of animals used for scientific purposes, 2010 г.; «Правилами надлежащей лабораторной практики» (2016 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Василий Владимирович Решетников
Олимпийский пр-кт, д. 1, г. Сочи, 354340, Россия; reshetnikov.vv@talantiuspeh.ru

Статья получена: 01.12.2022 **Статья принята к печати:** 15.12.2022 **Опубликована онлайн:** 30.12.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.068

EFFECTS OF VARIOUS MRNA-LNP VACCINE DOSES ON NEUROINFLAMMATION IN BALB/C MICE

Kirshina AS¹, Kazakova AA¹, Kolosova ES¹, Imasheva EA¹, Vasileva OO¹, Zaborova OV^{1,2}, Terenin IM^{1,3}, Muslimov AR^{1,4}, Reshetnikov VV^{1,5} ✉

¹ Research Center for Translational Medicine, Sirius University of Science and Technology, Sirius, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁴ Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

⁵ Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia

It has been proven that mRNA vaccines are highly effective against the COVID-19 outbreak, and low prevalence of side effects has been shown. However, there are still many gaps in our understanding of the biology and biosafety of nucleic acids as components of lipid nanoparticles (LNPs) most often used as a system for intracellular delivery of mRNA-based vaccines. It is known that LNPs cause severe injection site inflammation, have broad biodistribution profiles, and are found in multiple tissues of the body, including the brain, after administration. The role of new medications with such pharmacokinetics in inflammation developing in inaccessible organs is poorly understood. The study was aimed to assess the effects of various doses of mRNA-LNP expressing the reporter protein (0, 5, 10, and 20 μg of mRNA encoding the firefly luciferase) on the expression of neuroinflammation markers (*Tnfa*, *Il1β*, *Gfap*, *Aif1*) in the prefrontal cortex and hypothalamus of laboratory animals 4, 8, and 30 h after the intramuscular injection of LNP nanoemulsion. It was shown that mRNA-LNP vaccines in a dose of 10–20 μg of mRNA could enhance *Aif1* expression in the hypothalamus 8 h after vaccination, however, no such differences were observed after 30 h. It was found that the *Gfap*, *Il1β*, *Tnfa* expression levels in the hypothalamus observed at different times in the experimental groups were different. According to the results, mRNA-LNPs administered by the parenteral route can stimulate temporary activation of microglia in certain time intervals in the dose-dependent and site specific manner.

Keywords: mRNA vaccine, neuroinflammation, lipid nanoparticles, *Aif1*, *Gfap*

Funding: the study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement № 075-10-2021-113, project ID RF--193021X0001).

Author contribution: Kirshina AS — RNA extraction, conducting PCR; Kazakova AA, Kolosova ES, Imasheva EA, Vasileva OO — generating genetic constructs, RNA extraction, manuscript writing; Zaborova OV — RNA formulation in LNP, manuscript writing; Terenin IM — RNA synthesis, manuscript writing; Muslimov AR — animal experiment, manuscript editing; Reshetnikov VV — animal experiment, data analysis, preparing illustrations, manuscript wr

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Pavlov First St. Petersburg State Medical University (protocol № 83 of 21 September 2022); it was conducted in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No. 123, Strasbourg, 1986, with the 2006 Appendix), international convention on the humane treatment of animals (1986), Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th ed. (2010); Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes (2010), Principles of Good Laboratory Practice (2016).

✉ **Correspondence should be addressed:** Vasily V. Reshetnikov
Olimpiyskiy prospekt, 1, Sochi, 354340, Russia; reshetnikov.vv@talantiuspeh.ru

Received: 01.12.2022 **Accepted:** 15.12.2022 **Published online:** 30.12.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.068

Успехи в разработке мРНК-вакцин (ЛНЧ) позволили менее чем за год получить две одобренные FDA вакцины (Pfizer/BioNTech и Moderna) против вируса SARS-CoV-2 [1, 2]. Препараты на основе мРНК-ЛНЧ могут быть использованы как для терапии ряда социально значимых заболеваний, так и в качестве профилактических вакцин против многих инфекционных возбудителей. Гибкость платформы мРНК-ЛНЧ обусловлена возможностью специфического выбора последовательности антигена в составе молекулы мРНК, а также за счет различных вариантов состава липидов и их соотношения в ЛНЧ, которые могут модулировать эффективность и иммуногенность мРНК вакцин [3]. Липидные частицы Pfizer/BioNTech и Moderna включают в себя заряженные ионизированные липиды, нейтральные ионизируемые липиды, полиэтиленгликоль-содержащие липиды, холестерин и дистеароилфосфатидилхолин (DSPC) [4]. ЛНЧ обеспечивают интернализацию мРНК-ЛНЧ в клетку и играют адьювантную роль, стимулируя умеренное усиление воспаления в месте введения [3]. Показано, что центральную роль в индукции воспаления, вызванного ЛНЧ, могут играть различные варианты ионизируемых липидов, которые распознаются toll-like-рецепторами 4-го типа (TLR-4) [5]. Кроме того, молекула мРНК в составе вакцины может обладать провоспалительными свойствами через TLR-3,7,8, RIG-I, MDA5 [6, 7]. Умеренная провоспалительная активность способствует эффективной презентации антигенов на поверхности антигенпрезентирующих клеток и формированию гуморального и Т-клеточного иммунитета. Однако в некоторых случаях воспаление может приводить к нежелательным эффектам. В частности, недавние исследования показали, что ЛНЧ приводят к сильному воспалительному ответу в месте введения, имеют широкий профиль распределения в организме и обнаруживаются во многих тканях, в том числе в головном мозге [4, 8]. Беспрепятственное прохождение гематоэнцефалического барьера в совокупности с провоспалительными свойствами могут вызывать нежелательные явления в виде иммунной активации в центральной нервной системе. Целью исследования была динамическая оценка маркеров

