

ISSN 0132-3423

Том 49, Номер 6

Ноябрь - Декабрь 2023



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 49, номер 6, 2023

Статьи журнала по соглашению авторов с компанией Pleiades Publishing, Ltd. публикуются на английском языке в журнале "Russian Journal of Bioorganic Chemistry" ISSN 1068-1620, ©Pleiades Publishing, Ltd.

Механизмы адаптации бактерий к стрессовым условиям посредством малых некодирующих РНК (обзорная статья)

А. С. Карпов, Д. А. Елкина, Т. С. Орецкая, Е. А. Кубарева 555

Радиофармацевтические препараты для диагностики злокачественных новообразований, неспецифичных к глюкозе (обзорная статья)

Е. Д. Белицкая, В. А. Димитрева, А. Н. Козлов, В. А. Олейников, А. В. Залыгин 575

Терапевтические нуклеиновые кислоты против вирусов простого герпеса (обзорная статья)

А. С. Левина, М. Н. Репкова, В. Ф. Зарытова 591

Химический состав молока человека и млекопитающих (обзорная статья)

Ш. Ф. Каримова, Г. О. Исмаилова 611

ТБ-ИЗАТЕСТ: способ дифференциальной диагностики *Mycobacterium tuberculosis* методом LAMP

Ф. В. Шириков, Ю. А. Беспятых 627

ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

Биочип с ячейками из щеточных полимеров с реактивными карбоксильными группами для анализа ДНК

Р. А. Мифтахов, А. Ю. Иконникова, В. А. Василиков, С. А. Лапа, А. И. Левашова, В. Е. Кузнецова, В. Е. Шершов, А. С. Заседателев, Т. В. Наседкина, А. В. Чудинов 641

Синтез флуоресцентно-меченых нуклеотидов для маркирования продуктов изотермической амплификации

В. Е. Шершов, С. А. Лапа, А. И. Левашова, И. Ю. Шишкин, Г. Ф. Штылев, Е. Ю. Шекалова, В. А. Василиков, А. С. Заседателев, В. Е. Кузнецова, А. В. Чудинов 649

Синтез и оценка противовирусной активности 5-галоген-2'-азидопроизводных цитидина и N-гидроксцитидина на панели РНК-вирусов, включая SARS-CoV-2

П. Н. Камзеева, Е. С. Колпакова, Е. В. Карпова, М. О. Бородулина, Е. В. Яковчук, В. А. Алферова, А. А. Чистов, Е. С. Беляев, Л. И. Козловская, А. В. Аралов 657



УДК 577.218

МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ БАКТЕРИЙ К СТРЕССОВЫМ УСЛОВИЯМ ПОСРЕДСТВОМ МАЛЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК

© 2023 г. А. С. Карпов*, Д. А. Елкина**, Т. С. Орецкая**, #, Е. А. Кубарева**

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1

**Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1

Поступила в редакцию 02.02.2023 г.

После доработки 16.02.2023 г.

Принята к публикации 17.02.2023 г.

В большей части генома бактерий закодированы те или иные белковые молекулы, однако с развитием транскриптомных технологий было обнаружено множество генов, на которых транскрибируются РНК, не транслирующиеся в белки. Такие РНК называют некодирующими (нкРНК). Исследование свойств нкРНК показывает, что данные молекулы часто выступают в качестве регуляторов в различных клеточных процессах: поддержании гомеостаза клеточной стенки, защите от патогенов, вирулентности и т.д. Особое место среди них занимают так называемые малые нкРНК длиной ~50–300 нт. В большинстве случаев они образуют дуплексы с мРНК определенных генов, что влияет на экспрессию последних, однако некоторые нкРНК способны напрямую связываться с белком-мишенью. Подобные механизмы действия малых нкРНК дают им некоторые преимущества при регулировании различных клеточных процессов по сравнению с регуляторными молекулами белковой природы. Так, например, при ответе на внешний или внутренний сигнал посредством малых нкРНК клетке потребуется потратить меньше времени и ресурсов за счет отсутствия этапа трансляции. Более того, некоторые нкРНК обладают не полной комплементарностью к своим РНК-мишеням, что делает регуляцию более гибкой, т.к. это позволяет нкРНК участвовать в ответе одновременно на различные клеточные сигналы. В представленном обзоре рассмотрены общие механизмы, по которым различные малые нкРНК позволяют бактериям адаптироваться к тем или иным стрессовым условиям, а также конкретные примеры их действия в различных прокариотических организмах.

Ключевые слова: бактериальные малые некодирующие РНК, антисмысловые нкРНК, модифицирующие нкРНК, стрессовые условия, регуляция экспрессии генов

DOI: 10.31857/S0132342323060088, **EDN:** EXNMOS

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	555
МАЛЫЕ НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК	556
АНТИСМЫСЛОВЫЕ нкРНК	556
Общие механизмы действия антисмысловых нкРНК.....	556
Участие цис-кодируемых антисмысловых нкРНК в адаптации к стрессовым условиям.....	559
Участие транс-кодируемых антисмысловых нкРНК в адаптации к стрессовым условиям	562
МОДИФИЦИРУЮЩИЕ нкРНК	566

Общие механизмы действия модифицирующих нкРНК	566
Участие модифицирующих нкРНК в адаптации к стрессовым условиям	566
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	570
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	571

ВВЕДЕНИЕ

Согласно центральной догме молекулярной биологии, впервые предложенной Френсисом Криком в 1958 г., РНК — это копия участков ДНК, служащая для последующего синтеза на ее основе белков; при этом информация от генов к белкам передается исключительно в последовательности ДНК → РНК → белок [1]. По мере изучения мира РНК в научном сообществе из центральной догмы родилась концепция, согласно которой роль молекул РНК многогранна. Прежде

Сокращения: нкРНК — некодирующие РНК; пРНК — РНК-продукты; РНКП — РНК-полимераза; ШД — последовательность Шайна–Дальгарно; Еσ⁷⁰ — холофермент РНКП с σ⁷⁰-субъединицей.

Автор для связи: (тел.: +7 (916) 206-41-02; эл. адрес: oretskaya@belozersky.msu.ru).

всего, это участие в процессе экспрессии генов в качестве переносчика информации — данная роль принадлежит мРНК. В свою очередь, тРНК и рРНК выполняют роль вспомогательных молекул в процессе биосинтеза белков в цитоплазме. Такие РНК назвали некодирующими (нкРНК), т.к. они не выступают матрицей для синтеза тех или иных белков. Однако к 2000 г. в клетках *Escherichia coli* было обнаружено еще 10 нкРНК [2], выполняющих различные функции: терминацию трансляции [3], посттрансляционную регуляцию экспрессии генов [4], процессинг тРНК [5] и др. Такое разнообразие относительно небольшого количества известных на тот момент нкРНК вызвало большой интерес со стороны ученых и заставило изменить взгляд на устоявшуюся концепцию, согласно которой функции РНК в клетках распределены только между мРНК, тРНК и рРНК. Позднее развитие биоинформатических технологий, позволивших сравнивать геномы, в том числе прокариот, привело к открытию у них большого количества нкРНК. Исследование функций некоторых нкРНК показало, что они напрямую или опосредованно вовлечены во многие жизненные процессы бактерий, включая адаптацию к различным стрессовым условиям [6].

МАЛЫЕ НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК

Наиболее многочисленная группа нкРНК бактерий — малые некодирующие РНК, представляющие собой преимущественно относительно короткие транскрипты (~50–300 нт). Способы, которыми они помогают прокариотическим клеткам приспособиться к тем или иным стрессовым условиям, также достаточно разнообразны. Малые нкРНК могут участвовать в регуляции экспрессии белков как на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях, так и напрямую влиять на их способность выполнять свои функции. В механизмы адаптации бактерий к стрессовым условиям вовлечены малые нкРНК, которые можно разделить на два класса: антисмысловые (вливают на экспрессию целевых мРНК) и модифицирующие (напрямую взаимодействуют с целевыми белками). Роль малых нкРНК в метаболизме бактерий была подробно рассмотрена в обзорной статье Ажикиной и соавт. (2015 г.) [7].

В нашем обзоре представлены предлагаемые на сегодняшний день общие механизмы, по которым различные малые нкРНК позволяют бактериям адаптироваться к тем или иным стрессовым условиям, а также детально описаны некоторые конкретные примеры их действия в различных прокариотических организмах.

АНТИСМЫСЛОВЫЕ нкРНК

Общие механизмы действия антисмысловых нкРНК

Антисмысловые нкРНК [8] (или просто антисмысловые РНК, как следует из названия) комплементарны смысловой кодирующей цепи гена (а значит, и его мРНК), в регуляции экспрессии которого они участвуют. Так, сам процесс транскрипции антисмысловой нкРНК может ингибировать экспрессию целевых генов за счет механизма транскрипционной интерференции. Во-первых, остановка транскрипции целевого гена может произойти из-за коллизии (столкновения) двух молекул РНК-полимеразы (РНКП) (рис. 1а). В этом случае промоторы целевого гена и гена антисмысловой РНК находятся на противоположных цепях геномной ДНК, и, следовательно, две молекулы РНКП движутся навстречу друг другу. При этом коллизия не обязательно выражается в прямом столкновении транскрипционных комплексов, это могут быть также дальние электростатические взаимодействия или нарушение суперскрученности ДНК. В конечном итоге это приводит к подавлению транскрипции с наиболее “слабого” из промоторов [9]. Во-вторых, может иметь место окклюзия промотора целевого гена. Движущаяся с более “сильного” промотора гена антисмысловой нкРНК РНКП может затормозиться, например, из-за Rho-зависимой терминации в месте расположения более “слабого” промотора целевого гена. Это будет препятствовать взаимодействию с ним другой молекулы РНКП и образованию транскрипционного комплекса из-за стерических затруднений, что приводит к ингибированию экспрессии целевого гена [10] (рис. 1б). В-третьих, инициаторный комплекс, образовавшийся на более “слабом” промоторе целевого гена, может быть устранен с ДНК еще до начала элонгации за счет движения РНКП, транскрибирующей ген антисмысловой РНК с более “сильным” промотором [11] (рис. 1в). Данный механизм назван “сидящая утка”, и, согласно математическому моделированию, это наиболее вероятный способ подавления транскрипции целевого гена, когда оба промотора расположены близко или обеспечивают примерно равную эффективность транскрипции [12].

Регуляция на уровне транскрипции целевого гена, опосредованная антисмысловой нкРНК, может осуществляться также через механизм аттенуации (рис. 2). Антисмысловая нкРНК связывается с 5'-концом мРНК, что приводит к образованию терминаторной петли. Эта петля препятствует движению РНКП и ингибирует тем самым транскрипцию целевого гена. По такому механизму может происходить дифференциация эффективности транскрипции генов, находящихся в одном опероне, если антисмысловая

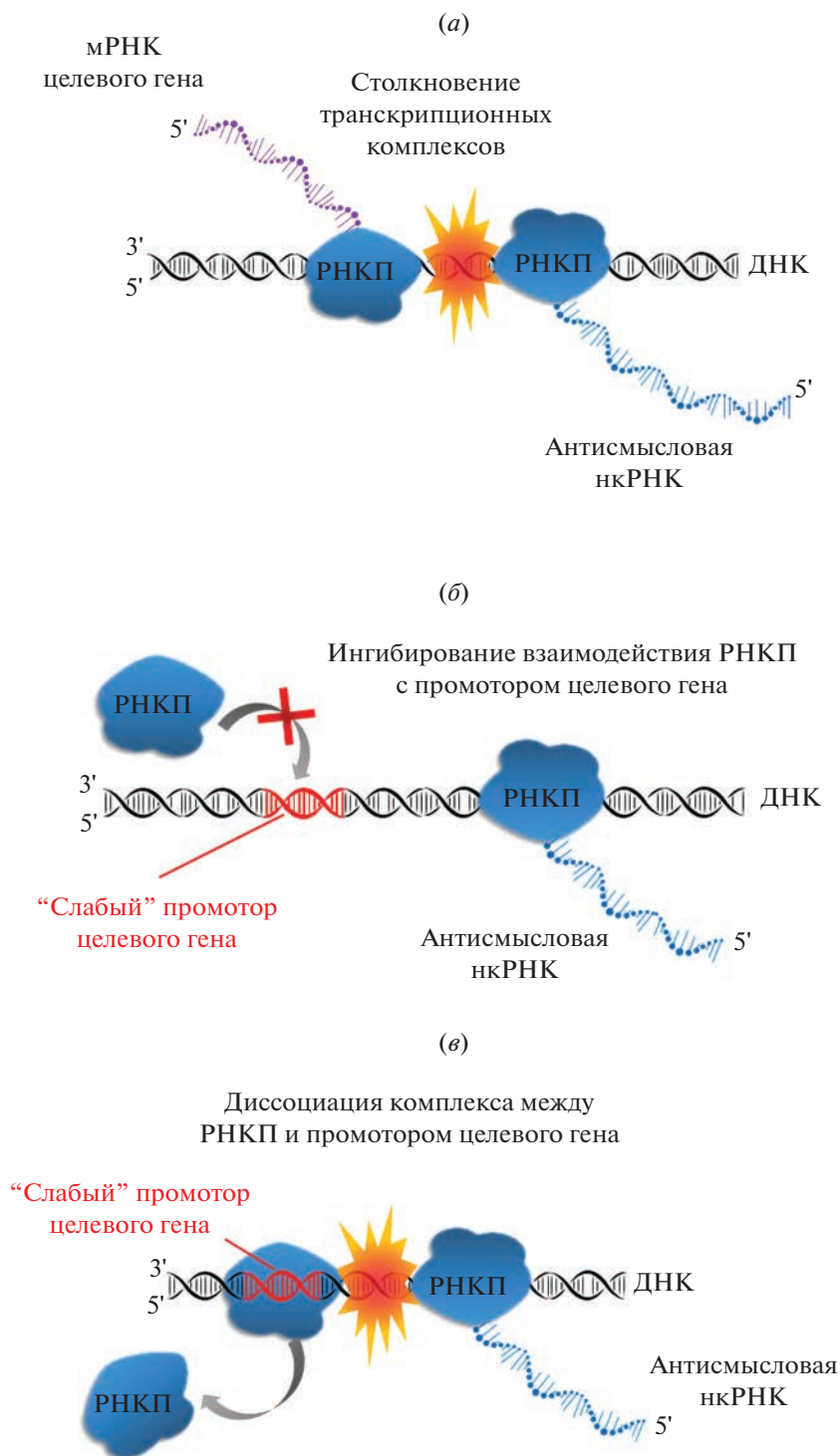


Рис. 1. Регуляция экспрессии целевого гена с участием гена антисмысловой нкРНК на этапе транскрипции: (а) — механизм транскрипционной интерференции; (б) — механизм окклюзии промотора целевого гена; (в) — механизм “сидящей утки”. Столкновение транскрипционных комплексов проиллюстрировано в виде оранжевого многоугольника.

