



МЕЛЬНИЧУК

Наталія Сергіївна — кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник відділу ензимології білкового синтезу Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

ПРОТИВІРУСНА АКТИВНІСТЬ ОЛІГОРИБОНУКЛЕОТИДІВ ТА ЇХ КОМПЛЕКСІВ З D-МАНІТОЛОМ: МОЖЛИВІ МЕХАНІЗМИ ДІЇ ПРОТИ ВІРУСУ ГРИПУ ТА КОРОНАВІРУСУ

За матеріалами наукового повідомлення
на засіданні Президії НАН України
11 березня 2026 р.

У доповіді наведено результати дослідження впливу олігорибонуклеотидів (ОРН) та їх комплексів з D-манітолом (ОРН-D-M) на інфекційність вірусу грипу А H1N1, псевдотипованих лентивірусних частинок зі спайк-білком коронавірусу SARS-CoV-2 in vitro та індуковану експресію генів вродженого імунітету у відповідь на інфекцію вірусу грипу in vivo. Показано, що препарати ОРН мають пряму противірусну дію завдяки неспецифічній взаємодії з глікопротеїнами, гемаглютиніном вірусу грипу та спайк-білком коронавірусу. Виявлено модуляцію вродженої імунної відповіді на вірус грипу шляхом зв'язування ОРН та ОРН-D-M з толл-подібними рецепторами 3, 7 і 8. Запропоновано механізми дії природних ОРН та їх комплексів ОРН-D-M, які мають практичне застосування.

Ключові слова: олігорибонуклеотиди, комплекси олігорибонуклеотидів з D-манітолом, вірус грипу, гемаглютинін, коронавірус, спайк-білок, вроджена імунна відповідь.

Гострі респіраторні інфекції (ГРІ) є найпоширенішими захворюваннями людини, вони становлять майже 70 % усіх інфекційних захворювань. До 90 % населення планети хворіє хоча б на одну з цих інфекцій принаймні один раз на рік. ГРІ, спричинені вірусними або бактеріальними патогенами, іноді призводять до госпіталізації чи навіть смерті і є особливо небезпечними для маленьких дітей, людей похилого віку та інших груп високого ризику. Найпоширенішими вірусними етіологічними агентами ГРІ є віруси грипу А і В, коронавіруси людини, респіраторно-синцитіальний вірус та ін. Серед респіраторних вірусів особливе значення мають віруси грипу А та коронавіруси, оскільки вони можуть викликати як сезонні епідемії, так

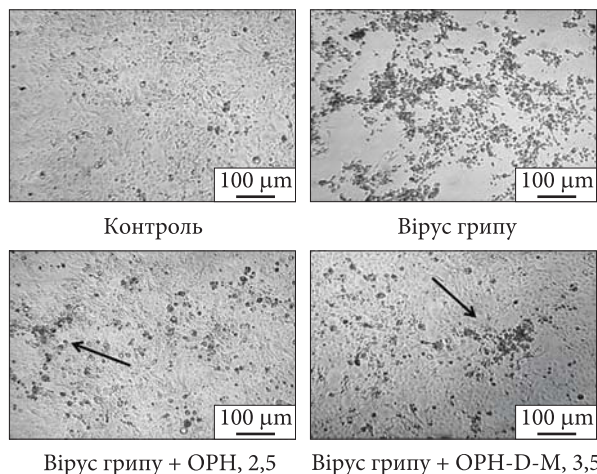


Рис. 1. Цитопатична дія (ЦПД) в культурі клітин, індукованої вірусом грипу А Н1N1, який попередньо інкубували з ОРН та ОРН-D-M, мг/мл. Стрілками позначено незначні ЦПД