нейровоспаления в префронтальной коре и гипоталамусе у лабораторных мышей линии Balb/c после введения различных доз мРНК-ЛНЧ вакцин.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальный дизайн

В эксперименте на конвенциональных условиях использовали 75 взрослых самцов (в возрасте 9–10 недель, весом 19–22 г) Balb/c, полученных из питомника лабораторных животных «Рапполово» РАМН (Санкт-Петербург, Россия) и содержащихся в Центре экспериментальной фармакологии Санкт-Петербургского химико-фармацевтического университета при фиксированном световом режиме 12.00 : 12.00 ч. Стандартный корм (гранулы) и воду животные получали без ограничения. Перед исследованием животных распределили в исследовательские группы путем рандомизации. Инъекция различных доз мРНК-ЛНЧ (три концентрации — 5, 10 и 20 мкг РНК) или контрольных (пустых) ЛНЧ в фосфатном буфере производили внутримышечно в объеме 30 мкл. Спустя 4, 8 и 30 ч после введения взвеси частиц животные получали ингаляцию 2,0% изофлюрана (Laboratories Karizoo, S.A.; Испания) в смеси с кислородом в течение 5 мин, а затем подвергали декапитации (рис. 1). Образцы гипоталамуса и префронтальной коры (ПФК) выделяли, как описано ранее [9]. Контрольным животным был введен аналогичный объем (30 мкл) фосфатного буфера. В каждой группе на каждую экспериментальную точку использовали по пять животных.

Клонирование

Аmplификацию целевого гена, содержащего последовательность 5'-UTR Moderna (gggaaataagagagaaaa gaagagtaagaagaataataagacccccggcgccgacc), кодирующую последовательность люциферазы светлячка (*Photinus pyralis*) и 3'-UTR Moderna (gctggagcctcggtggcctagctcttg cccttgggctccccagccccctcctccctcctgcaccctgacccccgtg

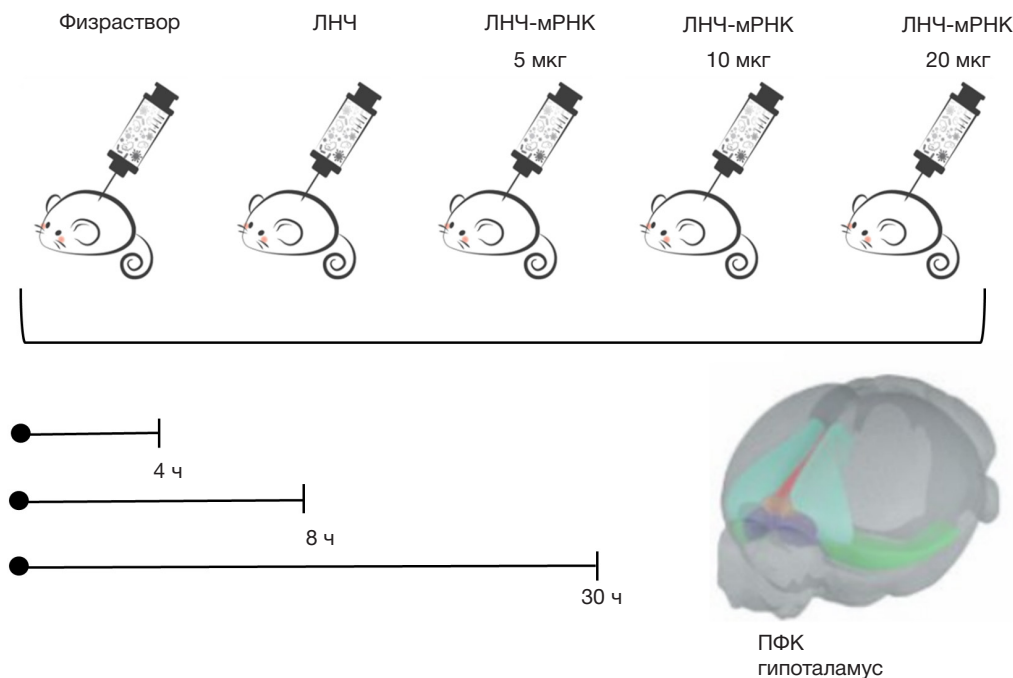


Рис. 1. Дизайн эксперимента

Таблица. Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов

Ген	Последовательность 5'→3'	
<i>Aif1</i>	Probe	ROX-AGAGAGGCTGGAGGGGATC-BHQ2
	For	GCTTTTGGACTGCTGAAGGC
	Rev	GAAGGCTTCAAGTTTGGACG
<i>Gfap</i>	Probe	ROX-GCAAGAGACAGAGGAGTGG-BHQ-2
	For	CCTGAGAGAGATTTCGCACTC
	Rev	GACTCCAGATCGCAGGTCAAG
<i>TNFα</i>	Probe	ROX-CGAGTGACAAGCCTGTAGC-BHQ2
	For	CATCAGTTCTATGGCCAGACCCCT
	Rev	GCTCCTCCACTTGGTGGTTTGCTA
<i>Il1β</i>	Probe	ROX-CTGCTTCCAAACCTTTGACCTGG-BHQ2
	For	CCTGTCTTTGAAGTTGACGG
	Rev	CTGAAGCTCTTGTGATGTGC
<i>Gapdh</i>	Probe	CCATCAACGACCCCTTCATTGACCTC
	For	TGCAGTGGCAAAGTGGAGAT
	Rev	TGCCGTGAGTGGAGTCATACT