РНК связывается с межгенным участком полицистронной мРНК [13]. Также было показано, что в некоторых случаях антисмысловые нкРНК способ-

ствуют транскрипции целевого гена [14]. Образование дуплекса между антисмысловой нкРНК и 5'-некодирующей частью мРНК препятствует прежде-

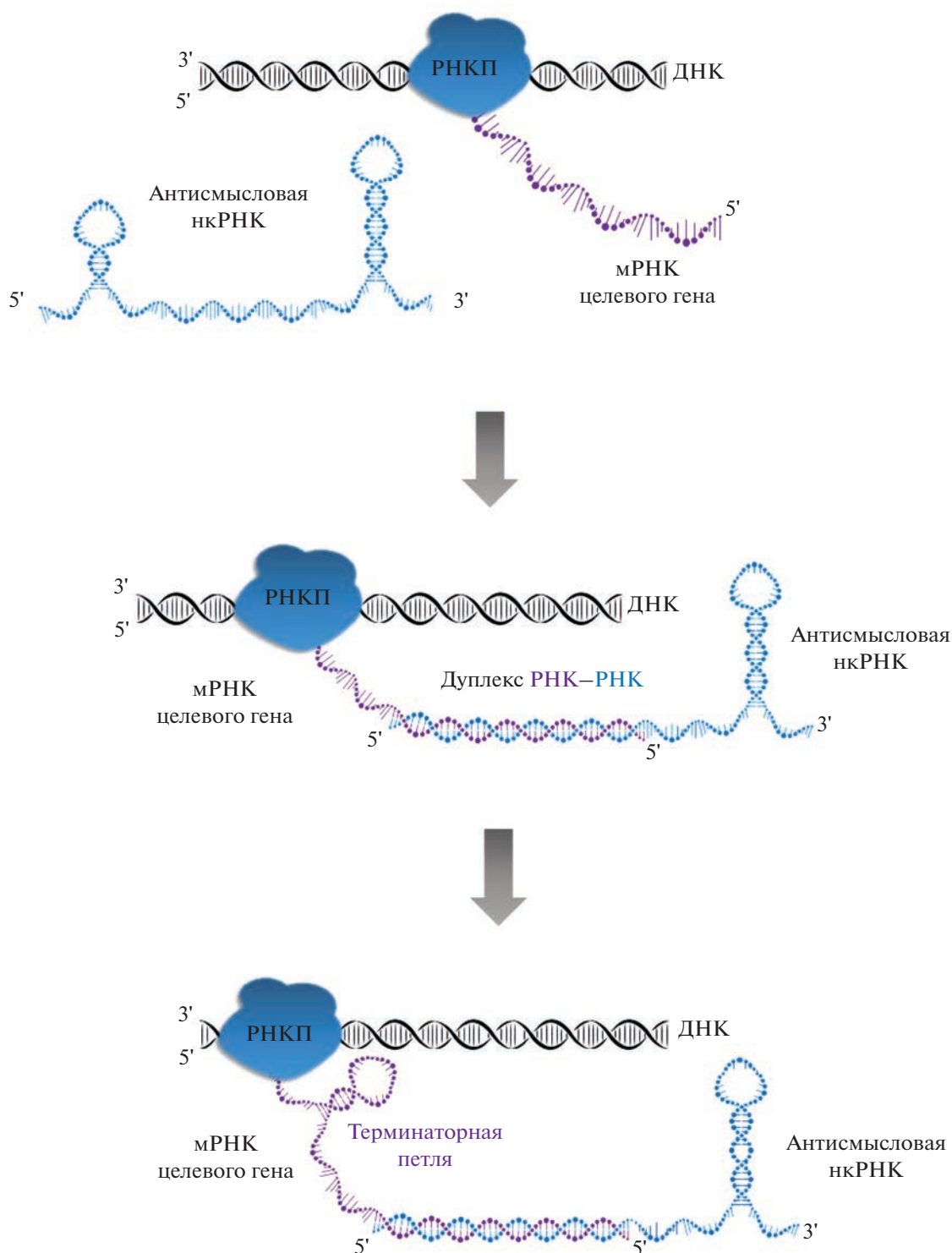


Рис. 2. Механизм аттенюации, опосредованный действием антисмысловой нкРНК.

временной Rho-зависимой терминатии транскрипции, что положительно влияет на экспрессию целевого гена.

Наиболее часто антисмысловые РНК регулируют экспрессию целевых генов на посттран-

крипционном уровне, причем как в сторону уменьшения, так и в сторону увеличения синтеза белка. Связывание антисмысловой нкРНК с целевой мРНК меняет вторичные структуры обеих молекул, приводя к образованию РНК-РНК-

дуплекса. В конечном итоге такое взаимодействие приводит к полному или частичному разрушению целевой мРНК рибонуклеазами и, как следствие, к уменьшению экспрессии гена [15]. Также антисмысловая нкРНК может связаться с участком мРНК, включающим последовательность Шайна–Дальгарно (ШД) и стартовый кодон, что затрудняет связывание рибосомы и приводит к невозможности инициации трансляции [16]. В то же время взаимодействие антисмысловой нкРНК с целевой мРНК может привести к обратному эффекту: стабилизации мРНК или образованию структуры, высвобождающей последовательность ШД [17].

Участие цис-кодируемых антисмысловых нкРНК в адаптации к стрессовым условиям

Антисмысловые нкРНК по своей природе разделяют на *цис*- и *транс*-кодируемые. мРНК генов синтезируются на матричных цепях ДНК, при этом *цис*-кодируемые антисмысловые нкРНК, участвующие в регуляции этих генов, транскрибируются в том же локусе, но на противоположных (кодирующих) цепях ДНК. Такой способ синтеза придает *цис*-кодируемой антисмысловой РНК сразу несколько особенностей. Во-первых, обеспечивается образование очень стабильного РНК–РНК-дуплекса за счет полной или довольно высокой степени комплементарности между нкРНК и мРНК-мишенью, и, таким образом, отпадает необходимость в белках-посредниках, способствующих указанному взаимодействию между молекулами РНК. Во-вторых, синтез *цис*-кодируемой антисмысловой РНК предполагает наличие чаще всего только одной мишени мРНК и, следовательно, более специфичную регуляцию. В-третьих, обеспечивается эволюционное преимущество бактерии, т.к. она может развивать новые пути регуляции важных жизненных процессов, не прибегая к увеличению размера генома. Более того, рассматриваемое место синтеза антисмысловой нкРНК способствует повышенной локальной концентрации этой регуляторной молекулы, что увеличивает скорость отклика клетки на различные стрессовые сигналы. Как правило, *цис*-кодируемые антисмысловые нкРНК вовлечены в регуляцию копийности плазмид [18], транспозицию или конъюгацию [19, 20]. Однако последние исследования указывают на их более разнообразную роль в жизнедеятельности бактерий.

Влияние нкРНК AscarD на рост клеток *Mycobacterium tuberculosis* при недостатке питательных веществ. В отсутствие достаточного количества питательных веществ в окружающей среде бактерии испытывают стресс, который выражается в замедлении их жизнедеятельности за счет уменьшения объемов трансляции белков. Один из способов достижения такого эффекта — снижение

уровня синтеза рРНК. Такой результат по-разному достигается у различных проکاریот.

РНКП бактерии *M. tuberculosis* обычно неэффективно образуют инициаторные комплексы с промоторами генов. Эти комплексы нестабильны и быстро диссоциируют [21]. Чтобы преодолеть этот процесс, клетка синтезирует различные транскрипционные факторы, один из которых — CarD. Этот белок выполняет две функции: связывается с закрытым комплексом РНКП с промотором, чтобы облегчить расплетание участка ДНК, а затем взаимодействует с открытым комплексом, чтобы предотвратить его разрушение [22]. Изначально предполагалось, что CarD ингибирует транскрипцию генов рРНК, т.к. его экспрессия увеличивается при недостатке питательных веществ [23]. Однако впоследствии было продемонстрировано, что CarD положительно влияет на экспрессию генов рРНК [24], что создавало противоречие. Последние исследования опровергли изначальную гипотезу, показав, что трансляция CarD негативно регулируется *цис*-кодируемой антисмысловой нкРНК [25], названной AscarD.

Когда в окружающей среде присутствует достаточное количество питательных веществ, *M. tuberculosis* использует фактор CarD для эффективного образования транскрипционных комплексов, необходимых для синтеза рРНК. Это в конечном итоге обеспечивает стабильный клеточный рост. Эффективность транскрипции нкРНК AscarD при этом невысока (рис. 3а). Однако, когда уровень питательных веществ во внешней среде уменьшается, начинается активный синтез нкРНК AscarD, образующей дуплекс с мРНК гена *carD*, что приводит к ингибированию трансляции последней. Помимо этого, уже синтезированный CarD подвергается деградации протеиназой Clp. В результате количество транскрипционного фактора поддерживается на низком уровне в течение стрессового периода. В конечном итоге совместное действие антисмысловой нкРНК AscarD и протеиназы Clp приводит к снижению транскрипционной и трансляционной активности в *M. tuberculosis*. Это дает бактерии возможность пережить неблагоприятные условия (рис. 3б). Как только содержание питательных веществ возвращается в норму, уровень транскрипции нкРНК AscarD снижается, и трансляция белка CarD возобновляется, способствуя активному росту клетки.

Системы токсин–антитоксин на основе *цис*-кодируемых нкРНК. Стрессовые воздействия на клетку могут привести к нарушению целостности геномной ДНК. Такие события чрезвычайно опасны для одноклеточных организмов, поэтому в случае повреждения ДНК необходимо срочно подавить большую часть метаболических процессов и активировать механизмы репарации ДНК.

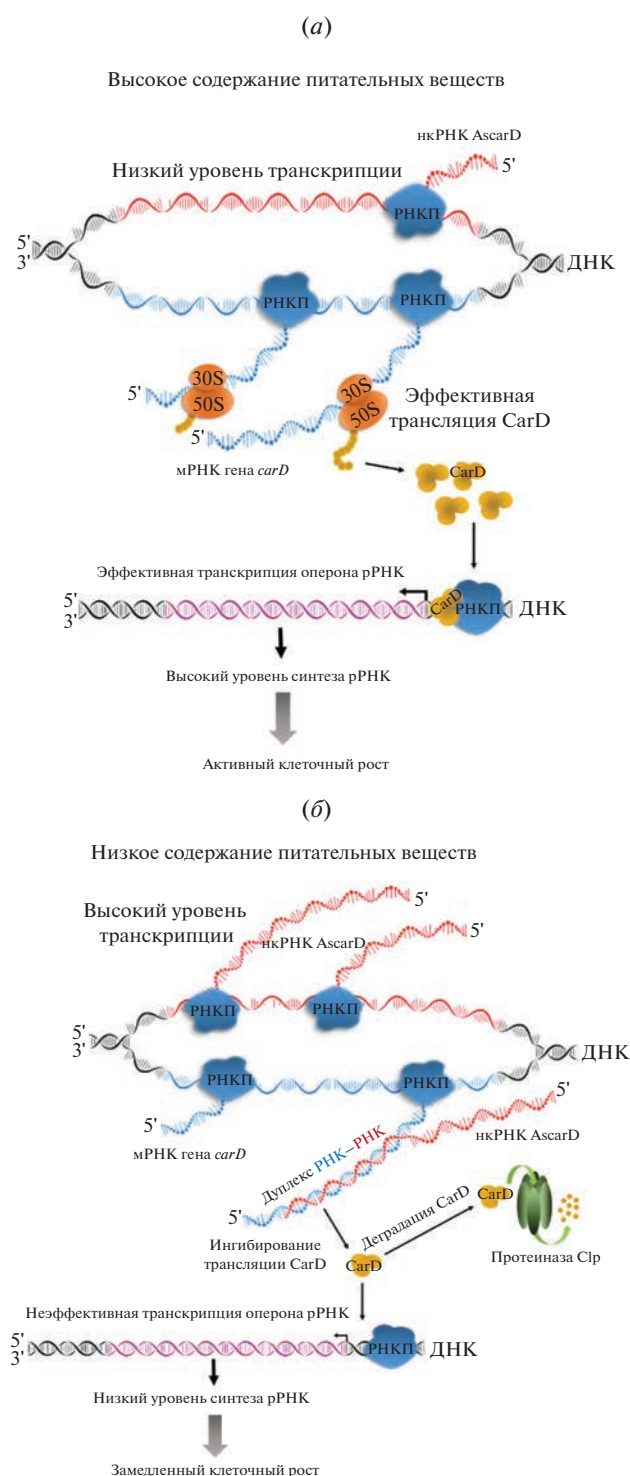


Рис. 3. Механизм регуляции скорости роста *M. tuberculosis* посредством *цис*-кодируемой антисмысловой нкРНК AscarD. (а) — Если в клетку поступает достаточное количество питательных веществ, нкРНК AscarD транскрибируется с низкой эффективностью и не оказывает существенного влияния на рост клеток; (б) — при неблагоприятных условиях начинается активный синтез нкРНК AscarD, которая совместно с протеиназой Clp способствует замедлению роста клеток, что позволяет бактерии адаптироваться к новому окружению.

Торможение клеточных процессов может осуществляться с помощью системы токсинов—анти-токсинов (ТА) I типа. Токсином в этом случае чаще всего выступают небольшие гидрофобные белки, ингибирующие синтез АТФ и снижающие тем самым уровень синтеза белков в клетке. Антитоксин в системах ТА этого типа — *цис*-кодируемая антисмысловая нкРНК, которая препятствует синтезу токсина при благоприятных условиях роста.

Пара нкРНК SymE/SymR из *E. coli* — наиболее известная система, являющаяся исключением из описанного правила [16] (рис. 4). При этом токсин SymE — негидрофобный белок, он проявляет рибонуклеазную активность, приводя к деградации мРНК и различных нкРНК, что замедляет клеточный рост. Предполагают, что система нкРНК SymE/SymR вовлечена в рециркуляцию мРНК, поврежденных во время SOS-ответа. нкРНК SymR — *цис*-кодируемая антисмысловая нкРНК, которая комплементарна 5'-концу мРНК гена *symE*, при этом область взаимодействия двух РНК включает участок посадки рибосомы и стартовый кодон. Образование РНК—РНК-дуплекса препятствует связыванию 30S-субъединицы рибосомы с мРНК, что приводит к ингибированию трансляции токсина SymE. Исследования нокаутного по гену *symR* штамма *E. coli* позволяют предположить, что механизм регуляции экспрессии токсина посредством нкРНК может включать процесс деградации мРНК SymE [16]. Однако неизвестно, ведет ли к деградации само взаимодействие нкРНК SymR с мРНК SymE или это вторичный эффект из-за ингибирования трансляции.

Подобная система — нкРНК IasE/IsrA — недавно была описана у *Salmonella enterica* сер. *typhimurium* [26]. Предполагают, что она необходима *S. typhimurium* при SOS-ответе, однако конкретный механизм ее действия остается неизвестным. Экспрессия гена *iasE*, кодирующего белок IasE с неохарактеризованной функцией [27], активируется во время SOS-ответа. Синтез этого белка подавляется посредством *цис*-кодируемой антисмысловой нкРНК IsrA, которая комплементарна 5'-концу мРНК гена *iasE*. Более того, IasE демонстрирует гомологию с токсином SymE и также проявляет эндонуклеазную активность.

Антисмысловая нкРНК MtlS участвует в метаболизме маннита бактерии *Vibrio cholerae*. Жизненный цикл некоторых бактерий включает постоянную смену окружения. При этом требуется тонкая регуляция экспрессии генов, отвечающих за адаптацию к различным условиям обитания (например, к изменению концентрации питательных компонентов или основных источников углерода) [28]. Так, патогенная бактерия *Vibrio cholerae* обычно обитает в стоячих водоемах, однако при попадании в желудочно-кишечный тракт человека становится причиной заболевания

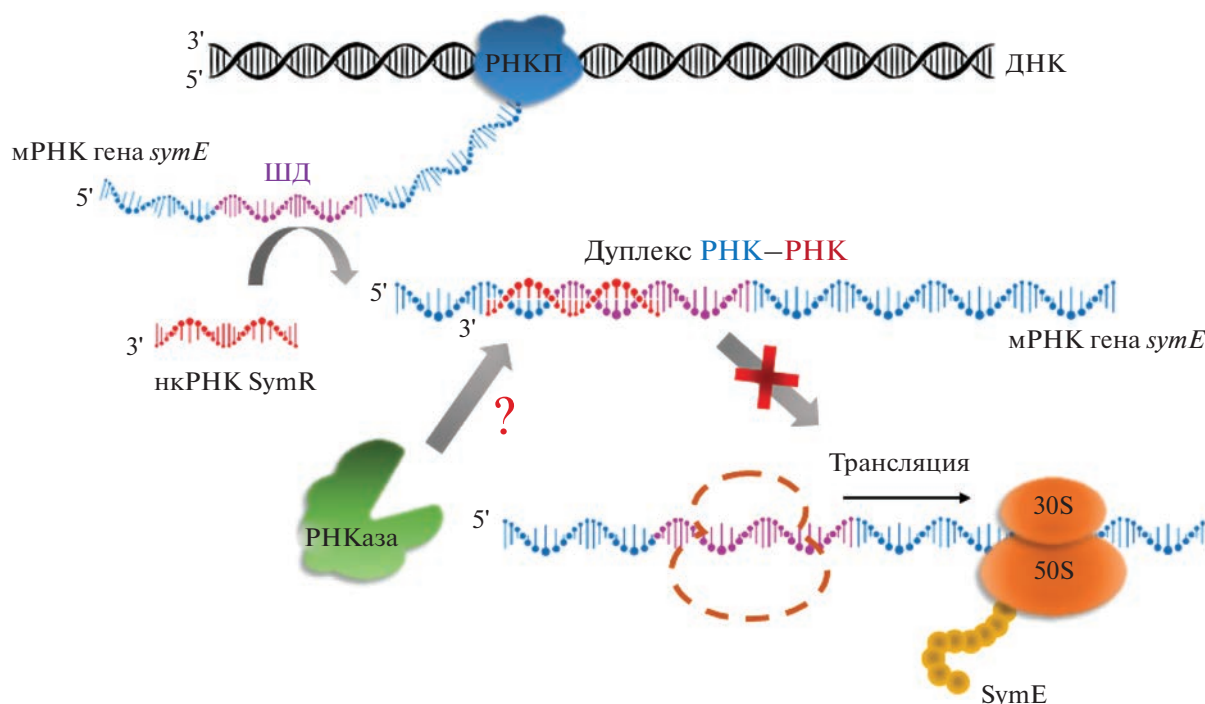


Рис. 4. Регуляция экспрессии токсина SymE. нкРНК SymR образует РНК–РНК-дуплекс с 5'-нетранслируемой областью мРНК гена *symE*, что приводит к ингибированию ее трансляции и, возможно, способствует деградации мРНК под действием рибонуклеаз (РНКаз).