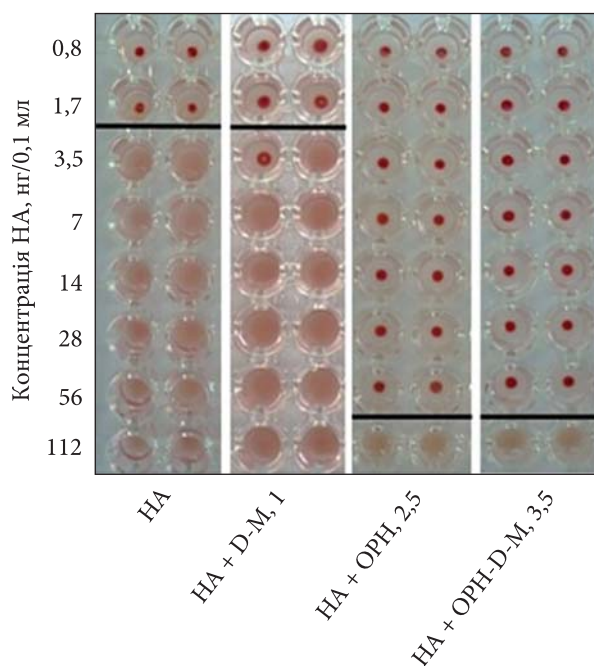


Рис. 2. Аглоутація людських еритроцитів 0 (I) HA, які попередньо інкубували з ОРН та ОРН-D-M, мг/мл

і глобальні пандемії, які супроводжуються численними летальними випадками та великими економічними втратами. Основною причиною смерті пацієнтів від цих вірусів є цитокіновий

шторм, який є результатом надмірної вродженої імунної відповіді клітин хазяїна на вірус. Тому для дослідників актуальним завданням є пошук препарату, який одночасно матиме протівірусну дію і зможе ослабити вірус-індуковану вроджену імунну відповідь.

Відомо, що природні олігорибонуклеотиди (ОРН), а саме тотальна РНК, виділена з дріжджів, у якій домінуючою фракцією є 3—6 нуклеотидів, мають протівірусну та протизапальну дію. Ми показали, що створені нашими колегами комплекси ОРН з D-манітолом (ОРН-D-M) мають кращу здатність взаємодіяти з деякими білками. ОРН-D-M можна застосовувати як ефективний протівірусний препарат проти респіраторних вірусів [1]. ОРН-D-M зареєстровані в Україні як лікарський засіб під комерційною назвою Нуклекс. Однак механізм одночасної протизапальної та протівірусної дії ОРН-D-M залишався незрозумілим.

Вірус грипу інфікує та пошкоджує переважно епітеліальні клітини дихальних шляхів *in vivo*. Однак він може також спричиняти загибель клітин *in vitro*. Ми припускали, що препарати ОРН (ОРН і ОРН-D-M) можуть безпосередньо впливати на вірус грипу, знижуючи інфікування клітин. З використанням МТТ-тесту було показано, що життєздатність грип-інфікованих епітеліальних клітин знижується на 49 % порівняно з контрольними клітинами *in vitro*. Проте життєздатність інфікованих епітеліальних клітин з вірусом грипу, який попередньо інкубували з ОРН та ОРН-D-M, була вищою на 38 і 43 % відповідно порівняно з контролем інфікованих клітин (рис. 1).

При цьому самі препарати не знижували життєздатність клітин порівняно з контролем. За допомогою аналізу TCD_{50} було виявлено достовірне зниження інфекційного титру вірусу грипу, який попередньо інкубували препаратами ОРН, порівняно з контролем вірусу грипу. Ґрунтуючись на отриманих результатах, було встановлено пряму інактивуючу дію ОРН та ОРН-D-M на вірус грипу А Н1N1 *in vitro* [2].

Гемаглютинин (HA), поверхневий білок вірусу грипу А, відповідає за прикріплення вірусних частинок до клітини шляхом зв'язування з

рецептором (гліканом) та проникнення віріона в клітину. Наступним нашим завданням було вивчити вплив ОРН та ОРН-D-M на утворення НА-гліканової взаємодії й охарактеризувати взаємодію ОРН та ОРН-D-M з НА. За допомогою реакції гемаглютинації було виявлено інгібувальний вплив препаратів ОРН на здатність вірусу грипу зв'язуватися з гліканами еритроцитів. А саме: ОРН та ОРН-D-M знижували гемаглютинуючий титр вірусу грипу у 2 і 4 рази відповідно порівняно з контролем вірусу грипу. Це свідчить, що, ймовірно, ОРН, зв'язуючись з НА вірусу грипу, інгібують утворення гемаглютинін-гліканових взаємодій [2].

У дослідженні ізольованого НА було виявлено, що його гемаглютинуючий титр після інкубації НА з ОРН та ОРН-D-M знизився в 32 рази порівняно з контролем (рис. 2).