cttgaataaagtctgagtgggcgga), осуществляли путем сшивки трех фрагментов методом ПЦР с перекрывающимися праймерами. Затем полученный фрагмент инкубировали с эндонуклеазами рестрикции *EcoRI* и *BglIII*, очищали на агарозном геле и осуществляли лигирование с аналогично подготовленным коммерческим вектором pSmart (Lucigen; США). Вектор содержал polyA-хвост длиной 110. Для трансформации использовали штамм *E. coli* NEB-stable (New England Biolabs; UK). Клоны отбирали методом ПЦР с колоний и подтверждали последовательность вставки секвенированием. Культивирование *E. coli* для наработки верифицированной плазмиды проводили на шейкере-инкубаторе при 30 °C и 180 оборотах в минуту. Затем с помощью набора QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen; США) выделяли плазмидную ДНК из бактериальных клеток. Полученный препарат плазмиды линейаризовали по уникальному сайту рестрикции *SpeI* с последующей визуализацией в агарозном геле.

In vitro транскрипция мРНК

In vitro транскрипцию проводили в буфере, содержащем 20 mM DTT, 2 mM спермидина, 80 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 24 mM MgCl₂. Реакционная смесь содержала также по 3 mM каждого из рибонуклеозидтрифосфатов («Биосан»; Россия), 12 mM аналога кэпа ARCA («Биолабмикс»; Россия). Остальные компоненты из расчета на 100 мкл реакции: 40 единиц ингибитора рибонуклеаз RiboCare («Евроген»; Россия), 500 единиц T7 РНК-полимеразы («Биолабмикс»; Россия), 5 мкг линейаризованной плазмиды и 1 мкл смеси ферментов из набора RiboMAX Large Scale RNA Production System (Promega; США) в качестве источника неорганической пирофосфатазы. Реакцию проводили 2 ч при температуре 37 °C, после чего в реакцию добавляли еще по 3 mM каждого из рибонуклеозидтрифосфатов и инкубировали в течение еще 2 ч. ДНК гидролизвали при помощи нуклеазы RQ1 (Promega; США), РНК преципитировали добавлением LiCl до концентрации 0,32M и EDTA pH 8,0 до концентрации 20 mM с последующей инкубацией на льду в течение часа. Далее раствор центрифугировали 15 мин (25 000 g, 4 °C). Осадок РНК промывали 70%-м этанолом, растворяли в

ультрачистой воде и еще раз преципитировали спиртом по стандартной методике. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически по поглощению на длине волны 260 нм.

Формуляция мРНК в ЛНЧ

Формулирование мРНК в липидные наночастицы проводили путем смешивания водного раствора (10 mM цитратный буфер, pH 3,0) 0,2 мг/мл мРНК со спиртовым раствором смеси липидов в микрофлюидном картридже на приборе The NanoAssemblr™ Benchtop (Precision Nanosystems; США). Липидная смесь содержала следующие компоненты: ионизируемый липидоид ALC-0315 (BroadPharm; США), дистеароилфосфатидилхолин (DSPC) (Avanti Polar Lipids; США), холестерин (Sigma-Aldrich; США), DMG-PEG-2000 (BroadPharm; США) в молярном соотношении (%) 46,3 : 9,4 : 42,7 : 1,6. Количество липидов на единицу мРНК рассчитывали из соотношения N/P = 6 (ионизируемый липидоид ALC-0315 к основанию мРНК). Для формирования частиц требуемого размера водную и спиртовую фазы смешивали в соотношении 3 : 1 по объему с общей скоростью смешивания 10 мл/мин. После смешения фаз полученную водно-спиртовую суспензию частиц диализировали в 300 объемах фосфатно-солевого буфера (pH 7,4, 18 ч, +15 °C). После диализа суспензию частиц концентрировали, используя фильтры Amicon Ultra-4 с отсечением MW10 000. Затем частицы фильтровали в стерильных условиях через фильтр с мембраной из PES 0,22 мкм (Merck; США) и хранили при 4 °C. Пустые ЛНЧ получали путем смешивания 10 mM цитратного буферного раствора (pH 3,0) со спиртовым раствором смеси липидов в микрофлюидном картридже аналогично получению мРНК-ЛНЧ.

После фильтрации качество полученных частиц анализировали по двум параметрам: загрузка мРНК и размер частиц. Концентрацию загруженной в липидные наночастицы мРНК определяли по разнице значений уровня флуоресцентного сигнала при окрашивании реагентом RiboGreen (Thermo Fischer Scientific; США) суспензии частиц до их разрушения и после. Для разрушения частиц использовали детергент Triton X-100