холерой [29]. У бактерий за транспорт углеводов из внешней среды отвечает фосфотрансферазная система (ФТС). Один из белков ФТС у *V. cholerae* — MtlA, ответственный за поглощение и метаболизм маннита, одного из наиболее распространенных в природе источников углерода. MtlA участвует в жизненно важных процессах *V. cholerae*, включающих ее адаптацию к водным условиям внешней среды при выходе из организма-хозяина [28]. Один из регуляторов экспрессии гена *mtlA* — *цис*-кодируемая антисмысловая нкРНК MtlS. Часть этой нкРНК комплементарна 5'-нетранслируемой области мРНК гена *mtlA* в непосредственной близости от стартового кодона, что обеспечивает регуляцию экспрессии MtlA на посттранскрипционном уровне за счет образования устойчивого РНК–РНК-дуплекса, препятствующего сборке трансляционного комплекса [30]. Длина этого дуплекса составляет >45 п.н., что превосходит длину участков комплементарности для других *цис*-кодируемых антисмысловых РНК [31, 32]. Было высказано предположение, что связывание с 5'-нетранслируемой частью мРНК — не единственный фактор, обеспечивающий эффективную регуляцию экспрессии гена *mtlA*. Оказалось, что важную роль в этом процессе играет также факт расположения генов *mtlS* и *mtlA* в одном локусе [30]. Так, нкРНК MtlS, синтезированная в непосредственной близости от гена *mtlA*, показала более эффективное ингибирование трансля-

ции мРНК по сравнению с ее дистальным аналогом, синтезируемым в другом локусе, за счет более высокой скорости образования РНК–РНК-дуплекса.

Однако было непонятно, что влияет на транскрипцию самой *цис*-кодируемой антисмысловой нкРНК MtlS. В недавней работе Zhang et al. [33] продемонстрировали ее взаимосвязь с уровнем транскрипции целевого гена *mtlA*. Так, эффективность транскрипции *mtlA* снижается, если в окружающей среде маннит не является преобладающим источником углерода для метаболизма *V. cholerae*. Это приводит к увеличению транскрипции нкРНК MtlS, которая способствует ингибированию трансляции мРНК MtlA. Тем не менее конкретный механизм обратной связи экспрессии генов *mtlS* и *mtlA* на данный момент точно не известен. Авторы предполагают, что может иметь место окклюзия промотора гена *mtlS*, на что указывает разная эффективность промоторов двух генов, зависящая от содержания маннита в среде обитания *V. cholerae*. Однако расстояние между двумя промоторами составляет >100 п.н., что не исключает возможность реализации механизма “сидящей утки”. Таким образом, подобная взаимосвязь экспрессии системы РНК MtlA/MtlS работает в двух направлениях, обеспечивая трансляцию гена *mtlA* только в условиях, благоприятствующих метаболизму маннита, и способствуя эффективному регулированию синтеза нкРНК MtlS.

Участие транс-кодируемых антисмысловых нкРНК в адаптации к стрессовым условиям

Транс-кодируемыми антисмысловыми РНК называют нкРНК, синтез которых происходит с использованием в качестве матрицы части генома, удаленной от места транскрипции целевого гена. Транскрипция большей части этих нкРНК завершается Rho-независимо, что обуславливает наличие шпильки на 3'-конце РНК с последующей U-богатой последовательностью [34]. Такое строение защищает нкРНК от деградации 3'–5'-экзорибонуклеазами, присутствующими в клетке. Тем не менее удаленное место синтеза *транс*-кодируемых антисмысловых РНК приводит к меньшей степени комплементарности между мРНК и ними, в отличие от *цис*-кодируемых нкРНК. Так, взаимодействие последних со своими целевыми мРНК начинается с небольшого высокоаффинного контакта, который затем сопровождается быстрой перестройкой вторичных структур обеих РНК с образованием дуплекса за счет высокой комплементарности между двумя цепями. В случае же *транс*-кодируемых нкРНК взаимодействие с целевой мРНК требует в большинстве случаев присутствие белка-посредника.

Наиболее часто таким белком выступает Hfq, который изначально был открыт как фактор, необходимый для эффективной репликации бактериофага Q β в клетках *E. coli* [35]. Структурные исследования показали, что Hfq представляет собой гомогексамерный протеиновый комплекс, образующий форму кольца [36]. При этом он имеет три различные поверхности, взаимодействующие с РНК [37]. Проксимальная поверхность обладает сродством к U-богатым последовательностям, дистальная — к последовательностям с (AAN) $_n$ -мотивом (N — любой нуклеотид, n — количество повторений мотива), а поверхность кольца эффективнее всего взаимодействует с A/U-богатыми одноцепочечными РНК.

Hfq вовлечен в разные клеточные процессы, в том числе в посттранскрипционную регуляцию экспрессии генов, в которой он способствует более быстрому образованию стабильных дуплексов нкРНК/мРНК. Так, в клетках *E. coli* Hfq-опосредованное образование РНК–РНК-дуплексов может идти двумя путями [38] (рис. 5). В первом случае U-богатая последовательность на 3'-конце антисмысловой нкРНК связывается с проксимальной поверхностью Hfq, где каждая субъединица взаимодействует со своим остатком уридина [39]. Целевая мРНК при этом имеет (AAN) $_n$ -мотив, обычно располагающийся на 5'-конце, который обеспечивает взаимодействие с дистальной поверхностью Hfq (рис. 5a). Во втором случае нкРНК имеет (AAN) $_n$ -мотив, который вместе с U-богатым 3'-концом обеспечивает связывание как с дистальной, так и с проксимальной поверх-

ностями Hfq; целевая мРНК содержит A/U-богатый мотив, взаимодействующий с поверхностью кольца Hfq (рис. 5б). Hfq-опосредованное образование РНК–РНК-дуплексов может приводить к активации или ингибированию трансляции [40, 41], а также способствовать деградации этих дуплексов за счет привлечения различных РНКаз [42].

Неполная комплементарность между мРНК и *транс*-кодируемыми нкРНК позволяет последним иметь несколько мишеней в клетке. Это способствует более многогранной регуляции того или иного физиологического ответа [43]. Действительно, *транс*-кодируемые антисмысловые нкРНК вовлечены в большое количество клеточных процессов, включая адаптацию к стрессовым условиям (аминокислотному голоданию [44], недостатку кислорода [45], избыточному количеству свободных радикалов в среде обитания [46] и т.д.). Рассмотрим недавние исследования, которые раскрывают потенциал этих антисмысловых нкРНК в жизнедеятельности прокариот.

нкРНК MsaS вовлечена в процесс образования биопленки *E. coli*. Чтобы защититься от различных внешних негативных воздействий (например, УФ-излучения или дегидратации), некоторые микроорганизмы способны образовывать биопленки. Биопленки представляют собой расположенные на какой-либо поверхности клеточные колонии, которые агрегируют друг с другом в самопродуцируемой матрице, состоящей из полисахаридов, белков, липидов и ДНК. Переход от подвижной одиночной клетки к существованию в биопленке влечет кардинальные изменения в образе ее жизни, что сопровождается крупномасштабными перестройками экспрессии генов. Более того, как только микроорганизм стал частью биопленки, ему будет непросто вернуться к подвижному образу жизни одиночной клетки. Именно поэтому данный процесс у бактерий строго регулируется посредством различных факторов [47].

Одна из основных составляющих матрикса биопленок *E. coli* — комплекс белковых фибриллярных компонентов (“керли”, от англ. “curli”). Они представляют собой волокноподобные белковые агрегаты, способствующие адгезии клеток [48]. Регуляция их биосинтеза невероятно сложна и включает анализ множества внешних и внутренних сигналов. Так, на синтез структурных белков “керли” влияет транскрипционный фактор CsgD, экспрессия которого регулируется различными сигнальными путями и каскадами. Это, например, двухкомпонентная система OmpR/EnvZ [49], отвечающая за ответ на изменения осмотического давления внешней среды, или система фосфорилирования Rcs [50], вовлеченная в поддержание гомеостаза клеточной оболочки. Помимо прочего, в регуляции экспрессии CsgD участ-

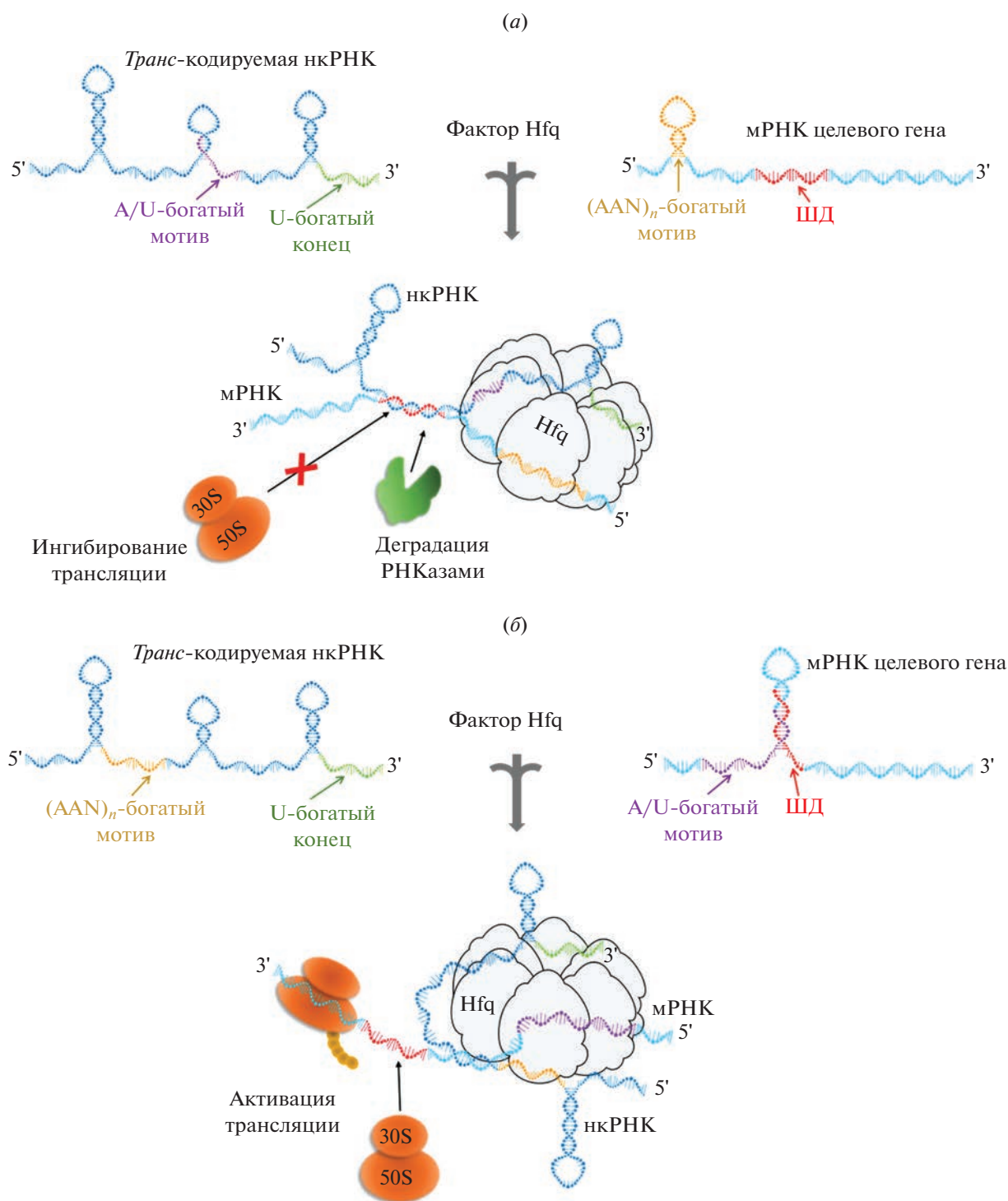


Рис. 5. Два способа взаимодействия *транс*-кодируемых антисмысловых нкРНК с белком Hfq и целевой мРНК. (а) — нкРНК имеет U-богатую последовательность на 3'-конце, взаимодействующую с проксимальной поверхностью Hfq; (б) — нкРНК имеет (AAN)_n-мотив, который вместе с U-богатым 3'-концом обеспечивает связывание как с дистальной, так и с проксимальной поверхностями Hfq.

вуют различные *транс*-кодируемые антисмысловые нкРНК [51, 52]. Это связано с тем, что мРНК гена *csgD* имеет довольно длинную 5'-нетранслиру-

емую область, которая служит своеобразным узловым центром для взаимодействия со множеством нкРНК. Для некоторых известных нкРНК меха-

сичного действия гема участвует группа *транс*-кодируемых антисмысловых нкРНК. У этого патогена перенос гема внутрь клетки при низкой его концентрации в окружающей среде происходит за счет белков Hbp1 и Hbp2, кодируемых генами *lmo2186* и *lmo2185*. Если же содержание гема в организме хозяина повышено, что часто имеет место в кровяном русле или в органах с большим содержанием крови, он проникает в клетки бактерии за счет диффузии сквозь поры пептидогликана. Оказавшись внутри, гем может быть разрушен гемоксигеназой Lmo0484 с высвобождением ионов железа. Согласно данным dos Santos et al. [59], в регуляции экспрессии генов *lmo0484*, *lmo2186* и *lmo2185* участвуют нкРНК семейства LhrC. При нормальной концентрации гема в организме хозяина у бактерии *L. monocytogenes* происходит синтез белков Hbp1 и Hbp2. Эти белки захватывают гем из внешней среды с целью его последующего разрушения посредством Lmo0484. Однако уже через 5 мин после пребывания *L. monocytogenes* в кровеносном русле человека экспрессия нкРНК LhrC1–LhrC5 увеличивается более чем в 50 раз в результате действия двухкомпонентной системы передачи сигналов LisRK. Эта система состоит из находящейся в мембране гистидинкиназы LisR, которая в определенных случаях фосфорилирует регулятор LisK, отвечающий на приходящий извне сигнал. Было показано, что эта система вовлечена в процессы адаптации бактерии к различным типам почвы [60], устойчивость к антибиотикам [61] и др. Когда *L. monocytogenes* находится в кровеносном русле человека, двухкомпонентная система LisRK может активироваться за счет избыточного количества гема в окружении. В таком случае LisR фосфорилирует LisK, который, в свою очередь, способствует транскрипции нкРНК LhrC1–LhrC5. При этом нкРНК LhrC4 связывается с последовательностью ШД в мРНК генов *lmo0484*, *lmo2186* и *lmo2185*, что приводит к ингибированию трансляции соответствующих белков. В итоге наличие нкРНК позволяет снизить уровень поглощения и переработки гема, что дает *L. monocytogenes* возможность адаптироваться к стрессовым условиям нахождения в организме хозяина. Более того, предыдущие исследования показали, что нкРНК семейства LhrC также вовлечены в ингибирование экспрессии поверхностных белков, что приводит к снижению степени узнавания патогена клетками иммунной системы человека [62].