За допомогою методу флуоресцентної спектроскопії спостерігали гасіння інтенсивності флуоресценції НА після титрування з ОРН та ОРН-D-M, яке вказує на взаємодію між НА та препаратами ОРН. З використанням даних флуоресценції було розраховано константи дисоціації НА з ОРН та їхніми комплексами з манітолом, які виявилися в мікромолярних концентраціях, вказуючи, що взаємодія НА з ОРН та ОРН-D-M відбувається неспецифічно з середньою афінністю (рис. 3).

Слід зазначити, що більш істотний вплив на НА мали комплекси олігорибонуклеотидів з D-манітолом. Ми припускаємо, що це пов'язано зі стабілізацією манітолом олігорибонуклеотидів.

Отримані результати засвідчили, що ОРН та ОРН-D-M пригнічують інфекційність вірусу грипу шляхом зв'язування з амінокислотами НА на або біля глікан-зв'язуючого регіону, змінюючи конформацію білка та ефективно запобігаючи НА-глікановій взаємодії [3].

Поверхневий білок віріонів SARS-CoV-2, так званий спайк-білок, необхідний для зв'язування та проникнення коронавірусу в клітину. Оскільки SARS-CoV-2 є біологічним агентом 3-го рівня біобезпеки і з ним можна працювати лише в лабораторіях BSL-3, ми згенерували спайк-псевдотиповані лентивірусні частинки

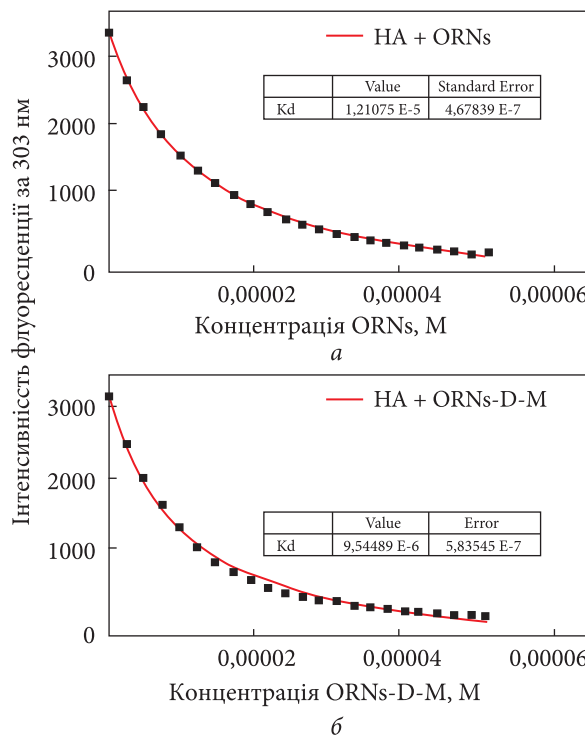


Рис. 3. Залежність інтенсивності флуоресценції НА від концентрації ОРН (а) та ОРН-D-M (б)

(S-псевдовірус) шляхом трансфікування епітеліальних клітин з плазмідним комплексом.

Було показано, що епітеліальні клітини, інфіковані створеним S-псевдовірусом, експресували ZsGreen та люциферазу — маркерні білки інфікування клітин цим вірусом. Спостерігали низьку флуоресценцію ZsGreen у клітинах, інфікованих S-псевдовірусом, який попередньо інкубували з ОРН, порівняно з контролем S-псевдовірусу (рис. 4а). Також виявлено, що попередня інкубація S-псевдовірусу з ОРН достовірно знижувала активність люциферази порівняно з контролем S-псевдовірусу (рис. 4б).

Отримані результати щодо зниження експресії ZsGreen та люциферази S-псевдовірусу препаратом ОРН вказують на те, що ОРН можуть пригнічувати інфекційність S-псевдовірусу, ймовірно через взаємодію зі спайк-білком, і мати анти-COVID-19 активність [4].