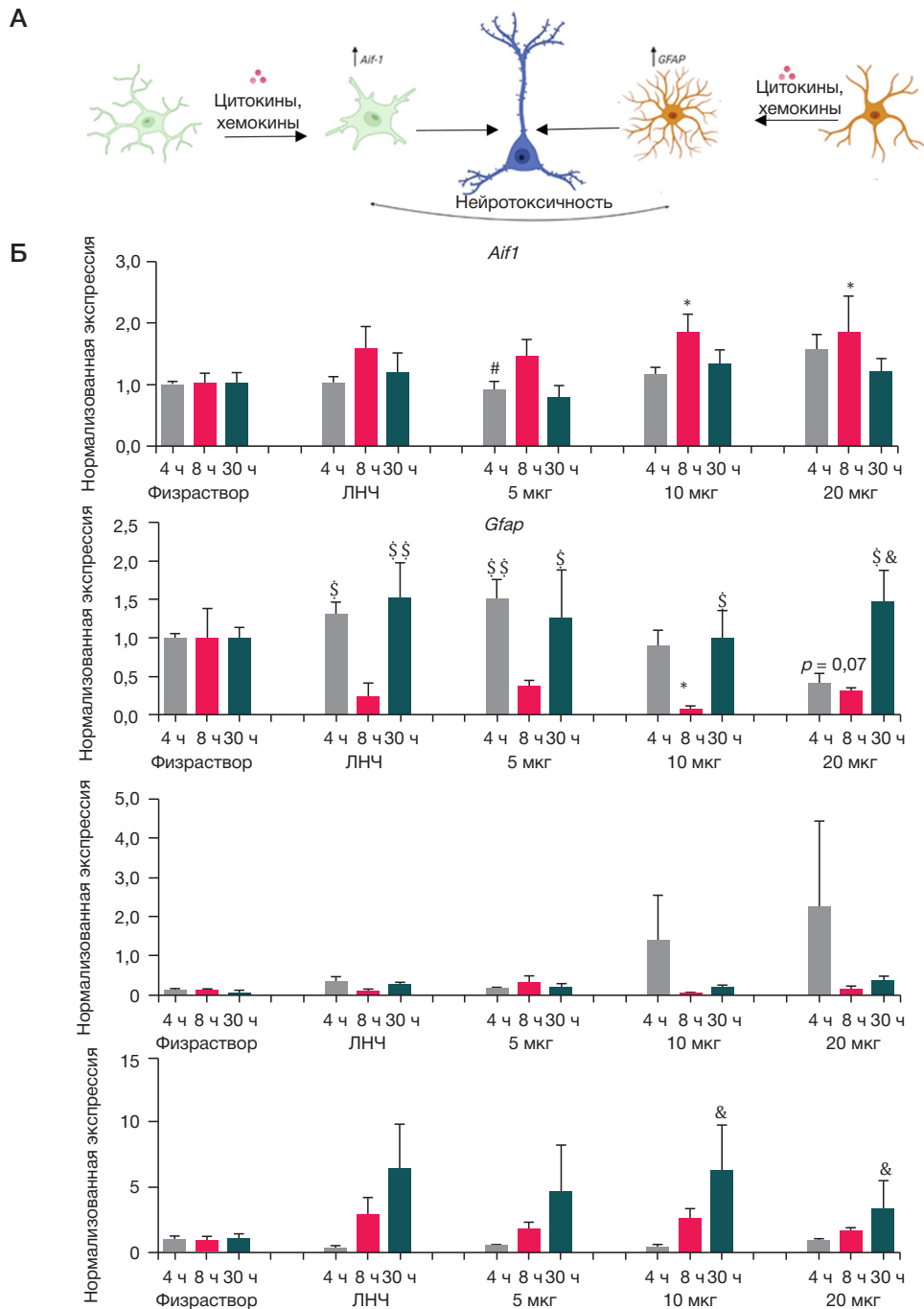


Рис. 2. Экспрессия генов маркеров нейровоспаления в гипоталамусе. **А.** Реакция астроглии и микроглии на острое воспаление. **Б.** Относительный уровень экспрессии генов провоспалительных цитокинов (*Il1β*, *Tnfa*) и маркеров активации глии (*Aif1*, *Gfap*) в различных временных точках после введения мРНК-ЛНЧ-вакцины. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего. * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, в сравнении с группой, в которой вводили физраствор в аналогичной временной точке; # — $p < 0,05$, в сравнении с группой, в которой вводили 20 мкг мРНК-ЛНЧ в аналогичной временной точке; \$ — $p < 0,05$, \$\$ — $p < 0,01$, по сравнению с точкой через 8 ч после введения; & — $p < 0,05$, по сравнению с точкой через 4 ч после введения. Post hoc анализ с использованием критерия Fisher's LSD

(Sigma-Aldrich; США). Размер ЛНЧ определяли методом динамического рассеяния света на приборе Zetasizer Nano ZSP (Malvern Panalytical; США).

Оценка уровня экспрессии генов в мозге

Выделение суммарной РНК проводили из ПФК и гипоталамуса с использованием набора для выделения РНК на колонках («Биолабмикс»; Россия) согласно протоколу производителя. Для определения концентрации РНК и степени ее очистки от белков был использован спектрофотометр NanoDrop OneC (Thermo Scientific; США).

Для реакции обратной транскрипции брали 500 нг РНК и использовали набор для обратной транскрипции ОТ-М-MuLV-RH («Биолабмикс»; Россия) с случайными гексануклеотидными праймерами. Полученную кДНК использовали для оценки уровня экспрессии генов. В качестве маркеров нейровоспаления оценивали экспрессию генов провоспалительных цитокинов и интерлейкинов (*Il1β*, *Tnfa*), генов-маркеров активации микроглии (*Aif1*) и астроглии (*Gfap*). В работе использовали метод количественного ПЦР-анализа с флуоресцентными зондами Taq-man. Последовательности праймеров и зондов представлены в таблице.