Роль нкРНК MgrR в развитии устойчивости к антибиотикам катионной природы. На протяжении своей жизни бактерия может оказаться в стрессовых условиях, когда ей необходимо конкурировать с другими бактериями за ресурсы. В связи с этим некоторые грамположительные бактерии научились производить антибиотики, специфично действующие против грамотрицательных бак-

терий. Один из таких антибиотиков – полимиксин В [63], синтезируемый в природе бактерией *Paenibacillus polymyxa*, которая защищает растения от различных фитопатогенов [64]. Этот антибиотик содержит в своем составе большое количество положительно заряженных аминокислот, поэтому он за счет электростатического притяжения взаимодействует с отрицательно заряженными молекулами липополисахаридов на поверхности грамотрицательных бактерий, что в конечном итоге приводит к дестабилизации и лизису клеточной мембраны [65].

Для борьбы с катионными антимикробными пептидными токсинами грамотрицательная бактерия *S. typhimurium* использует фосфоэтанол-аминтрансферазу EptB. Последняя модифицирует поверхностные липополисахариды, что повышает поверхностный заряд бактерии и затрудняет действие полимиксина В. Транскрипция гена *eptB* находится под регуляцией σ -фактора RpoE, который активируется в ответ на стрессовое воздействие на внешнюю мембрану клетки. При этом известно, что синтез EptB ингибируется посредством нкРНК MgrR. На экспрессию гена *mgrR* косвенно влияет двухкомпонентная система PhoQP, которая действует как стимулятор транскрипции генов, важных для выживания при низкой концентрации ионов двухвалентных металлов [66]. PhoQ представляет собой мембраноассоциированную сенсорную киназу, которая в неблагоприятных условиях фосфорилирует регулятор клеточного ответа PhoP. Во внеклеточном матриксе тканей хозяина, в котором чаще всего и находятся различные патогенные бактерии, обычно повышено содержание ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} [67]. В этом случае действие системы PhoQP ингибируется, но активируется экспрессия *транс*-кодируемой антисмысловой нкРНК SroC. В работе Асуйа et al. [68] показано, что нкРНК SroC с помощью белка Hfq взаимодействует с нкРНК MgrR. Конкретный механизм функционирования SroC до конца неизвестен, однако предполагается, что в этот процесс вовлечена РНКаза E [68]. Тем не менее Hfq-опосредованное взаимодействие SroC с MgrR снижает способность последней ингибировать синтез белка EptB, который необходим *S. typhimurium* для развития устойчивости к антибиотикам катионной природы.

Транс-кодируемые антисмысловые нкРНК бактерий рода *Mycobacterium*. Относительно недавно была определена функция малой нкРНК F6 в *Mycobacterium smegmatis*. Grigorov et al. [69] продемонстрировали, что *транс*-кодируемая антисмысловая нкРНК F6, имеющая форму шпильки, образует 8-звенный дуплекс с 5'-нетранслируемой областью мРНК гена *MSMEG_4640*. Последний, в свою очередь, кодирует белок RpfE2, который в *M. smegmatis* изучен еще недостаточно хорошо, однако белки этого семейства действуют как фак-

торы роста в других бактериях рода *Mycobacterium*. Эксперименты со штаммом $\Delta F6$ показали, что отсутствие антисмысловой нкРНК F6 способствует более продолжительному росту *M. smegmatis* при неблагоприятных условиях, из чего был сделан вывод, что она вовлечена в процессы перехода бактерии в состояние гипобиоза, характерное для рода *Mycobacterium*. Стоит отметить, что *транс*-кодируемая антисмысловая нкРНК F6 представлена также и в других бактериях этого рода. Например, в *M. tuberculosis* она вовлечена в процесс выживания микроорганизма в гранулах [70].

Также в недавнем исследовании Острик и соавт. [71] была охарактеризована еще одна малая *транс*-кодируемая антисмысловая нкРНК *M. tuberculosis* – MTS1338. Авторы работы показали, что гиперэкспрессия нкРНК MTS1338 способствует выживанию бактерии в различных стрессовых условиях, опосредованных закислением окружающей среды, недостатком питательных веществ, воздействием пероксида водорода или оксида азота(II). Более того, дальнейшие эксперименты продемонстрировали связь между нкРНК MTS1338 и способностью *M. tuberculosis* выживать внутри макрофагов, что является частью жизненного цикла данной патогенной бактерии. Однако конкретный молекулярный механизм, описывающий наблюдаемые эффекты, еще предстоит изучить. Патогенная бактерия *M. tuberculosis* обладает широким арсеналом различных молекулярных механизмов, позволяющих ей успешно заражать человека. Малые нкРНК являются частью этого процесса [72].

МОДИФИЦИРУЮЩИЕ нкРНК

Общие механизмы действия модифицирующих нкРНК

Несмотря на широкую распространенность антисмысловых нкРНК в процессах адаптации бактерий к различным стрессовым условиям также участвуют малые нкРНК, напрямую взаимодействующие с целевыми белками, чаще всего с РНК-связывающими. Механизм действия таких нкРНК основан на ингибировании функции определенного белка за счет мимикрирования под его мишень. Модифицирующие РНК имеют в своей структуре одну или даже несколько последовательностей или структур, узнаваемых целевым белком, что обеспечивает эффективность РНК-белкового взаимодействия. Данный класс малых РНК остается наименее изученным. Возможно, это связано с тем, что довольно немного известно про РНК-связывающие белки прокариот. Однако последние исследования проливают свет на функциональную роль модифицирующих нкРНК в бактериальных клетках.

Участие модифицирующих нкРНК в адаптации к стрессовым условиям

Две нкРНК, GlmZ и GlmY, вовлечены в процесс синтеза глюкозамин-6-фосфата. Клеточная стенка не только отделяет бактерии от окружающей среды, но и представляет собой первый эшелон защиты от стрессовых воздействий, исходящих извне. Именно поэтому ее состав должен быстро варьировать под влиянием постоянно изменяющегося окружения, подстраиваясь под новые условия среды. У *E. coli* в этом процессе участвует фермент GlmS, ответственный за синтез глюкозамин-6-фосфата (GlcN6P), который является основой для биосинтеза всех аминсахаридсодержащих компонентов клеточной стенки. Уровень экспрессии этого фермента зависит от содержания GlcN6P в клетке, но регуляция его синтеза происходит не по классической обратной связи, когда конечный продукт взаимодействует с производящим его белком, ингибируя тем самым активность последнего, а включает в себя действие двух малых нкРНК и набор различных белков [73]. Khan et al. [74] внесли вклад в понимание механизма действия такой регуляции.

На синтез фермента GlmS оказывают влияние две нкРНК – GlmZ и GlmY, но механизмы этого влияния различны. нкРНК GlmZ – *транс*-кодируемая антисмысловая нкРНК, которая посредством Hfq связывается с мРНК GlmS и изменяет ее структуру, что активирует процесс трансляции [75]. С другой стороны, нкРНК GlmY в виде гомотетрамера способная связываться с белком RapZ. Это взаимодействие приводит к деградации нкРНК GlmZ под действием РНКазы E. В результате уровень синтеза фермента GlmS понижается [73] (рис. 7а). Интересно, что RapZ также связывает конечный продукт, синтезируемый ферментом GlmS – GlcN6P [74].

Модифицирующая нкРНК GlmY сходна по вторичной структуре с нкРНК GlmZ, но не имеет последовательности, необходимой для антисмысловой активации трансляции мРНК GlmS (рис. 7б). Полагают, что нкРНК GlmY играет роль “ловушки” для белка RapZ, выступая в роли нкРНК GlmZ. Транскрипция *glmY* находится под регуляцией двухкомпонентной системы, состоящей из гистидинкиназы QseE и регуляторного белка QseF (рис. 7б).

При пониженном содержании GlcN6P в клетке гомотетрамерный RapZ взаимодействует с QseE, способствуя его автофосфорилированию и активации (рис. 7б). Для этого процесса также необходим липопротеин QseG, находящийся в периплазматическом пространстве. Он напрямую взаимодействует с QseE [76] и предположительно отвечает за своевременную передачу информации о процессах, происходящих в клеточной стенке, внутрь бактерии. QseE в активированной

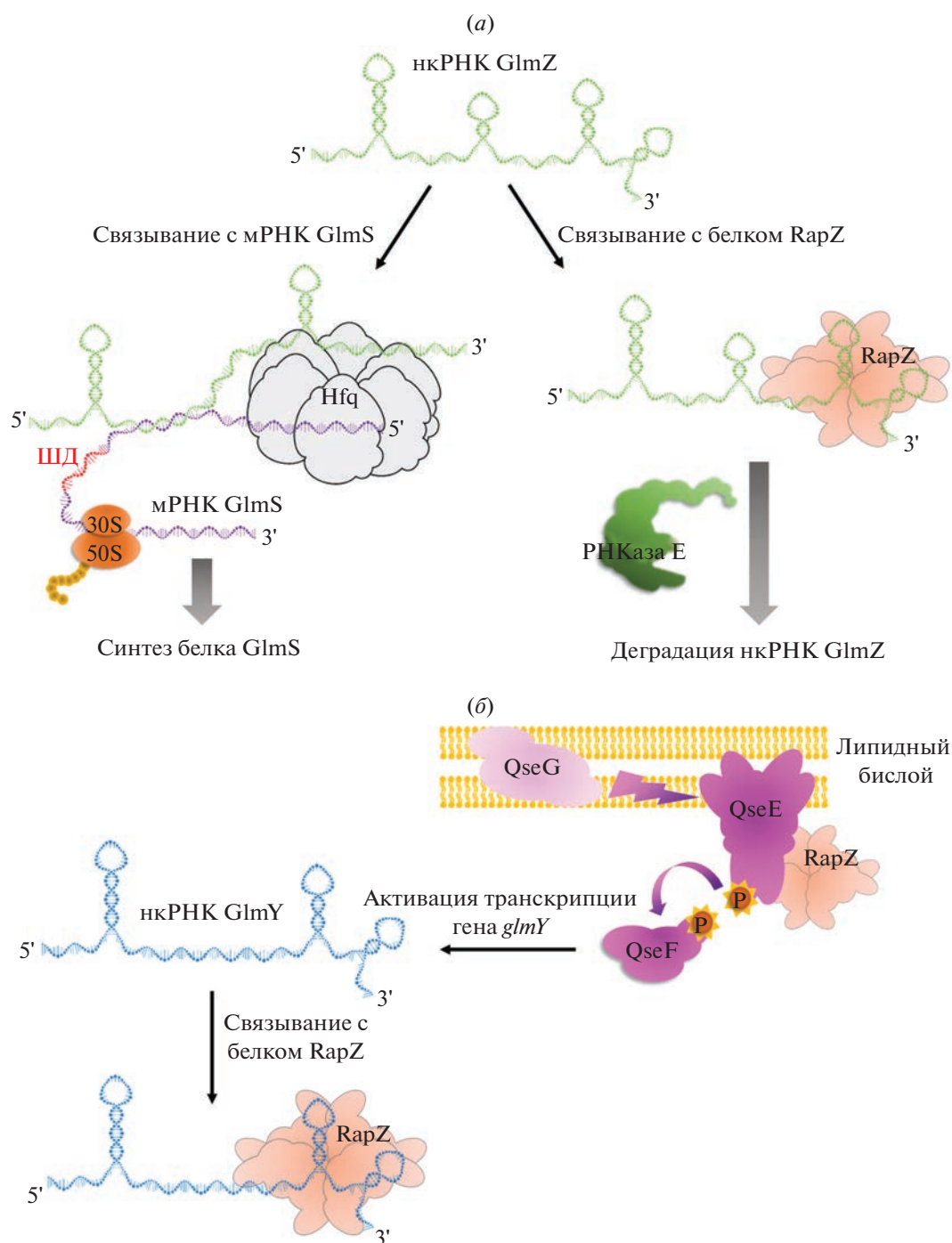


Рис. 7. Две нкРНК, GlmZ и GlmY, вовлечены в процесс синтеза глюкозамин-6-фосфата. (a) – Функции нкРНК GlmZ; (б) – активация транскрипции гена *glmY*, кодирующего нкРНК GlmY, которая выполняет функцию “ловушки” белка RapZ; (в) – обратимый процесс регуляции экспрессии белка GlmS с участием модифицирующей нкРНК GlmY и транс-кодированной антисмысловой нкРНК GlmZ.

форме фосфорилирует белок QseF. Последний, в свою очередь, активирует транскрипцию нкРНК GlmY, которая связывает белок RapZ. При этом уровень транскрипции *glmY* будет повышаться до тех пор, пока весь RapZ не будет связан в комплекс с нкРНК GlmY, чтобы избежать дальней-

шей активации QseE/QseF (рис. 7б, 7в). Образование комплекса нкРНК GlmY/RapZ позволяет нкРНК GlmZ связаться с мРНК гена *glmS* и активировать экспрессию белка GlmS, который способствует восполнению нехватки GlcN6P. Когда содержание GlcN6P в клетке достигает достаточ-

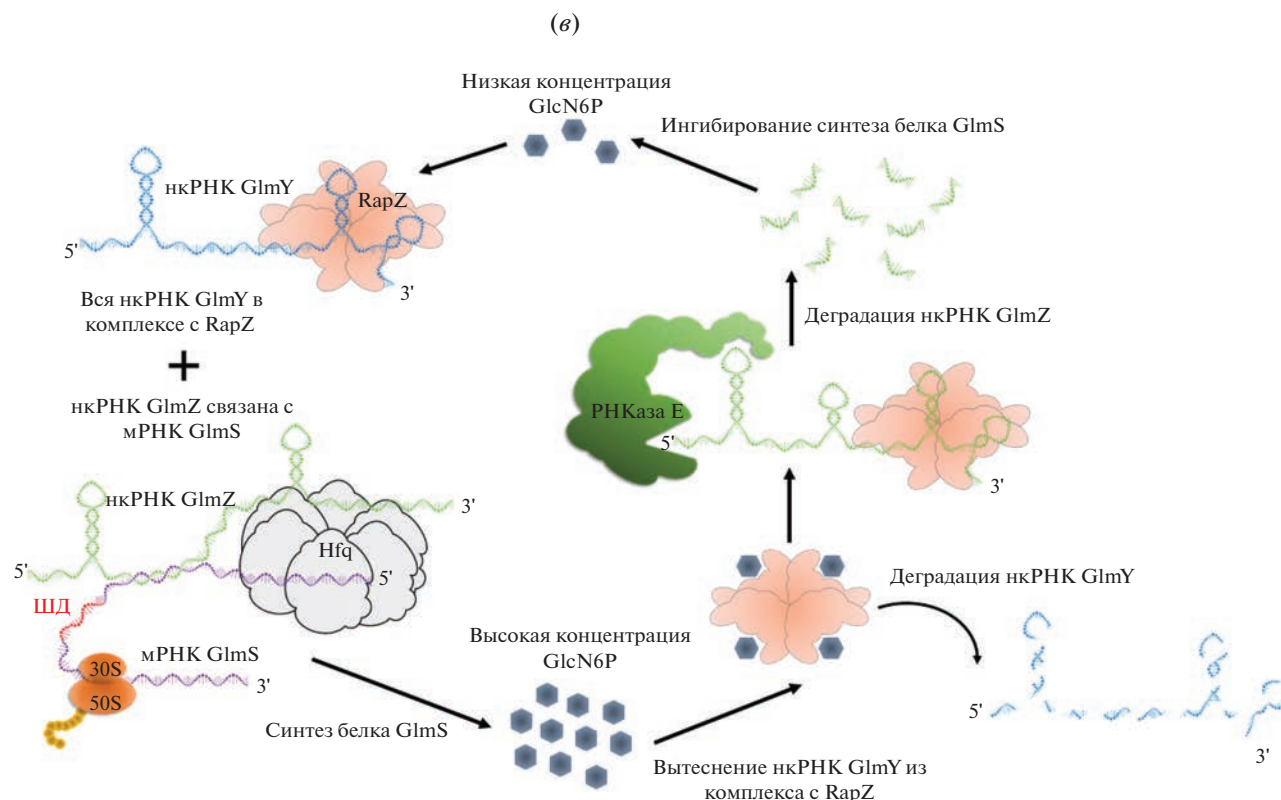


Рис. 7. Окончание.

ного уровня, он вытесняет ncRNA GlmY из комплекса с RapZ. Свободная ncRNA GlmY быстро подвергается деградации, вследствие чего оставшийся в клетке “свободный” RapZ связывается с ncRNA GlmZ, способствуя расщеплению последней. В конечном итоге деградация двух ncRNA приводит к снижению синтеза фермента GlmS и поддержанию концентрации GlcN6P в клетке на уровне, необходимом для ответа на стрессовые воздействия.