Раніше в численних дослідженнях було показано, що препарати ОРН мають протиза-

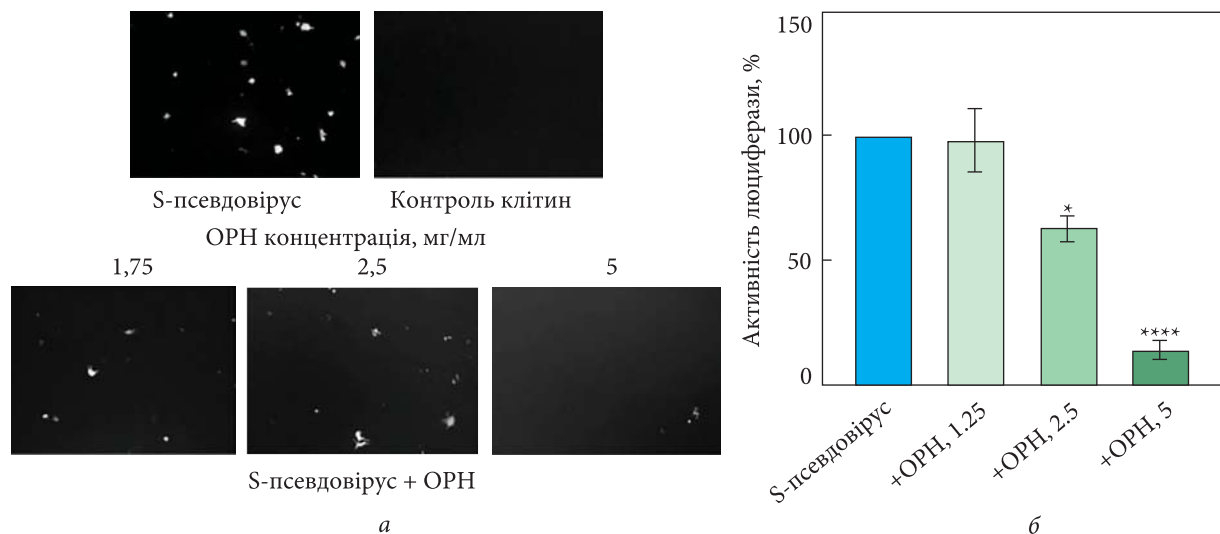


Рис. 4. Експресія ZsGreen (а) та активність люциферази (б) в епітеліальних клітинах через 48 год після інфікування S-псевдовірусом, який попередньо інкубували з ОРН, мг/мл: * — $p < 0,05$; **** — $p < 0,0001$ порівняно з S-псевдовірусом

пальну дію при захворюваннях неінфекційного походження. Припускали, що це може бути пов'язано з їхнім впливом на вроджену імунну відповідь.

Для того, щоб дослідити вплив препаратів ОРН на вроджену імунну відповідь, індуковану вірусом грипу, ми відібрали потенційні гени-мішені ОРН: інтерферон-стимульовані (*Oas1α*, *Oas2*, *Oas3*, *Mx1*, *Eif2ak2*), прооксидантні (*Xdh*, *Nos2*, *Arg2*) та цитокіни (*Ifnε*, *Ifnk*, *Ifnα2*, *Ifnβ1*, *Ifnγ*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*, *Il6*, *Il1β*, *Il12α*, *Tnfα*). Крім того, було відібрано гени транскрипційного фактора NF-κB (*Nfkb1* та *Nfkbia*), який, як відомо, в разі інфекції вірусу грипу надрегулює експресію генів вродженого імунітету, а також гени толл-подібних рецепторів (*Tlr3*, *Tlr7* та *Tlr8*), які зв'язуються з нуклеїновою кислотою вірусу грипу, екзогенними олігонуклеотидами та активують вроджену імунну відповідь на вірус грипу.

Зміни експресії генів вивчали на моделі гриппозної пневмонії у мишей за профілактичною (препарати ОРН вводили мишам за 24 год перед інфікуванням вірусом грипу) та лікувальною (препарати вводили через 24 год після інфікування) схемами. За допомогою ПЛР у режимі реального часу було виявлено істотне

підвищення відносної експресії всіх досліджуваних генів у мишей після 48-годинної інфекції вірусу грипу (рис. 5).

Введення препаратів ОРН та ОРН-D-M за профілактичною та лікувальною схемами застосування знижувало підвищений рівень мРНК цих генів, індукований вірусом грипу (рис. 5).