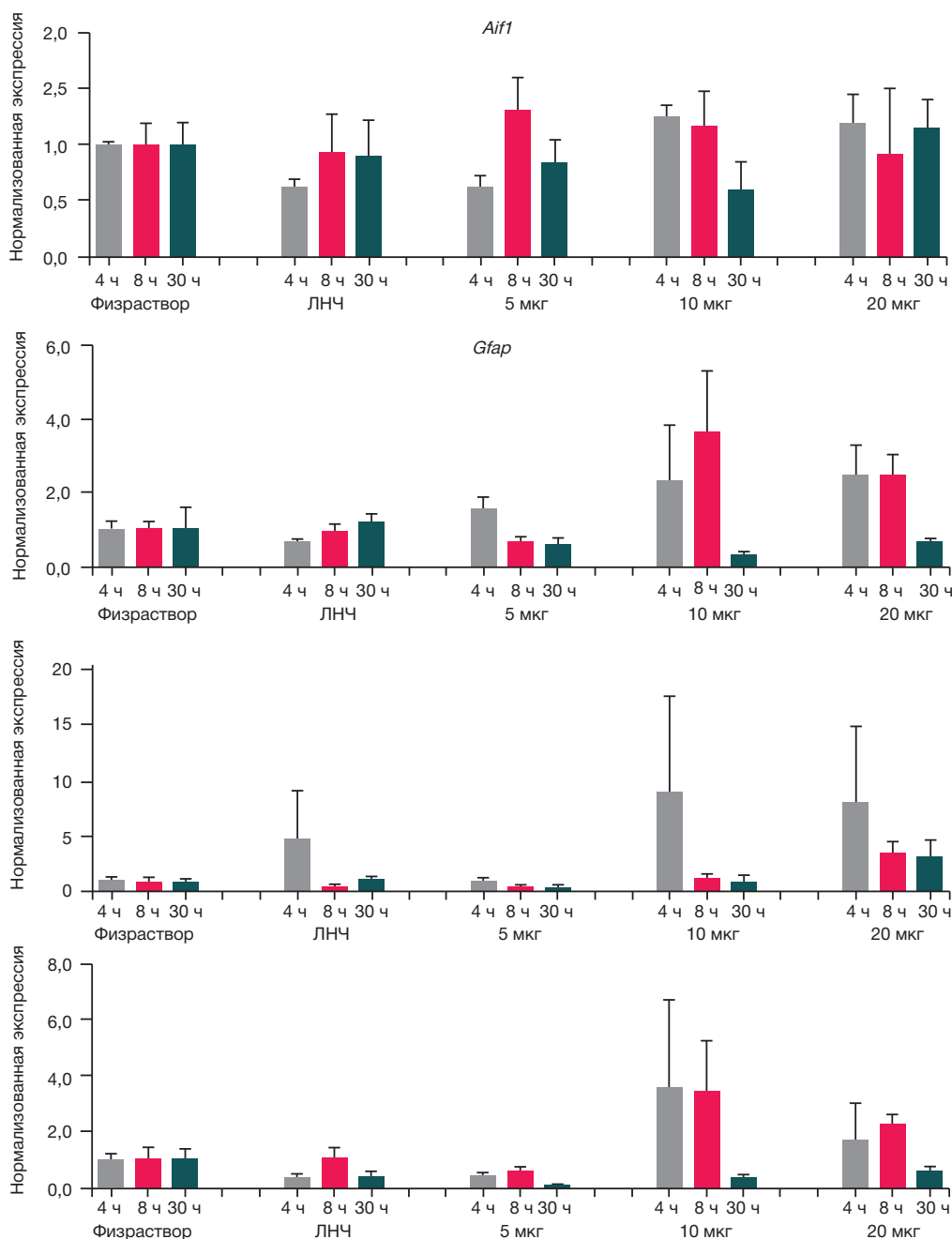


Рис. 3. Относительный уровень экспрессии генов провоспалительных цитокинов (*Il1β*, *Tnfa*) и маркеров активации глии (*Aif1*, *Gfap*) в префронтальной коре в различных временных точках после введения мРНК-ЛНЧ-вакцины

Экспрессию оценивали относительно мРНК гена домашнего хозяйства (*Gapdh*). Для постановки ПЦР использовали набор «БиоМастер HS-qPCR 2x» («Биолабмикс»; Россия) на амплификаторе Real-Time CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories; США) по протоколу: 95 °C в течение 15 с, 60 °C — 20 с. Для каждого образца кДНК все определения проводили в трех технических повторах. Для анализа количественной экспрессии был применен метод $\Delta\Delta Ct$.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с помощью дисперсионного анализа ANOVA (в качестве факторов были использованы «группа» и «время после введения») и Fisher's LSD в качестве post hoc анализа. Различия между экспериментальными группами считали статистически

значимыми при $p < 0,05$, на уровне тенденции — при $p < 0,1$. Анализ данных производили с помощью пакета программ Statistica 8.0 (Statsoft Inc.; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полученные результаты демонстрируют, что различные дозы мРНК-ЛНЧ вакцин индуцируют активацию экспрессии *Aif1* в гипоталамусе (рис. 2), но не в префронтальной коре (рис. 3). Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA позволил выявить достоверное влияние факторов «группа» и «время после введения» на экспрессию *Aif1* в гипоталамусе ($F(4,70) = 2,866$ при $p = 0,032$; $F(2,72) = 4,246$ при $p = 0,019$). У групп мышей с введением 10 мкг мРНК и 20 мкг РНК в составе мРНК-ЛНЧ-вакцины экспрессия мРНК *Aif1* была выше примерно на 80% через 8 ч после введения вакцины, чем у контрольной группы с введением