Модифицирующая ncRNA EutX регулирует метаболизм этаноламина *Enterococcus faecalis*. Еще один необычный пример действия модифицирующих ncRNA — регуляция экспрессии оперона *eut*, первый ген которого — *eutG*. Этот оперон отвечает за метаболизм этаноламина, широко распространенного в желудочно-кишечном тракте, который большинство бактерий использует в качестве источника азота. Чтобы иметь преимущество перед облигатной микробиотой человека, некоторые патогенные бактерии научились использовать этаноламин также и в качестве источника углерода с помощью конечных продуктов, закодированных в опероне *eut*. Помимо прочего, для метаболизма этаноламина необходим витамин B12, выступающий кофактором для большинства ферментов, кодируемых этим опероном.

Пример подобного патогенного микроорганизма — грамположительная бактерия *Enterococcus faecalis*. У нее экспрессия генов оперона *eut* регулируется с помощью модифицирующей ncRNA EutX и двухкомпонентной системы EutWV, состоящей из гистидинкиназы EutW и РНК-связывающего белка EutV [77]. В присутствии этаноламина EutW активируется и фосфорилирует EutV. Фосфорилированный EutV связывается с синтезирующейся мРНК оперона *eut*, препятствуя образованию терминаторной структуры и активируя тем самым транскрипцию генов этого оперона. Если в клетке есть этаноламин, но отсутствует витамин B12, то синтезируется ncRNA EutX, которая связывается с EutV и ингибирует действие этого белка. Однако строение ncRNA EutX таково, что 5'-конец этой модифицирующей ncRNA образует структуру рибопереклювателя, чувствительного к наличию витамина B12. Когда B12 присутствует в клетке, он связывается с ncRNA EutX в процессе транскрипции, что способствует образованию терминаторной структуры. Это приводит к образованию укороченной ncRNA EutX. Таким образом, подобная система регуляции экспрессии оперона *eut* способствует синтезу белков, ответственных за метаболизм этаноламина, только когда данный метаболит присутствует в клетке вместе с витамином B12.

Малая 6S РНК влияет на транскрипцию генов за счет связывания с РНК-полимеразой. Транскрипция в прокариотических клетках осуществляется единственным ферментом — ДНК-зависимой РНКП, которая представляет собой мультисубъединичный комплекс $\alpha\beta\beta'\omega$ (Е или кор-фермент). Для распознавания промотора гена, транскрипцию которого необходимо осуществить, и связывания с ним РНКП необходима σ -субъединица, которая после начала элонгации диссоциирует из комплекса, называемого холоферментом (Е σ). В клетках чаще всего имеется несколько σ -субъединиц, т.к. они являются удобными “ключами” для активации транскрипции определенных генов, в которых закодированы белки, необходимые клетке в данный момент и в данных условиях. Так, холофермент РНКП, в состав которого входит одна из σ -субъединиц, в *E. coli* обозначаемая σ^{70} , называется холоферментом домашнего хозяйства (Е σ^{70}). Его название отражает тот факт, что он отвечает за транскрипцию большинства генов в бактерии, необходимых для стабильного роста и развития.

6S РНК — крайне стабильная малая нкРНК, впервые обнаруженная в γ -протеобактерии *E. coli* более 50 лет назад. Долгое время ее функция оставалась неизвестной, пока не было показано, что в *E. coli* 6S РНК способна образовывать прочный комплекс с Е σ^{70} . Структурные исследования показали [78–80], что эта нкРНК как в свободном состоянии, так и в комплексе с Е σ^{70} имитирует открытую форму промотора, которая образуется при инициации транскрипции. Такой расплеченный участок в центре 6S РНК — ее характерная особенность, он называется центральным “пузырем”. Таким образом, эта 6S РНК конкурирует с промоторами генов за связывание с Е σ^{70} , что в конечном итоге оказывает влияние на транскрипцию генов.

Результаты сравнительного транскриптомного анализа дикого типа *E. coli* и штамма без гена, кодирующего 6S РНК ($\Delta ssrS$), указывают на то, что эта малая нкРНК представляет собой глобальный регулятор транскрипции. Так, согласно недавнему исследованию в отсутствие 6S РНК более чем в 2 раза изменяется уровень транскрипции 447 генов в пяти различных фазах роста *E. coli* [81]. При этом изменения для наибольшего количества генов наблюдаются в стационарной фазе, что согласуется с профилем накопления 6S РНК, который характеризуется увеличением количества копий 6S РНК на клетку по мере роста *E. coli*. Однако это не исключает влияние 6S РНК на жизнедеятельность бактерии в экспоненциальной фазе роста. Согласно данным Neusser et al. [82] 6S РНК *E. coli* вовлечена в регуляцию транскрипции генов некоторых транспортных белков, а так-

же белков, участвующих в метаболизме пуринов, в экспоненциальной фазе роста. Более того, авторы этой работы показали, что 6S РНК косвенно оказывает влияние и на биосинтез белков, т.к. в стационарной фазе в нокаутном штамме изменялся уровень транскрипции генов, белки которых вовлечены в процесс трансляции. Упомянутые транскриптомные анализы проводились с помощью ДНК-микрочипов и методом РНК-секвенирования. Сложность интерпретации результатов, полученных этими методами, заключается в том, что они дают информацию лишь о количестве РНК в клетках. При этом неизвестно, повлияло ли на него 6S РНК-опосредованное изменение активности промоторов или же в это вовлечены иные механизмы, компенсирующие отсутствие 6S РНК в клетке. Так или иначе, Lal et al. [81] и Neusser et al. [82] сходятся во мнении, что регулон 6S РНК сильно зависит от окружающих условий во время роста бактерии.

Возможные пути изучения механизма действия 6S РНК *E. coli* и его детали подробно представлены в работе Бурениной и соавт. [83]. Так, в экспоненциальной фазе роста, когда у клетки достаточно ресурсов, Е σ^{70} узнает промоторы и начинает транскрибировать гены, необходимые для активного роста бактерии. Однако по мере роста клеточной культуры ресурсы истощаются, и параллельно в цитоплазме накапливается 6S РНК. Она образует прочный комплекс с Е σ^{70} и выводит его из взаимодействия с промоторами, что в конечном итоге приводит к некоторому снижению транскрипционной и трансляционной активности в клетке. Это позволяет кор-ферменту РНКП образовывать новые холоферменты с альтернативными σ -субъединицами, которые ответственны за транскрипцию генов, необходимых для выживания при неблагоприятных условиях. Удивительная особенность 6S РНК — ее способность выступать матрицей для синтеза небольших РНК-продуктов (пРНК) посредством Е σ^{70} , которая в обычных условиях отвечает за ДНК-зависимый синтез РНК. При недостатке ресурсов, в частности рибонуклеозидтрифосфатов, в области центрального “пузыря” происходит синтез коротких пРНК (до 8 нт), который напоминает abortивную транскрипцию. Такие пРНК покидают комплекс 6S РНК–Е σ^{70} и не приводят к каким-либо значимым изменениям в его структуре. Однако, если в среде обитания вновь появляются необходимые питательные вещества, синтезируются более длинные пРНК (>9 нт), и образуется достаточно прочный РНК–РНК-дуплекс, что вызывает дестабилизацию комплекса 6S РНК–пРНК–Е σ^{70} . В конечном итоге РНКП высвобождается и, образовав комплекс с σ^{70} , вновь способна проводить активную транскрипцию генов, необходимых для роста и развития бактерии. Дуп-

лекс 6S РНК—пРНК при этом подвергается деградации РНКазами.

Последние исследования показывают, что 6S РНК *E. coli* также вовлечена в процесс адаптации бактерии к окислительному стрессу [84]. Продemonстрировано, что клетки $\Delta ssrS$ замедляли рост при добавлении пероксида водорода в питательную среду, при этом конечная концентрация $H_2O_2 \sim 17$ мМ оказалась летальной для этого штамма *E. coli*, но не для штамма дикого типа. В ходе дальнейших исследований выяснилось, что в клетках с делецией гена 6S РНК в присутствии пероксида водорода в питательной среде в 2–3 раза снижается количество мРНК четырех генов (*soxS*, *ahpC*, *sodA* и *tpx*) по сравнению с клетками исходного штамма. Последние три гена непосредственно вовлечены в адаптацию *E. coli* к окислительному стрессу за счет деградации H_2O_2 и связанных с ним активных форм кислорода, в то время как SoxS — глобальный регулятор транскрипции, который активируется в присутствии пероксидов и вовлечен в регуляцию экспрессии как минимум 20 различных генов, включая *sodA*. Механизмы, по которым 6S РНК активирует транскрипцию этих генов, остаются на данный момент неизвестными.

6S РНК — широко распространенная малая нкРНК [85]. Она была обнаружена во многих классах прокариот, однако количество и профиль накопления 6S РНК в разных бактериях различны. Так, в бактерии *B. subtilis*, относящейся к классу Bacilli, обнаружены две 6S РНК — 6S-1 и 6S-2. При этом 6S-1 РНК присущи все свойства 6S РНК *E. coli*, а профиль накопления 6S-2 РНК отличается, т.к. наибольшее ее количество наблюдается в поздней экспоненциальной фазе роста. Было показано, что обе 6S РНК одинаково эффективно взаимодействуют в холоферменте домашнего хозяйства *B. subtilis*, выступают в качестве матрицы для синтеза пРНК, а также играют роль регуляторов экспрессии генов [86]. При этом функции двух 6S РНК *B. subtilis* различаются между собой. 6S-1 РНК участвует в адаптации клеток к стационарной фазе роста [87]. 6S-2 РНК, согласно последним данным, вовлечена в процесс образования биопленок *B. subtilis*, повышающих выживаемость бактерий при неблагоприятных условиях окружающей среды [88].

Относительно недавно 6S РНК была обнаружена в α -протеобактерии *Rhodobacter sphaeroides* в ходе полногеномного секвенирования малых нкРНК этой бактерии [89]. Профиль ее накопления схож с таковым для 6S-2 *B. subtilis*. Предполагают, что 6S РНК *R. sphaeroides* вовлечена в адаптацию к солевому стрессу, т.к. наблюдается за-

медление роста клеток $\Delta ssrS$ в инкубационной среде, содержащей 2.5 М NaCl [90].

Burenina et al. [91] исследовали 6S РНК двух родственных азотфиксирующих бактерий — *Bradyrhizobium japonicum* и *Sinorhizobium meliloti*. Несмотря на сходство образа жизни этих прокариот между их 6S РНК обнаружены некоторые различия. Так, например, различаются профили накопления двух 6S РНК: в случае *B. japonicum* он имеет больше сходств с профилем накопления 6S РНК у *E. coli*, а у *S. meliloti* — с профилем *R. sphaeroides*. Нуклеотидные последовательности 6S РНК двух бактерий обладают высокой степенью сходства, однако образуемые ими вторичные структуры в достаточной степени различаются двухцепочечной частью со стороны концов молекулы. Возможно, именно это способствует появлению конформационной гетерогенности 6S РНК *S. meliloti* и ее комплексов с пРНК по сравнению с 6S РНК *B. japonicum*. В будущем предстоит выяснить последствия описанных отличий 6S РНК для *B. japonicum* и *S. meliloti* на функциональном уровне.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследований малых нкРНК вносят важный вклад в понимание метаболизма бактерий. В данном обзоре мы продемонстрировали примеры того, как эти регуляторные молекулы влияют на жизнедеятельность прокариот. На основании этих примеров можно оценить степень разнообразия процессов, в которые вовлечены малые нкРНК. По сравнению с регуляцией, опосредованной белковыми молекулами, основное преимущество нкРНК — быстрота и гибкость ответа на изменяющиеся условия окружающей среды, что обеспечивается отсутствием этапа трансляции, а также высокой скоростью деградации РНК—РНК-дуплексов в клетке. Более того, малые нкРНК могут иметь одновременно несколько мишеней, что также увеличивает скорость ответа клетки на внешний или внутренний сигнал. По сравнению с различными регуляторными молекулами белковой природы малые нкРНК в бактериях изучены недостаточно хорошо. Требуются дальнейшие исследования для установления новых метаболических путей, в которых малые нкРНК могут играть ключевую роль.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-04-00791) и базового бюджетного фи-

нансирования МГУ им. М.В. Ломоносова № АААА-А17-117120820044-4.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данного обзора, с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Crick F.H.C. // Mol. Biol. 1956. V. 12. P. 138–163.
2. Wassarman K.M. // Trends Microbiol. 1999. V. 7. P. 37–45.
[https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(98\)01379-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(98)01379-1)
3. Keiler K.C., Waller P.R.H., Sauer R.T. // Science. 1996. V. 271. P. 990–993.
<https://doi.org/10.1126/science.271.5251.990>
4. Zhang A., Altuvia S., Tiwari A., Argaman L., Hengge-Aronis R., Storz G. // EMBO J. 1998. V. 17. P. 6061–6068.
<https://doi.org/10.1093/emboj/17.20.6061>
5. Guerrier-Takada C., Gardiner K., Marsh T., Pace N., Altman S. // Cell. 1983. V. 35. P. 849–857.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90117-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90117-4)
6. Hoe C.H., Raabe C.A., Rozhdestvensky T.S., Tang T.H. // Int. J. Med. Microbiol. 2013. V. 303. P. 217–229.
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.04.002>
7. Ажикина Т.Л., Игнатов Д.В., Салина Е.Г., Фурсов М.В., Капсельянец А.С. // Усп. биол. химии. 2015. Т. 55. С. 3–32. [Azhikina T.L., Ignatov D.V., Salina E.G., Fursov M.V., Kaprelyants A.S. // Biochemistry (Moscow). 2015. V. 80. P. 1633–1646.]
<https://doi.org/10.1134/S0006297915130015>
8. Beltran M., García de Herreros A. // Transcription. 2016. V. 7. P. 39–43.
<https://doi.org/10.1080/21541264.2016.1148804>
9. Crampton N., Bonass W.A., Kirkham J., Rivetti C., Thomson N.H. // Nucleic Acids Res. 2006. V. 34. P. 5416–5425.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkl668>
10. Hao N., Crooks M.T., Palmer A.C., Dodd I.B., Shearwin K.E. // FEBS Lett. 2019. V. 593. P. 903–917.
<https://doi.org/10.1002/1873-3468.13365>
11. Callen B.P., Shearwin K.E., Egan J.B. // Mol. Cell. 2004. V. 14. P. 647–656.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.05.010>
12. Sneppen K., Dodd I.B., Shearwin K.E., Palmer A.C., Schubert R.A., Callen B.P., Egan J.B. // J. Mol. Biol. 2005. V. 346. P. 399–409.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.11.075>
13. Stork M., Di Lorenzo M., Welch T.J., Crosa J.H. // J. Bacteriol. 2007. V. 189. P. 3479–3488.
<https://doi.org/10.1128/JB.00619-06>
14. Brennan C.A., Dombroski A.J., Platt T. // Cell. 1987. V. 48. P. 945–952.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90703-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90703-3)
15. Cheng Y., Zhang T., Wang L., Chen W. // Appl. Environ. Microbiol. 2020. V. 86. P. e00517–20.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00517-20>
16. Kawano M., Aravind L., Storz G. // Mol. Microbiol. 2007. V. 64. P. 738–754.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05688.x>
17. Asano K., Niimi T., Yokoyama S., Mizobuchi K. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 11826–11838.
<https://doi.org/10.1074/jbc.273.19.11826>
18. Brantl S. // Plasmid. 2015. V. 78. P. 4–16.
<https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2014.07.004>
19. Mark Glover J.N., Chaulk S.G., Edwards R.A., Arthur D., Lu J., Frost L.S. // Plasmid. 2015. V. 78. P. 79–87.
<https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2014.07.003>
20. Ross J.A., Ellis M.J., Hossain S., Haniford D.B. // RNA. 2013. V. 19. P. 670–684.
<https://doi.org/10.1261/rna.037747.112>
21. Davis E., Chen J., Leon K., Darst S.A., Campbell E.A. // Nucleic Acids Res. 2015. V. 43. P. 433–445.
<https://doi.org/10.1093/nar/gku1231>
22. Rammohan J., Ruiz Manzano A., Garner A.L., Stallings C.L., Galburt E.A. // Nucleic Acids Res. 2015. V. 43. P. 3272–3285.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv078>
23. Stallings C.L., Stephanou N.C., Chu L., Hochschild A., Nickels B.E., Glickman M.S. // Cell. 2009. V. 138. P. 146–159.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.041>
24. Srivastava D.B., Leon K., Osmundson J., Garner A.L., Weiss L.A., Westblade L.F., Glickman M.S., Landick R., Darst S.A., Stallings C.L., Campbell E.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. 2013. V. 110. P. 12619–12624.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1308270110>
25. Li X., Chen F., Liu X., Xiao J., Andongma B.T., Tang Q., Cao X., Chou S.H., Galperin M.Y., He J. // eLife. 2022. V. 11. P. e73347.
<https://doi.org/10.7554/eLife.73347>
26. Acuña L.G., Barros M.J., Nuñez P., Peñaloza D., Montt F., Pedraza D., Crossley K., Gil F., Fuentes J.A., Calderón I.L. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2020. V. 526. P. 706–712.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.03.131>
27. Padalon-Brauch G., Hershberg R., Elgrably-Weiss M., Baruch K., Rosenshine I., Margalit H., Altuvia S. // Nucleic Acids Res. 2008. V. 36. P. 1913–1927.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkn050>
28. Schild S., Tamayo R., Nelson E.J., Qadri F., Calderwood S.B., Camilli A. // Cell Host Microbe. 2007. V. 2. P. 264–277.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.09.004>