Аналізуючи результати досліджень експресії генів, ми дійшли висновку, що в разі інфікування вірусом грипу пригнічення гіперекспресії *Tlr3*, *Tlr7*, *Tlr8* препаратами ОРН та ОРН-D-M приводить до інгібування експресії TLR-стимульованих генів вродженого імунітету, таких як цитокіни, інтерферон-стимульовані та прооксидантні гени. Модуляція вродженої імунної відповіді на вірус грипу шляхом зв'язування ОРН з толл-подібними рецепторами 3, 7 та 8 вказує на непряму противірусну дію ОРН [5].

Отже, проведені дослідження поглиблюють розуміння механізму дії природних ОРН проти вірусу грипу та коронавірусу. Середньо-афінна взаємодія ОРН з глікопротеїнами вірусу грипу та коронавірусу розкриває механізм противірусної дії ОРН проти широкого спектру вірусів, що має практичне застосування. Отримані результати щодо модуляції вродже-

Гени										
Толл-подібних рецепторів	<i>Tlr3</i>	1	1	1	3	2	2	2	3	
	<i>Tlr7</i>	0.28	0.17	0.21	1	0.50	0.40	0.50	0.90	
	<i>Tlr8</i>	0.021	0.027	0.023	0.12	0.054	0.050	0.073	0.090	
Транскрипційного фактору NF-κB	<i>Nfkb1</i>	0.17	0.12	0.20	0.50	0.16	0.23	0.18	0.25	
	<i>Nfkbia</i>	6	3	6	24	8	7	8	13	
	<i>Il6</i>	0.008	0.003	0.0010	2	0.60	0.28	0.60	0.60	
	<i>Il1β</i>	3	5	0.90	152	17	6	10	22	
	<i>Il12a</i>	0.008	0.040	0.020	0.40	0.030	0.070	0.16	0.23	
	<i>Tnfa</i>	0.100	0.30	0.20	16	7	8	5	8	
Цитокінів	<i>Ccl3</i>	0.25	0.15	0.15	52	7	12	33	30	
	<i>Ccl4</i>	0.50	0.30	0.20	75	28	16	22	35	
	<i>Ccl5</i>	3	19	12	253	26	29	36	34	
	<i>Cxcl9</i>	0.040	1	0.12	16	4	3	3	6	
	<i>Cxcl10</i>	1	2	0.32	746	155	175	66	94	
	<i>Cxcl11</i>	0.010	0.30	0.030	86	13	12	6	22	
	<i>Ifna2</i>	0.050	0.0002	0.0003	0.27	0.23	0.16	0.080	0.040	
	<i>Ifnβ1</i>	0.010	0.070	0.24	4	0.90	0.50	2	0.50	
	<i>Ifny</i>	0.060	0.12	0.030	2	0.50	0.40	0.30	0.80	
	Інтерферон-стимульованих	<i>Mx1</i>	0.60	0.30	0.30	93	31	27	36	18
		<i>Oas1a</i>	1	4	1	83	47	15	18	19
<i>Oas2</i>		0.17	0.30	0.100	21	1	0.90	1	2	
<i>Oas3</i>		0.18	0.20	0.020	32	4	2	3	6	
<i>Rnase1</i>		1	0.50	1	1	0.66	0.80	1	1	
<i>Eif2ak2</i>		1	1.00	0.60	14	8	5	5	4	
Прооксидантів	<i>Xdh</i>	2	3	2	29	8	12	11	15	
	<i>Nos2</i>	0.050	0.060	0.20	0.40	0.100	0.14	0.18	0.25	
	<i>Arg2</i>	0.80	0.50	0.30	2	2	1	2	2	
		Контроль	ОРН	ОРН-D-M	Грип	ОРН+Грип	ОРН-D-M+Грип	Грип+ОРН	Грип+ОРН-D-M	

Рис. 5. Рівень мРНК досліджуваних генів у легнях мишей через 48 год після інфікування вірусом грипу А Н1N1 та профілактичного або лікувального введення ОРН (15 мг/кг) і ОРН-D-M (21 мг/кг)

ної імунної відповіді на вірус грипу терапевтичними ОРН шляхом впливу на толл-подібні рецептори можуть забезпечити нормалізацію компонентів вродженого імунітету (зокрема, цитокінового профілю) при гострому токсичному ураженні печінки, цукровому діабеті II типу, ВІЛ-інфекції, гострому інфаркті міокар-

да. Результати, що стосуються змін експресії генів вродженого імунітету під дією вірусу грипу та ОРН, стали підґрунтям для виявлення кандидатів-біомаркерів для діагностики гіперзапалення, гіперкоагуляції, індукованих SARS-CoV-2, та оцінки ефективності терапії у пацієнтів з тяжким перебігом COVID-19 [6].