фосфатного буфера ($p > 0,05$). Интересно, что в группах с введением 5 мкг РНК в составе мРНК-ЛНЧ-вакцин и с пустыми ЛНЧ (без мРНК) также выявлено повышение экспрессии *Aif1* (на 40–55%) через 8 ч, однако эти различия были статистически недостоверны. Через 30 ч после введения вакцин различий в экспрессии *Aif1* гипоталамусе между животными разных групп не наблюдалось. Достоверного влияния фактора «группа» или взаимодействия факторов «группа» и «время после введения» не обнаружено ни на экспрессию других оцененных генов в гипоталамусе (*Tnfa*, *Il1 β* , *Gfap*), ни на экспрессию генов в префронтальной коре. Таким образом, мы наблюдали умеренное влияние мРНК-ЛНЧ на нейровоспаление, связанное с повышенной экспрессией маркеров активной микроглии в гипоталамусе, но не во фронтальной коре, и это влияние было дозозависимым.

Сравнение экспрессии генов в различных временных точках у животных разных групп после введения мРНК-ЛНЧ-вакцины показало, что экспрессия *Il1 β* была сильно повышена через 4 ч после вакцинации как в гипоталамусе, так и в префронтальной коре у некоторых животных из групп с введением 10 мкг мРНК и 20 мкг РНК в составе мРНК-ЛНЧ-вакцины, но в более поздних точках измерений эти эффекты не наблюдались. Несмотря на выраженные эффекты на *Il1 β* , эти различия не были статистически достоверными, поскольку лишь некоторые животные из групп имели выраженный ответ. Такие результаты свидетельствуют о гетерогенности ответа на мРНК-ЛНЧ-вакцину в зависимости от индивидуальных особенностей животных.

Мы нашли влияние фактора «время после введения» на экспрессию *Gfap* и *Tnfa* в гипоталамусе ($F(2,72) = 10,179$ при $p < 0,0001$; $F(2,72) = 5,181$ при $p = 0,008$). Экспрессия *Gfap* снижалась через 8 ч во всех экспериментальных группах, в то же время усиливалась через 30 ч. Интересно, что у большинства экспериментальных групп экспрессия *Tnfa* тоже усиливалась через 30 ч после вакцинации, по сравнению с уровнем, который наблюдали через 4 ч. Эти результаты позволяют предположить, что у мышей из экспериментальных групп развивается вторая волна провоспалительной активации, в которую вовлечены клетки астроглии и интерлейкин TNF α .

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты показали, что мРНК-ЛНЧ вакцины в дозе 10–20 мкг мРНК способны усиливать уровень экспрессии *Aif1* через 8 ч после вакцинации в гипоталамусе, но не в префронтальной коре. Мы обнаружили, что экспрессия *Gfap*, *Il1 β* , *Tnfa* в экспериментальных группах демонстрировала различия в уровне экспрессии в различных временных точках в гипоталамусе, что также является косвенным свидетельством того, что уровень экспрессии этих генов может коррелировать с фактом введения мРНК-ЛНЧ вакцин.

мРНК-ЛНЧ-вакцины способна вызвать как местное, так и системное воспаление [4, 8]. Воспаление может быть вызвано различными компонентами вакцины: молекулами мРНК, липидами, входящими в состав ЛНЧ, или белковым продуктом, кодируемым мРНК. мРНК-ЛНЧ в основном трансфецируют клетки вблизи места инъекции, после чего ЛНЧ быстро транспортируются в проксимальные лимфатические узлы путем пассивного дренирования, а также активно переносятся профессиональными антигенпрезентирующими клетками и нейтрофилами

[10, 11]. Затем мРНК-ЛНЧ через системный кровоток могут достичь любой клетки организма и в низких количествах обнаруживаются в головном мозге, что свидетельствует о ее способности преодолевать гематоэнцефалический барьер [12, 13].

Известно, что периферические воспалительные стимулы также могут вызывать иммунологический ответ в головном мозге, который приводит к активации клеток микроглии, являющихся основными иммунокомпетентными клетками головного мозга [14]. Благодаря своей цитокинсинтезирующей и фагоцитирующей активности они влияют на развитие и созревание структур ЦНС [15], участвуют в нормальном становлении и созревании нейронных цепей во время развития [16], поддерживают пул нейрональных клеток, опосредуют созревание и редукцию синапсов, регулируя количество синапсов и экспрессию рецепторов [17].

Таким образом, найденные нами признаки активации микроглии в некоторых экспериментальных группах могут быть как свидетельством прямого прохождения мРНК-ЛНЧ через гематоэнцефалический барьер и запуска процессов нейровоспаления, так и следствием усиления периферического воспаления. Поскольку в нашем исследовании мы не оценивали параметры периферической иммунной активации, мы не можем однозначно ответить на этот вопрос.