29. World Health Organization // *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2021. V. 96. P. 445–460.
30. Chang H., Replogle J.M., Vather N., Tsao-Wu M., Mistry R., Liu J.M. // *RNA Biol.* 2015. V. 12. P. 136–148. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1017203>
31. Han K., Kim K.S., Bak G., Park H., Lee Y. // *Nucleic Acids Res.* 2010. V. 38. P. 5851–5866. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq292>
32. Maki K., Morita T., Otaka H., Aiba H. // *Mol. Microbiol.* 2010. V. 76. P. 782–792. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07141.x>
33. Zhang M.G., Liu J.M. // *J. Bacteriol.* 2019. V. 201. <https://doi.org/10.1128/JB.00178-19>
34. Otaka H., Ishikawa H., Morita T., Aiba H. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2011. V. 108. P. 13059–13064. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107050108>
35. Franze de Fernandez M.T., Eoyang L., August J.T. // *Nature.* 1968. V. 219. P. 588–590. <https://doi.org/10.1038/219588a0>
36. Schumacher M.A., Pearson R.F., Møller T., Valentin-Hansen P., Brennan R.G. // *EMBO J.* 2002. V. 21. P. 3546–3556. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf322>
37. Santiago-Frangos A., Woodson S.A. // *WIREs RNA.* 2018. V. 9. P. e1475. <https://doi.org/10.1002/wrna.1475>
38. Schu D.J., Zhang A., Gottesman S., Storz G. // *EMBO J.* 2015. V. 34. P. 2557–2573. <https://doi.org/10.15252/embj.201591569>
39. Zhou L., Hang J., Zhou Y., Wan R., Lu G., Yin P., Yan C., Shi Y. // *Nature.* 2014. V. 506. P. 116–120. <https://doi.org/10.1038/nature12803>
40. De Lay N., Gottesman S. // *Mol. Microbiol.* 2012. V. 86. P. 524–538. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08209.x>
41. Nielsen J.S., Larsen M.H., Lillebæk E.M.S., Bergholz T.M., Christiansen M.H.G., Boor K.J., Wiedmann M., Kallipolitis B.H. // *PLoS One.* 2011. V. 6. P. e19019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019019>
42. Andreassen P.R., Pettersen J.S., Szczerba M., Valentin-Hansen P., Møller-Jensen J., Jørgensen M.G. // *Nucleic Acids Res.* 2018. V. 46. P. 6746–6760. <https://doi.org/10.1093/nar/gky479>
43. Massé E., Vanderpool C.K., Gottesman S. // *J. Bacteriol.* 2005. V. 187. P. 6962–6971. <https://doi.org/10.1128/JB.187.20.6962-6971.2005>
44. Pulvermacher S.C., Stauffer L.T., Stauffer G.V. // *Microbiology.* 2009. V. 155. P. 106–114. <https://doi.org/10.1099/mic.0.023598-0>
45. Durand S., Storz G. // *Mol. Microbiol.* 2010. V. 75. P. 1215–1231. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07044.x>
46. Argaman L., Altuvia S. // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 300. P. 1101–1112. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3942>
47. Flemming H.C., Wingender J. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2010. V. 8. P. 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
48. White A.P., Gibson D.L., Collinson S.K., Banser P.A., Kay W.W. // *J. Bacteriol.* 2003. V. 185. P. 5398–5407. <https://doi.org/10.1128/JB.185.18.5398-5407.2003>
49. Ogasawara H., Yamada K., Kori A., Yamamoto K., Ishihama A. // *Microbiology.* 2010. V. 156. P. 2470–2483. <https://doi.org/10.1099/mic.0.039131-0>
50. Ferrières L., Clarke D.J. // *Mol. Microbiol.* 2003. V. 50. P. 1665–1682. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03815.x>
51. Holmqvist E., Reimegård J., Sterk M., Grantcharova N., Römling U., Wagner E.G.H. // *EMBO J.* 2010. V. 29. P. 1840–1850. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.73>
52. Jørgensen M.G., Nielsen J.S., Boysen A., Franch T., Møller-Jensen J., Valentin-Hansen P. // *Mol. Microbiol.* 2012. V. 84. P. 36–50. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.07976.x>
53. Bordeau V., Felden B. // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. P. 4682–4696. <https://doi.org/10.1093/nar/gku098>
54. Carpousis A. // *Annu. Rev. Microbiol.* 2007. V. 61. P. 71–87. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093440>
55. Cassat J.E., Skaar E.P. // *Cell Host Microbe.* 2013. V. 13. P. 509–519. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.04.010>
56. Chiabrando D., Vinchi F., Fiorito V., Mercurio S., Tolosano E. // *Front. Pharmacol.* 2014. V. 5. P. 61. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00061>
57. Duong T., Park K., Kim T., Kang S.W., Hahn M.J., Hwang H.Y., Jang I., Oh H.B., Kim K.K. // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2014. V. 70. P. 1498–1498. <https://doi.org/10.1107/S1399004714007391>
58. Choby J.E., Skaar E.P. // *J. Mol. Biol.* 2016. V. 428. P. 3408–3428. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.03.018>
59. Dos Santos P.T., Menendez-Gil P., Sabharwal D., Christensen J.H., Brunhede M.Z., Lillebæk E.M.S., Kallipolitis B.H. // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. P. 599. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00599>
60. Brunhede M.Z., Santos P.T.D., Gal L., Garmyn D., Kallipolitis B.H., Piveteau P. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2020. V. 367. P. fnaa188. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa188>
61. Aslan H., Petersen M.E., De Berardinis A., Zacho Brunhede M., Khan N., Vergara A., Kallipolitis B., Meyer R.L. // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. P. 618174. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.618174>
62. Sievers S., Lund A., Menendez-Gil P., Nielsen A., Storm Møllerup M., Lambert Nielsen S., Buch Larsson P., Borch-Jensen J., Johansson J., Kallipolitis B.H. // *RNA Biol.* 2015. V. 12. P. 985–997. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1071011>

63. Hancock R.E.W., Chapple D.S. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999. V. 43. P. 1317–1323.
<https://doi.org/10.1128/AAC.43.6.1317>
64. Khan Z., Kim S.G., Jeon Y.H., Khan H.U., Son S.H., Kim Y.H. // *Bioresour. Technol.* 2008. V. 99. P. 3016–3023.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.031>
65. Zhang L., Dhillon P., Yan H., Farmer S., Hancock R.E.W. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000. V. 44. P. 3317–3321.
<https://doi.org/10.1128/AAC.44.12.3317-3321.2000>
66. Moon K., Gottesman S. // *Mol. Microbiol.* 2009. V. 74. P. 1314–1330.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06944.x>
67. Vescovi E.G., Soncini F.C., Groisman E.A. // *Cell.* 1996. V. 84. P. 165–174.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81003-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81003-X)
68. Acuña L.G., Barros M.J., Peñaloza D., Rodas P.I., Paredes-Sabja D., Fuentes J.A., Gil F., Calderón I.L. // *Microbiology.* 2016. V. 162. P. 1996–2004.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.000365>
69. Grigorov A., Bychenko O., Salina E.G., Skvortsova Y., Mazurova A., Skvortsov T., Kaprelyants A., Azhikina T. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 11536.
<https://doi.org/10.3390/ijms222111536>
70. Houghton J., Rodgers A., Rose G., D'Halluin A., Kipkorir T., Barker D., Waddell S.J., Arnvig K.B. // *Microbiol. Spectr.* 2021. V. 9. P. e01095-21.
<https://doi.org/10.1128/Spectrum.01095-21>
71. Острик А.А., Салина Е.Г., Скворцова Ю.В., Григоров А.С., Быченко О.С., Капельяныц А.С., Ажикина Т.Л. // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2020. Т. 56. С. 336–341. [Ostrik A.A., Salina E.G., Kaprelyants A.S., Skvortsova Y.V., Grigorov A.S., Bychenko O.S., Azhikina T.L. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2020. V. 56. P. 381–386.]
<https://doi.org/10.31857/S0555109920040121>
72. Острик А.А., Ажикина Т.Л., Салина Е.Г. // *Усп. биол. химии.* 2021. Т. 61. С. 229–262. [Ostrik A.A., Azhikina T.L., Salina E.G. // *Biochemistry (Moscow).* 2021. V. 86. Suppl. Iss. 1. P. S109–S119.]
<https://doi.org/10.1134/S000629792114008X>
73. Göpel Y., Papenfort K., Reichenbach B., Vogel J., Görke B. // *Genes Dev.* 2013. V. 27. P. 552–564.
<https://doi.org/10.1101/gad.210112.112>
74. Khan M.A., Durica-Mitic S., Göpel Y., Heermann R., Görke B. // *EMBO J.* 2020. V. 39. P. e103848.
<https://doi.org/10.15252/embj.2019103848>
75. Urban J.H., Vogel J. // *PLoS Biol.* 2008. V. 6. P. e64.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060064>
76. Göpel Y., Görke B. // *PLoS Genet.* 2018. V. 14. P. e1007547.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007547>
77. DebRoy S., Gebbie M., Ramesh A., Goodson J.R., Cruz M.R., van Hoof A., Winkler W.C., Garsin D.A. // *Science.* 2014. V. 345. P. 937–940.
<https://doi.org/10.1126/science.1255091>
78. Chen J., Wassarman K.M., Feng S., Leon K., Feklistov A., Winkelman J.T., Li Z., Walz T., Campbell E.A., Darst S.A. // *Mol. Cell.* 2017. V. 68. P. 388–397.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.006>
79. Barrick J.E., Sudarsan N., Weinberg Z., Ruzzo W.L., Breaker R.R. // *RNA.* 2005. V. 11. P. 774–784.
<https://doi.org/10.1261/rna.7286705>
80. Steuten B., Setny P., Zacharias M., Wagner R. // *J. Mol. Biol.* 2013. V. 425. P. 3649–3661.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.07.008>
81. Lal A., Krishna S., Seshasayee A.S.N. // *G3 (Bethesda).* 2018. V. 8. P. 2079–2089.
<https://doi.org/10.1534/g3.118.200265>
82. Neusser T., Polen T., Geissen R., Wagner R. // *BMC Genomics.* 2010. V. 11. P. 165.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-165>
83. Буренина О.Ю., Елкина Д.А., Хартманн Р.К., Оретская Т.С., Кубарева Е.А. // *Биохимия.* 2015. Т. 80. С. 1641–1661. [Burenina O.Y., Elkina D.A., Oretskaya T.S., Hartmann R.K., Kubareva E.A. // *Biochemistry (Moscow).* 2015. V. 80. P. 1429–1446.]
<https://doi.org/10.1134/s0006297915110048>
84. Burenina O.Y., Elkina D.A., Ovcharenko A., Bannikova V.A., Schlüter M.A.C., Oretskaya T.S., Hartmann R.K., Kubareva E.A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 3653.
<https://doi.org/10.3390/ijms23073653>
85. Wassarman K.M. // *Microbiol. Spectr.* 2018. V. 6. P. 1–20.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.rwr-0019-2018>
86. Burenina O.Y., Hoch P.G., Damm K., Salas M., Zatsopin T.S., Lechner M., Oretskaya T.S., Kubareva E.A., Hartmann R.K. // *RNA.* 2014. V. 20. P. 348–359.
<https://doi.org/10.1261/rna.042077.113>
87. Hoch P.G., Burenina O.Y., Weber M.H.W., Elkina D.A., Nesterchuk M.V., Sergiev P.V., Hartmann R.K., Kubareva E.A. // *Biochimie.* 2015. V. 117. P. 87–99.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.12.019>
88. Thüring M., Ganapathy S., Schlüter M.A.C., Lechner M., Hartmann R.K. // *RNA Biol.* 2021. V. 18. P. 79–92.
<https://doi.org/10.1080/15476286.2020.1795408>
89. Berghoff B.A., Glaeser J., Sharma C.M., Vogel J., Klug G. // *Mol. Microbiol.* 2009. V. 74. P. 1497–1512.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06949.x>
90. Elkina D., Weber L., Lechner M., Burenina O., Weisert A., Kubareva E., Hartmann R.K., Klug G. // *RNA Biol.* 2017. V. 14. P. 1627–1637.
<https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1342933>
91. Burenina O.Y., Elkina D.A., Migur A.Y., Oretskaya T.S., Evguenievskaya-Hackenberg E., Hartmann R.K., Kubareva E.A. // *J. Microbiol.* 2020. V. 58. P. 945–956.
<https://doi.org/10.1007/s12275-020-0283-1>

Bacteria Adaptation Mechanisms to Stress Conditions with Small Non-Coding RNAs Participation

A. S. Karpov*, D. A. Elkina, T. S. Oretskaya**, #, and E. A. Kubareva****

#Phone: +7 (916) 206-41-02; e-mail: oretskaya@belozersky.msu.ru

**Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1, Moscow, 119991 Russia*

***Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1, Moscow, 119991 Russia*

Despite the fact that most of the bacterial genome encodes certain protein molecules, with the development of transcriptomic technologies, many genes have been discovered that transcribe RNA which is not translated into proteins. Such RNAs are called non-coding RNAs (ncRNAs). The study of only a small number of them shows that ncRNAs often act as regulatory molecules in various cellular processes: maintenance of cell wall homeostasis, protection against pathogens, virulence, etc. A special place among them is occupied by the so-called small ncRNAs with a length of ~50–300 nucleotide residues. In most cases, they form duplexes with the mRNA of certain genes, which affects the expression of the latter. However, some ncRNAs are able to directly bind to the target protein. Similar mechanisms of action of small ncRNAs give them some advantages in regulating various cellular processes compared to protein regulatory molecules. For example, when responding to an external or internal signal through small ncRNAs, the cell will need to spend less time and resources due to the absence of the translation stage. Moreover, some ncRNAs have no complete complementarity to their target RNAs, which makes the regulation more flexible, as it allows ncRNAs to participate in the response simultaneously to various cellular signals. In this review, we considered the general mechanisms by which various small ncRNAs allow bacteria to adapt to certain stressful conditions, as well as specific examples of their action in various prokaryotic organisms.

Keywords: bacterial small non-coding RNAs, antisense ncRNAs, modifying ncRNAs, stress conditions, gene expression regulation



РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ, НЕСПЕЦИФИЧНЫХ К ГЛЮКОЗЕ

© 2023 г. Е. Д. Белицкая*, **, #, В. А. Димитрева*, **, А. Н. Козлов*,
В. А. Олейников*, **, А. В. Залыгин*, **

*Национальный исследовательский ядерный университет “МИФИ”,
Россия, 115409 Москва, Каширское шоссе, 31

**ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 21.02.2023 г.

После доработки 26.02.2023 г.

Принята к публикации 27.02.2023 г.