REFERENCES

1. Melnichuk N., Zarubaev V., Iosyk I., Andreychyn M., Semernikova L., Tkachuk Z. Pre-clinical and clinical efficiency of complexes of oligoribonucleotides with D-mannitol against respiratory viruses. *Pharmaceutics*. 2018. **10**(2): 59. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020059>
2. Melnichuk N., Semernikova L., Tkachuk Z. Complexes of oligoribonucleotides with D-mannitol inhibit hemagglutinin–glycan interaction and suppress influenza A virus H1N1 (A/FM/1/47) infectivity *in vitro*. *Pharmaceutics*. 2017. **10**(3): 71. <https://doi.org/10.3390/ph10030071>
3. Tkachuk Z., Melnichuk N., Nikolaiev R., Szutkowski K., Zhukov I. The Natural Oligoribonucleotides Functionalized by D-Mannitol Affected Interactions of Hemagglutinin with Glycan Receptor Indicating Anti-Influenza Activity. *Membranes*. 2021. **11**(10): 757. <https://doi.org/10.3390/membranes11100757>
4. Melnichuk N., Drabikowski K., Zhukov I., Tkachuk Z. Inhibitory effect of oligoribonucleotides on interaction of SARS-CoV-2 Spike pseudotyped lentiviral particles with host cells. *FEBS Open Bio*. 2024. **14**(2): 425. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13837>
5. Melnichuk N., Kashuba V., Rybalko S., Tkachuk Z. Complexes of oligoribonucleotides with D-mannitol modulate the innate immune response to influenza A virus H1N1 (A/FM/1/47) *in vivo*. *Pharmaceutics*. 2018. **11**(3): 73. <https://doi.org/10.3390/ph11030073>
6. Melnichuk N.S., Kashuba V.I., Tukalo M.A., Okhrimenko P.M., Demchyna I.V., Tkachuk Z.Yu. Altered expression of genes related to inflammation and coagulation in peripheral blood mononuclear cells of patients with severe COVID-19. *Biopolym. Cell*. 2025. **41**(3): 210. <https://doi.org/10.7124/bc.000B1D>

Nataliia S. Melnichuk

Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2744-9110>

ANTIVIRAL ACTIVITY OF OLIGORIBONUCLEOTIDES

AND THEIR COMPLEXES WITH D-MANNITOL:

POSSIBLE MECHANISMS OF ACTION AGAINST INFLUENZA VIRUS AND CORONAVIRUS

According to the materials of report at the meeting of the Presidium of the NAS of Ukraine, March 11, 2026

The report presents the research findings on the effect of oligoribonucleotides (ORNs) and their complexes with D-mannitol (ORNs-D-M) on the infectivity of influenza A H1N1 virus, pseudotyped lentiviral particles with the Spike protein of the SARS-CoV-2 coronavirus *in vitro* and induced expression of innate immunity genes in response to influenza virus infection *in vivo*. It has been shown that ORNs drugs have a direct antiviral effect by nonspecific interaction with glycoproteins, the hemagglutinin of influenza virus and the Spike protein of coronavirus. Modulation of the innate immune response to influenza virus by binding of ORNs and ORNs-D-M to Toll-like receptors 3, 7 and 8 was investigated. Mechanisms of action of natural oligoribonucleotides and their complexes with D-mannitol, a drug with practical application, are proposed.

Keywords: oligoribonucleotides, complexes of oligoribonucleotides with D-mannitol, influenza virus, hemagglutinin, coronavirus, Spike protein, innate immune response.

Cite this article: Melnichuk N.S. Antiviral activity of oligoribonucleotides and their complexes with D-mannitol: possible mechanisms of action against influenza virus and coronavirus (according to the materials of report at the meeting of the Presidium of the NAS of Ukraine, March 11, 2026). *Visn. Nac. Akad. Nauk Ukr.* 2026. (6): 67–72. <https://doi.org/10.15407/visn2026.06.067>