Получение достоверных различий по экспрессии *Aif1* через 8 ч после иммунизации согласуется с данными, которые демонстрируют, что пик активации микроглии приходится на период 6–24 ч после индукции воспаления [14, 18–20]. В то же время пик активации цитокинов после индукции воспалительными агентами, такими как бактериальный липополисахарид или синтетический аналог двухцепочечной РНК (Poly I:C), приходится на 1,5–3,0 после введения воспалительных миметиков [20]. Поэтому отсутствие значимых эффектов на экспрессию *Il1 β* и *Tnfa* между группами может быть связано с тем, что пик активации экспрессии этих генов уже пройден. В то же время ряд исследований демонстрирует, что повышенный уровень цитокинов на периферии и в головном мозге может сохраняться до 24 ч после индукции воспаления миметиками [18, 21].

В нашей работе мы оценивали экспрессию провоспалительных генов в двух структурах головного мозга. В гипоталамусе отмечены значительно более выраженные эффекты, в то время как в префронтальной коре никаких значимых изменений найдено не было. Гипоталамус является важной структурой мозга, которая функционирует как метаболический центр, регулирующий многие фундаментальные физиологические процессы, участвующие в метаболизме всего тела, включая восприятие питательных веществ, контроль аппетита, расход энергии; таким образом, гипоталамус играет решающую роль в системной гомеостатической регуляции [22]. Клинические данные показали, что различные стимулы, такие как периферическое воспаление или увеличение количества потребления насыщенных жирных кислот, могут привести к нейровоспалению в этой структуре мозга [23–25]. Кроме того, в гипоталамусе присутствуют различные популяции микроглиальных и астроглиальных клеточных популяций [26]. В совокупности эти данные свидетельствуют, что гипоталамус может являться своеобразным сенсором периферического воспаления и реагировать на провоспалительные сигналы более реактивно, чем префронтальная кора.

ВЫВОДЫ

мРНК-ЛНЧ-вакцина способна активировать экспрессию *Aif1* в гипоталамусе через 8 ч после вакцинации дозозависимым образом. В то же время в префронтальной коре значимого влияния мРНК-ЛНЧ-вакцин на экспрессию генов найдено не было. Несмотря на то что через 30 ч после вакцинации изменения в экспрессии *Aif1* были не значимы, эти результаты показывают, что мРНК-ЛНЧ-вакцина может индуцировать

нейровоспаление. Для понимания механизмов, за счет которых мРНК-ЛНЧ-вакцина стимулирует воспаление, необходимы дополнительные эксперименты на расширенных группах животных с оценкой параметров периферического воспаления и более широким спектром анализа нейровоспаления с привлечением иммуоферментных и иммуногистохимических методов для оценки провоспалительных агентов и морфологии микроглиальных клеток в гипоталамусе и других мозговых структурах.

Литература

1. Baden LR, et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med.* 2021; 384 (5): 403–16.
2. Polack FP, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med.* 2020; 383 (27): 2603–15.
3. Kon E, Elia U, Peer D. Principles for designing an optimal mRNA lipid nanoparticle vaccine. *Curr Opin Biotechnol.* 2022; 73: 329–36.
4. Ndeupen S, et al. The mRNA-LNP platform's lipid nanoparticle component used in preclinical vaccine studies is highly inflammatory. *iScience.* 2021; 24 (12): 103479.
5. Parhiz H. et al. Added to pre-existing inflammation, mRNA-lipid nanoparticles induce inflammation exacerbation (IE). *J Control Release.* 2022; 344: 50–61.
6. Mu X, Hur S. Immunogenicity of In Vitro-Transcribed RNA. *Acc Chem Res.* 2021; 54 (21): 4012–23.
7. Heil F. et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science.* 2004; 303 (5663): 1526–9.
8. Trougakos IP, et al. Adverse effects of COVID-19 mRNA vaccines: the spike hypothesis. *Trends Mol Med.* 2022; 28 (7): 542–54.
9. Reshetnikov VV, et al. Social defeat stress in adult mice causes alterations in gene expression, alternative splicing, and the epigenetic landscape of H3K4me3 in the prefrontal cortex: An impact of early-life stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2021; 106: 110068.
10. Bahl K, et al. Preclinical and Clinical Demonstration of Immunogenicity by mRNA Vaccines against H10N8 and H7N9 Influenza Viruses. *Mol Ther.* 2017; 25 (6): 1316–27.
11. Liang F, et al. Efficient Targeting and Activation of Antigen-Presenting Cells In Vivo after Modified mRNA Vaccine Administration in Rhesus Macaques. *Mol Ther.* 2017; 25 (12): 2635–47.
12. Maugeri M, et al. Linkage between endosomal escape of LNP-mRNA and loading into EVs for transport to other cells. *Nat Commun.* 2019; 10 (1): 4333.
13. Pardi N, et al. Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. *J Control Release.* 2015; 217: 345–1.
14. Hoogland IC, et al. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. *J Neuroinflammation.* 2015; 12: 114.
15. Bilimoria PM, Stevens B. Microglia function during brain development: New insights from animal models. *Brain Res.* 2015; 1617: 7–17.
16. Chen Z, et al. Microglial displacement of inhibitory synapses provides neuroprotection in the adult brain. *Nat Commun.* 2014; 5: 4486.
17. Ji K, et al. Microglia actively regulate the number of functional synapses. *PLoS One.* 2013; 8 (2): e56293.
18. Biesmans S, et al. Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013: 271359.
19. Buttini M, Limonta S, Boddeke HW. Peripheral administration of lipopolysaccharide induces activation of microglial cells in rat brain. *Neurochem Int.* 1996; 29 (1): 25–35.
20. Mutovina A, et al. Unique Features of the Immune Response in BTBR Mice. *Int J Mol Sci.* 2022; 23 (24).
21. Cunningham C, et al. The sickness behaviour and CNS inflammatory mediator profile induced by systemic challenge of mice with synthetic double-stranded RNA (poly I:C). *Brain Behav Immun.* 2007; 21 (4): 490–502.
22. Goldstein DS, Kopin IJ. Homeostatic systems, biocybernetics, and autonomic neuroscience. *Auton Neurosci.* 2017; 208: 15–28.
23. Burfeind KG, Michaelis KA, Marks DL. The central role of hypothalamic inflammation in the acute illness response and cachexia. *Semin Cell Dev Biol.* 2016; 54: 42–52.
24. Rahman MH, et al. Hypothalamic inflammation and malfunctioning glia in the pathophysiology of obesity and diabetes: Translational significance. *Biochem Pharmacol.* 2018; 153: 123–33.
25. de Git KC, Adan RA. Leptin resistance in diet-induced obesity: the role of hypothalamic inflammation. *Obes Rev.* 2015; 16 (3): 207–24.
26. Mendes NF, et al. Hypothalamic Microglial Heterogeneity and Signature under High Fat Diet-Induced Inflammation. *Int J Mol Sci.* 2021; 22 (5).