На сегодняшний день для диагностики злокачественных опухолей наиболее часто используют ^{18}F -фтордезоксиглюкозу — радиофармакологический препарат для диагностики методом позитронно-эмиссионной томографии, использующий факт повышенного метаболизма глюкозы опухолевыми клетками. В то же время в ряде случаев подход на основе производных глюкозы неприменим. Воспалительные или другие доброкачественные процессы зачастую неотличимы от злокачественных. В подобных случаях неспецифичности опухоли к глюкозе (не только опухолевые, но и здоровые клетки активно потребляют ^{18}F -фтордезоксиглюкозу) требуется использование иных метаболических путей, которые в случае конкретной опухоли в данном органе окажутся специфичными к применяемому радиофармпрепарату.

Ключевые слова: радиофармпрепараты, радиофармакология, радиохимия, ПЭТ, ОФЭКТ

DOI: 10.31857/S0132342323060039, **EDN:** PQVYEM

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	575
СИНТЕЗ РФП	576
БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЕ РФП	578
Биораспределение у лабораторных животных ..	578
Биораспределение у человека	581
МИШЕНЬ ДЛЯ РФП	585
ПРИМЕНЕНИЕ РФП В ДИАГНОСТИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ	586
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	588
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	589

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время онкологические заболевания становятся одной из главных причин смерт-

ности во всем мире. Ключевой элемент успешного лечения онкологических заболеваний — точная и своевременная диагностика. В этом контексте радиофармацевтические препараты (РФП), используемые для позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) и однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ), представляют собой инструмент для диагностики и определения стадии развития опухолевых заболеваний [1].

Однако большинство радиофармпрепаратов используются для визуализации опухолей, специфичных к глюкозе. Несмотря на высокую чувствительность и специфичность, такие препараты не всегда способны обнаружить опухолевые клетки, которые не имеют высокой потребности в глюкозе или находятся в местах с повышенным потреблением глюкозы, например, в головном мозге, что ограничивает применение таких препаратов в диагностике опухолевых заболеваний. Поскольку РФП для опухолей, неспецифичных к глюкозе, разрабатываются с целью обойти данную неспецифичность с использованием иных метаболических путей и веществ, наиболее предпочтительным представляется классифицировать

Сокращения: РФП — радиофармацевтический препарат; ПЭТ — позитронно-эмиссионная томография; ОФЭКТ — однофотонная эмиссионная компьютерная томография; FDG — фтордезоксиглюкоза; FLT — 3'-дезоксиглюкоза-3'- ^{18}F -фтортимидин; FMT — фторметилтирозин; КТ — компьютерная томография; МРТ — магнитно-резонансная томография.

Автор для связи: (тел.: +7 (902) 099-70-00; эл. почта: belitskayakatya@yandex.ru).

Таблица 1. Классификация РФП, неспецифичных к глюкозе

На основе аминокислот	Для оценки синтеза ДНК	На основе липидов	Для оценки ангиогенеза	Для оценки апоптоза	Для оценки гипоксии	Взаимодействующие с опухолевыми рецепторами
^{11}C -метионин ^{18}F -FMT	^{11}C -тимидин ^{18}F -FLT	^{11}C -холин ^{18}F -холин ^{11}C -ацетат	^{68}Ga -NOTA-RGD ^{18}F -галакто-RGD	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -аннексин-V ^{124}I -аннексин-V	^{18}F -FMISO ^{18}F -FAZA ^{64}Cu -ATSM	С рецепторами эстрогена: ^{18}F -фторэстрадиол С рецептором соматостатина: ^{68}Ga -DOTA-TOC ^{111}In -октреотид $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -TOC $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -TATE

Примечание: FMT – фторметилтирозин; FLT – 3'-дезоксид-3'- ^{18}F -фтортимидин; NOTA – 1,4,7-триазациклононан- N,N,N' -триуксусная кислота; RGD – аргинилглициласпарагиновая кислота; FMISO – фтормизонидазол; FAZA – арабинозид фторазомицина; ATSM – диацетил-бис($N(4)$ -метилтиосемикарбазон); DOTA – тетраазамакроциклические лиганды; TOC – Туг3-октреотид; TATE – Туг3-октреотат.

эти препараты именно по мишеням для РФП – химическим процессам, протекающим в опухолях, и участвующим в них веществам [2]. Классификация РФП, не специфичных к глюкозе, приведена в табл. 1.

Среди РФП, представленных в табл. 1, наиболее хорошо изучены и часто применяются в клинике шесть препаратов: ^{11}C -метионин, ^{18}F -FLT, ^{11}C -холин и ^{18}F -FMISO – для ПЭТ-диагностики; $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -аннексин-V и ^{111}In -октреотид – для ОФЭКТ-исследований.

В связи с широкой распространенностью именно эти препараты были выбраны в качестве примеров для более полного и детального обзора клинических характеристик РФП, применяемых для диагностики опухолей, не специфичных к глюкозе.

СИНТЕЗ РФП

Первый этап в создании РФП – производство радионуклида. ^{11}C получают, как правило, на компактных циклотронах, установленных непосредственно в больнице. Основная реакция – “бомбардировка” протонами ядер азота: $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$. Период полураспада получаемого изотопа составляет ~20 мин, что обеспечивает малую дозовую нагрузку на пациента и дает врачам возможность проводить повторные измерения. Радионуклид распадается на 99.76% по позитронному типу распада с испусканием позитронов с максимальной энергией 0.961 МэВ и на 0.24% – по типу электронного захвата. В результате позитронного распада образуются два γ -кванта аннигиляции с энер-

гией 0.511 МэВ, которые регистрируются внешней системой детекторов томографической камеры.

Синтез ^{11}C -метионина представляет собой ^{11}C -метилирование сульфид-анион-L-гомоцистеина, полученного в присутствии основания из тиолактонов – предшественников L-гомоцистеина. Приведенная реакция (рис. 1) происходит при высокой температуре с последующей очисткой для получения стерильного раствора ^{11}C -метионина для клинического применения [3].

Для синтеза ^{11}C -холина сначала получают ^{11}C -иодид метила. Сперва $[^{11}\text{C}]\text{-CO}_2$ восстанавливают до метанола с помощью LiAlH_4 в среде тетрагидрофурана (ТГФ). После выпаривания ТГФ из реакционной смеси в реакционную пробирку добавляют 57%-ный раствор иодоводородистой кислоты – она вступает в реакцию с $[^{11}\text{C}]\text{-MeOH}$ и образует $[^{11}\text{C}]\text{-CH}_3\text{I}$ [4]. Затем $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ переносят в другой реакционный сосуд и растворяют в диметиламиноэтаноле (0.5 мл) при -10°C . При нагревании сосуда при 130°C в течение 5 мин образуется ^{11}C -холин. При вакуумировании сосуда при 130°C прекурсоры удаляются путем выпаривания, и продукт, ^{11}C -иодид холина, остается в сосуде. Затем этот продукт, растворенный в воде, очищают с помощью картриджа с катионообменной смолой. После 20-минутной работы устройства из 26 ГБк (700 мКи) $[^{11}\text{C}]\text{-CO}_2$ получают 11 ГБк (300 мКи) ^{11}C -холина. Этот препарат готов к медицинскому применению [5].

Радионуклид $^{99\text{m}}\text{Tc}$ образуется посредством деления ^{99}Mo (реакция протекает в течение 6 ч) с помощью генераторной системы (рис. 2) [6].

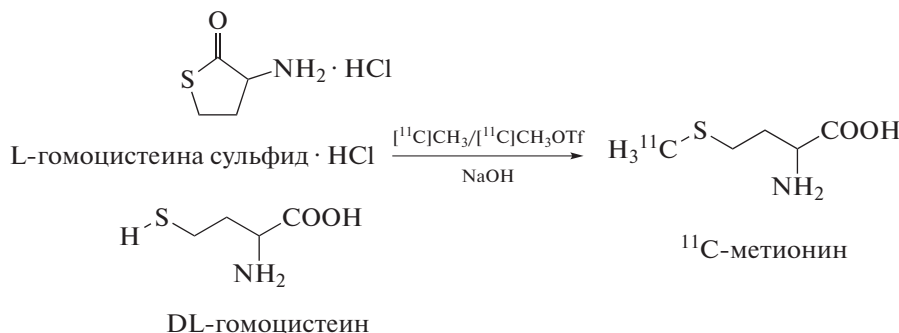


Рис. 1. Радиохимический синтез $[^{11}\text{C}]$ -метионина. Адаптировано из Lodi et al. [3].

Получение $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -аннексина-V: аннексин-V обычно продуцируется путем экспрессии в *E. coli* [7]. В одном из существующих исследований для маркировки Tc в качестве обменного агента используют глюкогептонат. Раствор, содержащий 20 мМ глюкогептонат натрия и 10 мМ HEPES-буфер (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота), доводят до pH 6.6 и дезоксигенируют аргоном. Добавляют $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ до 128 мкг/мл, аликвоты по 1 мл разливают во флаконы из боросиликатного стекла, лиофилизируют, закрывают завинчивающимися крышками с тефлоновой подкладкой под аргоном и хранят при -20°C . Для радиомаркировки 100 мкл $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ в 0.9% NaCl добавляют к 200 мкл олова/глюкогептоната (из лиофилизированной аликвоты, только что восстановленной 1 мл дезоксигенированной H_2O). Затем добавляют 100 мкг (100 мкл) восстановленного белка. Реакционную смесь инкубируют в течение 60 мин при комнатной температуре [8].

^{18}F обычно производят на циклотроне путем протонного облучения ^{18}O , стабильного природного изотопа кислорода. Зачастую мишень жидкая (H_2O^{18}), в этом случае получается раствор ^{18}F -фторид-иона. Ядерные характеристики ^{18}F : претерпевает в большинстве случаев позитронный распад (97%), период полураспада ~110 мин, энергия испускаемых позитронов 835 кэВ [9].

Для производства ^{18}F -FLT и ^{18}F -FMISO используют реакцию, идущую по механизму $\text{S}_{\text{N}}2$ афилиотического нуклеофильного фторирования, которое включает замену группы ^{18}F -фторида на уходящую группу. Подробный процесс производства ^{18}F -FLT приведен на рис. 3, а ^{18}F -FMISO — на рис. 4.

^{111}In получают главным образом в виде хлорида индия ($^{111}\text{InCl}$) в циклотронах посредством облучения потоком протонов кадмиевой мишени либо по реакции $^{112}\text{Cd}(p,2n)^{111}\text{In}$, либо по реакции $^{111}\text{Cd}(p,n)^{111}\text{In}$ [10]. Первая реакция используется чаще, поскольку приводит к получению радионуклида более высокой чистоты [10]. Здесь глав-

ный загрязнитель — побочный продукт ядерных реакций $^{114}\text{m}2\text{In}$ ($T_{1/2} = 49.51$ сут, $E_\gamma = 190.3$ кэВ, $I_\gamma = 15.0\%$, $IT\ 96.75\%$, $EC\ 3.25\%$), который при той же активности, что и ^{111}In , создает в 80 раз большую поглощенную дозу. Ядерные характеристики изотопа ^{111}In : претерпевает распад по типу электронного захвата ($EC = 100\%$), период полураспада 2.81 сут, энергия перехода $7/2 \rightarrow 5/2$ $E_\gamma = 171.3$ кэВ, $I_\gamma = 90.3\%$ и энергия перехода $5/2 \rightarrow 1/2$ $E_\gamma = 245.4$ кэВ, $I_\gamma = 94\%$.

$^{111}\text{InCl}$ затем используется для связывания радионуклида с антителами, пептидами или прочими молекулами с использованием хелата для проведения реакции связывания, что обусловлено необходимостью прочно связать ион ^{111}In с пептидной молекулой октреотида за счет ковалентных связей с ней. Таким образом производится в том числе и ^{111}In -пентетреотид: октреотид связывается с ^{111}In посредством диэтилентриаминпентауксусной кислоты (ДТРА) [10].

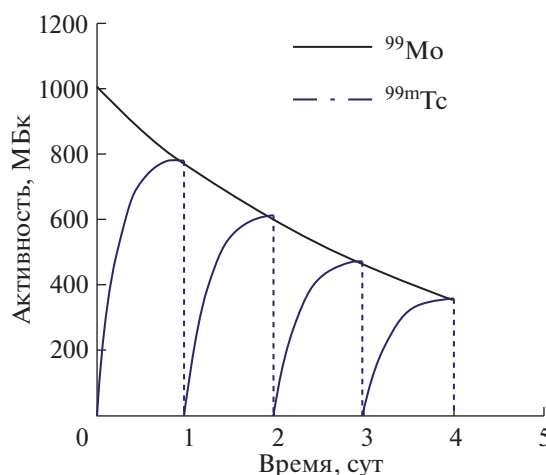


Рис. 2. Элюирование генератора $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$. Генератор имеет номинальную активность 1000 МБк в день 0 (понедельник). Его элюировали ежедневно, 5 раз в неделю, получая 1000, 780, 600, 470 и 360 МБк. Адаптировано из Bailey et al. [6].

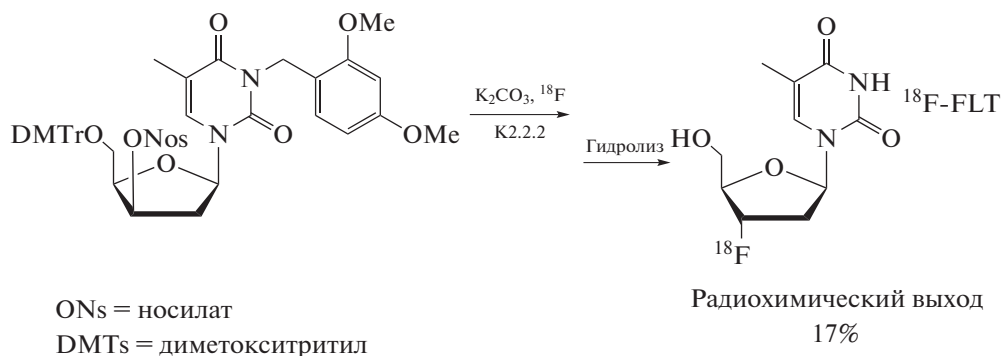


Рис. 3. Производство ^{18}F -FLT. Адаптировано из Jacobson et al. [9].

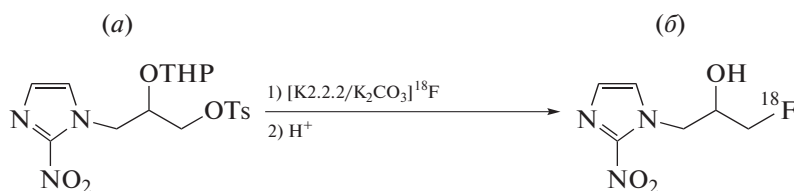


Рис. 4. Химическая структура FMISO (а) и с радиоактивной меткой ^{18}F (б). Адаптировано из Lee et al. [25].

БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЕ РФП

ПЭТ применяется в качестве ценного диагностического метода при многочисленных патологиях. Радиофармпрепараты, используемые при исследованиях, различны, и они участвуют в метаболических процессах в разных местах, следовательно, их распределение в организме, а также сродство к разным тканям также различны.

Биораспределение у лабораторных животных

Для оценки биораспределения ^{11}C -метионина у лабораторных животных был проведен ряд исследований. Так, выяснено, что у свиней распределение препарата следующее: самые высокие концентрации ^{11}C -метионина были обнаружены в тонком кишечнике, печени, почках, тимусе, двенадцатиперстной кишке и костях, меньшая активность наблюдалась в других областях, таких как толстая кишка, сердце и мозг, и незначительная активность выявлена в мочевом пузыре [11]. Второе рассматриваемое исследование было направлено на изучение биораспределения препаратов ^{11}C -метионина и ^{18}F -FDG у интактных крыс линии Wistar [12]. Были получены похожие результаты (рис. 5): наибольшее накопление выявлено в печени и селезенке, а в мозге и сердце оно практически не наблюдалось.

Изучали биораспределение ^{18}F -FLT у мышей [13]. Значительное накопление препарата наблюдалось в крови, плазме, печени, почках и тонком кишечнике и значительно ниже — в головном,

спинном мозге, сердце и мышцах. Было проведено исследование, целью которого было изучение биораспределения ^{18}F -FLT у взрослых домашних кошек [14]. На рис. 6 показано, что наибольшее поглощение препарата наблюдалось в кишечнике, а также в гепатобилиарной (комплекс органов и тканей, относящихся к печени, желчному пузырю и желчным протокам) и мочевыделительной системах. Минимальное поглощение выявлено в мозге, легких, миокарде, скелетных мышцах и селезенке. Интенсивное накопление в мочевыделительной системе, скорее всего, обусловлено выведением РФП через почки.