References

1. Baden LR, et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med.* 2021; 384 (5): 403–16.
2. Polack FP, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med.* 2020; 383 (27): 2603–15.
3. Kon E, Elia U, Peer D. Principles for designing an optimal mRNA lipid nanoparticle vaccine. *Curr Opin Biotechnol.* 2022; 73: 329–36.
4. Ndeupen S, et al. The mRNA-LNP platform's lipid nanoparticle component used in preclinical vaccine studies is highly inflammatory. *iScience.* 2021; 24 (12): 103479.
5. Parhiz H. et al. Added to pre-existing inflammation, mRNA-lipid nanoparticles induce inflammation exacerbation (IE). *J Control Release.* 2022; 344: 50–61.
6. Mu X, Hur S. Immunogenicity of In Vitro-Transcribed RNA. *Acc Chem Res.* 2021; 54 (21): 4012–23.
7. Heil F. et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science.* 2004; 303 (5663): 1526–9.
8. Trougakos IP, et al. Adverse effects of COVID-19 mRNA vaccines: the spike hypothesis. *Trends Mol Med.* 2022; 28 (7): 542–54.
9. Reshetnikov VV, et al. Social defeat stress in adult mice causes alterations in gene expression, alternative splicing, and the epigenetic landscape of H3K4me3 in the prefrontal cortex: An impact of early-life stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2021; 106: 110068.
10. Bahl K, et al. Preclinical and Clinical Demonstration of Immunogenicity by mRNA Vaccines against H10N8 and H7N9 Influenza Viruses. *Mol Ther.* 2017; 25 (6): 1316–27.
11. Liang F, et al. Efficient Targeting and Activation of Antigen-Presenting Cells In Vivo after Modified mRNA Vaccine Administration in Rhesus Macaques. *Mol Ther.* 2017; 25 (12): 2635–47.
12. Maugeri M, et al. Linkage between endosomal escape of LNP-mRNA and loading into EVs for transport to other cells. *Nat*

- Commun. 2019; 10 (1): 4333.
13. Pardi N, et al. Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. *J Control Release*. 2015; 217: 345–1.
 14. Hoogland IC, et al. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. *J Neuroinflammation*. 2015; 12: 114.
 15. Bilimoria PM, Stevens B. Microglia function during brain development: New insights from animal models. *Brain Res*. 2015; 1617: 7–17.
 16. Chen Z, et al. Microglial displacement of inhibitory synapses provides neuroprotection in the adult brain. *Nat Commun*. 2014; 5: 4486.
 17. Ji K, et al. Microglia actively regulate the number of functional synapses. *PLoS One*. 2013; 8 (2): e56293.
 18. Biesmans S, et al. Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. *Mediators Inflamm*. 2013; 2013: 271359.
 19. Buttini M, Limonta S, Boddeke HW. Peripheral administration of lipopolysaccharide induces activation of microglial cells in rat brain. *Neurochem Int*. 1996; 29 (1): 25–35.
 20. Mutovina A, et al. Unique Features of the Immune Response in BTBR Mice. *Int J Mol Sci*. 2022; 23 (24).
 21. Cunningham C, et al. The sickness behaviour and CNS inflammatory mediator profile induced by systemic challenge of mice with synthetic double-stranded RNA (poly I:C). *Brain Behav Immun*. 2007; 21 (4): 490–502.
 22. Goldstein DS, Kopin IJ. Homeostatic systems, biocybernetics, and autonomic neuroscience. *Auton Neurosci*. 2017; 208: 15–28.
 23. Burfeind KG, Michaelis KA, Marks DL. The central role of hypothalamic inflammation in the acute illness response and cachexia. *Semin Cell Dev Biol*. 2016; 54: 42–52.
 24. Rahman MH, et al. Hypothalamic inflammation and malfunctioning glia in the pathophysiology of obesity and diabetes: Translational significance. *Biochem Pharmacol*. 2018; 153: 123–33.
 25. de Git KC, Adan RA. Leptin resistance in diet-induced obesity: the role of hypothalamic inflammation. *Obes Rev*. 2015; 16 (3): 207–24.
 26. Mendes NF, et al. Hypothalamic Microglial Heterogeneity and Signature under High Fat Diet-Induced Inflammation. *Int J Mol Sci*. 2021; 22 (5).