Zheng et al. изучали биораспределение ^{11}C -холина у мышей с атимией рака молочной железы [15]. Поглощение препарата в опухолях составило 1.8–2.0%. Наибольшее накопление наблюдалось в таких органах, как почки (15–24%), печень (7–13%) и тонкая кишка (4–7%) (рис. 7).

Tolvanen et al. [16] изучали распределение ^{11}C -холина у лабораторных крыс (рис. 8). Радиоактивность в основном выявлена в почках, легких, надпочечниках и печени, в то время как минимальное накопление наблюдалось в головном мозге. Для каждого из этих органов поглощение радиоактивности постепенно снижалось с 10 мин после инъекции.

Для оценки биораспределения $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -аннексина-V препарат вводили через хвостовую вену лабораторным мышам [17]. Результаты биораспределения фиксировали через 60 мин после инъекции. Самые высокие значения поглощения

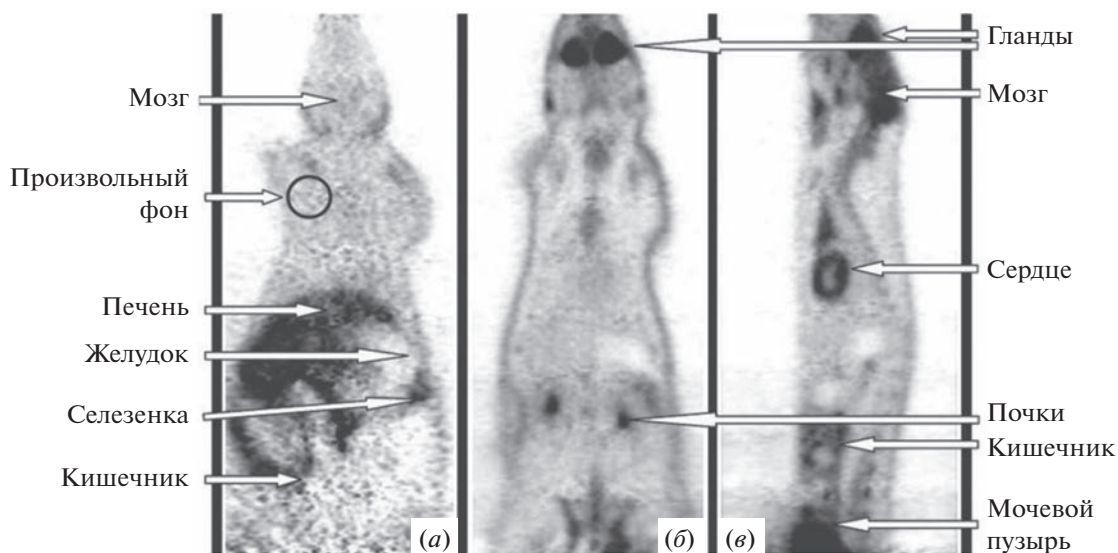


Рис. 5. Накопление РФП у крысы: (а) — ^{11}C -метионин, корональный вид, (б) и (в) — ^{18}F -FDG, корональный и сагитальный вид соответственно. Адаптировано из Stolc et al. [12].

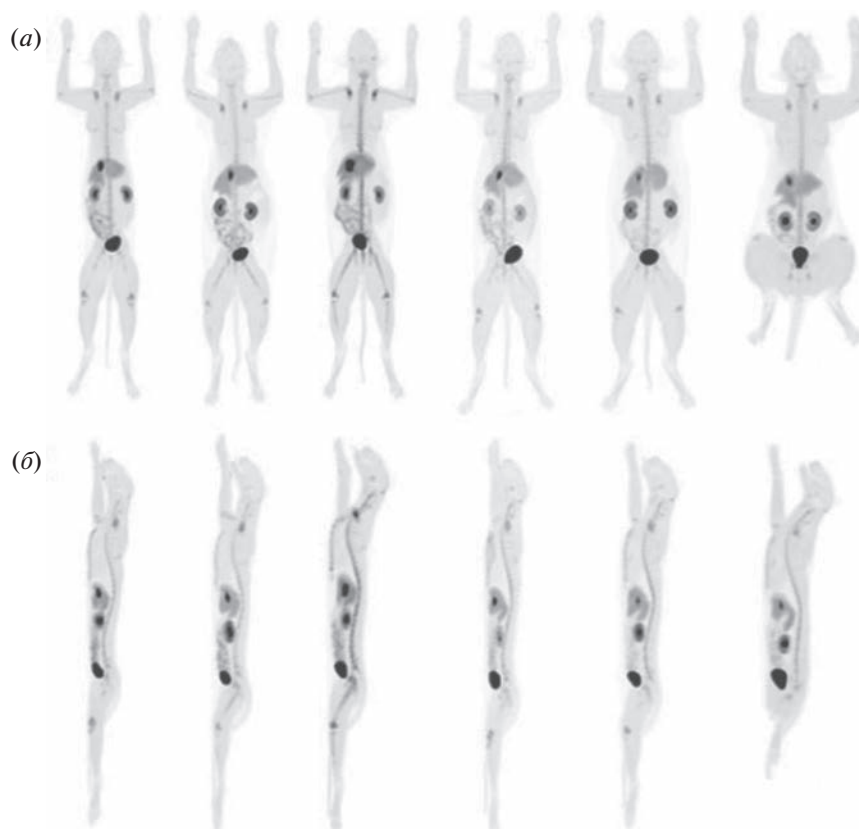


Рис. 6. Репрезентативные изображения, иллюстрирующие закономерности биораспределения ^{18}F -FLT по всему телу, наблюдаемые у здоровых молодых взрослых кошек через 80.8 ± 7.5 мин (среднее значение $\pm$ SD) после инъекции. Приведены проекции максимальной интенсивности ПЭТ в дорсальной (а) и сагитальной (б) плоскостях. Адаптировано из Rowe et al. [14].

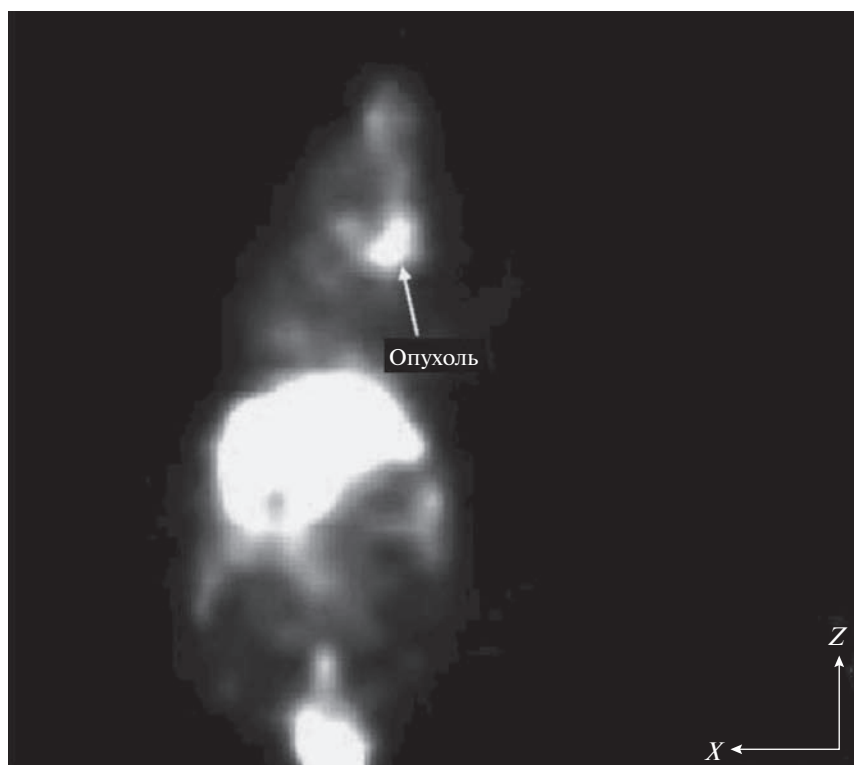


Рис. 7. Визуализация распределения ^{11}C -холина у мыши с атимией MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7), трансфицированной имплантированным IL-1 α . Адаптировано из Zheng et al. [15].

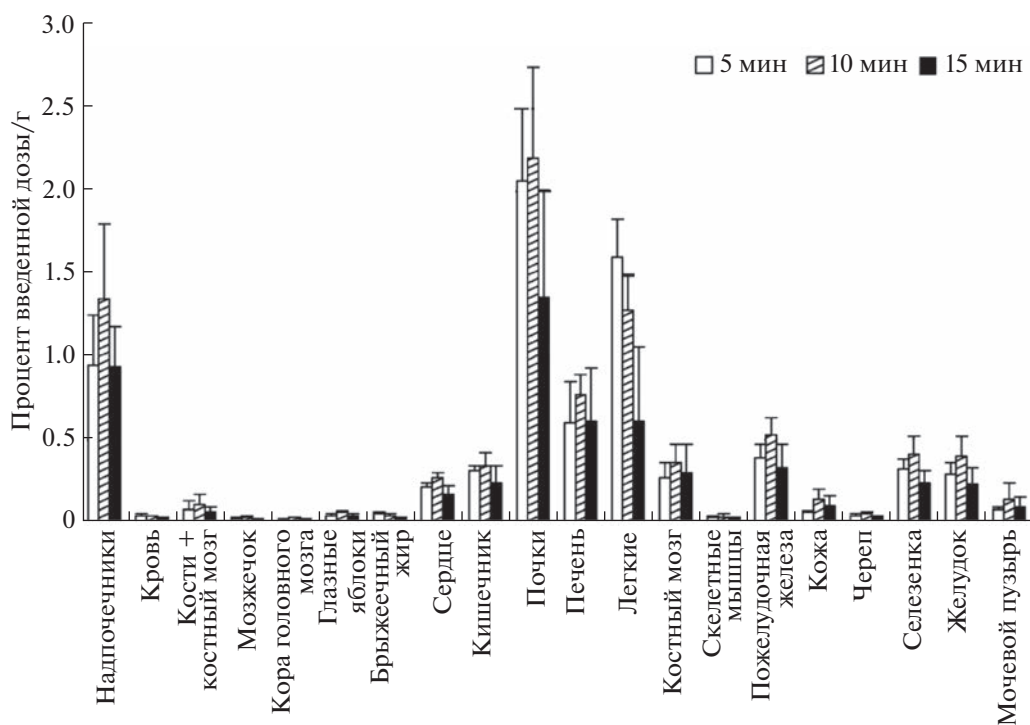


Рис. 8. Поглощение радиоактивности в различных органах, полученное через 5, 10 и 15 мин после инъекции ^{11}C -холина. Для определения поглощения в органах использовали трех крыс в каждый момент времени, а для крови, мозжечка и коры головного мозга — двух крыс. Адаптировано из Tolvanen et al. [16].

наблюдались в почках и печени. Blankenberg et al. [18] также изучали биораспределение ^{99m}Tc -аннексина-V в мышцах. Показано, что наименьшее накопление зафиксировано в мозге, сердце и тимусе — менее 0.2% от введенной дозы. Исследователи заметили, что локализация в почках была в основном в почечной коре. Препарат был обнаружен и в других органах, таких как селезенка, желудок и легкие.

Биораспределение ^{18}F -FMISO исследовали на примере мышей с раком кишечника [19]. Показано повышенное накопление ^{18}F -FMISO в здоровых клетках кишечника и печени, что, как отмечают авторы статьи, наблюдалось и при исследованиях мышинных опухолей других органов (рис. 9). Это объясняется большим количеством анаэробных бактерий, содержащихся в кишечнике и поглощающих РФП, и липофильностью ^{18}F -FMISO, описывавшейся ранее. Наименьшее содержание данного РФП через 120 мин после введения наблюдалось в крови, селезенке, сердце, желудке и особенно в мышцах; несколько большее содержание было выявлено в легких и костях. Опухоль показала приблизительно такое же поглощение, как и почки, но в ~2 раза меньшее, чем кишечник, и в 1.5 раза меньшее, чем печень.

Биораспределение ^{111}In -октреотида у лабораторных животных при использовании плазмозамещающих лекарственных средств исследовали Van Eerd et al. на примере крыс и мышей [20]. Использование плазмозаместителей было обусловлено тем, что обычно ^{111}In -пентетреотид вследствие своей пептидной природы демонстрирует

повышенное почечное поглощение, что дополнительно ограничивает вводимую дозу данного РФП. С поправкой на использование плазмозаместителей (PBS, лизин и гелофузин) в случае крыс результаты показали очень низкое биораспределение в таких органах и тканях, как печень, селезенка, легкие, кишечник, мышцы и кровь, но очень высокое — в надпочечниках, поджелудочной железе и почках (рис. 10). Биораспределение у мышей при использовании тех же плазмозаместителей показало иные результаты: повышенное накопление в легких, но пониженное (по сравнению с крысами) — в таких рецептор-позитивных органах, как надпочечники и поджелудочная железа.

Биораспределение у человека

Harris et al. оценили биораспределение ^{11}C -метионина в органах, не пораженных опухолью, у детей, обследованных на предмет наличия злокачественных заболеваний [21]. Получены следующие результаты: самое высокое содержание ^{11}C -метионина было обнаружено в поджелудочной железе и печени (рис. 11). Менее интенсивное поглощение наблюдалось в других областях, таких как слюнные железы, миндалины и костный мозг. В легких, жировой ткани и мышцах поглощение было незначительным. Поглощение в костном мозге, околоушных железах и миндалинах было незначительным, но у мужчин оно было статистически значимо выше, чем у женщин. Высокое поглощение ^{11}C -метионина достоверно обнаруживалось в поджелудочной железе и печени, что согласуется с анаболическими функциями

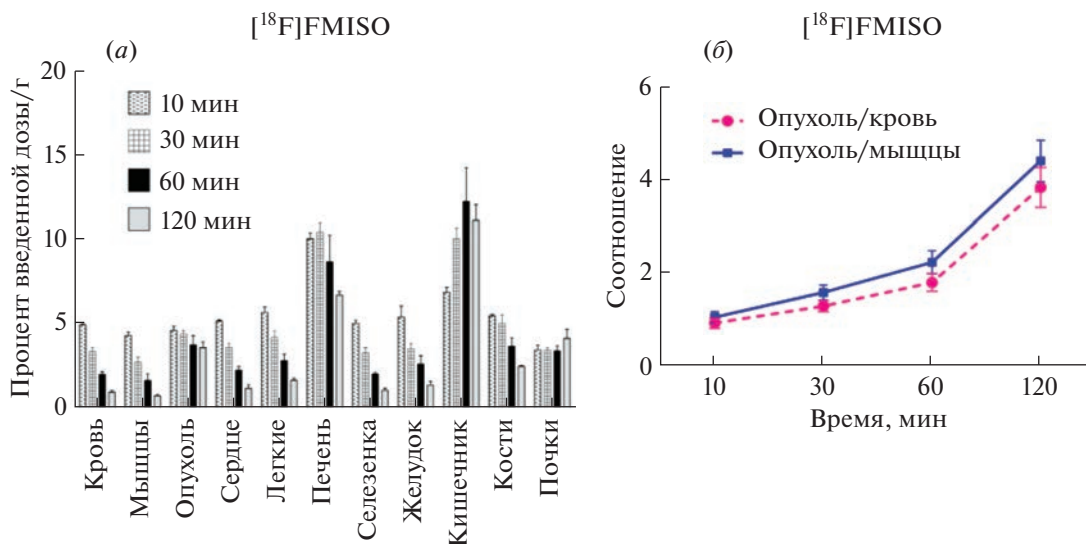


Рис. 9. (а) — Биораспределение ^{18}F -FMISO (0.15 МБк на 0.1 мл) у ксенотрансплантированных мышей СТ-26 через 10, 30, 60 и 120 мин после инъекции; (б) — соотношение опухоли к крови и опухоли к мышцам с учетом времени. Результаты представляют собой средний процент введенной дозы на 1 г ткани $\pm$ стандартное отклонение ($\% \text{ID/g} \pm \text{SD}$); $n = 4$ в каждый момент времени. Адаптировано из Seelam et al. [19].

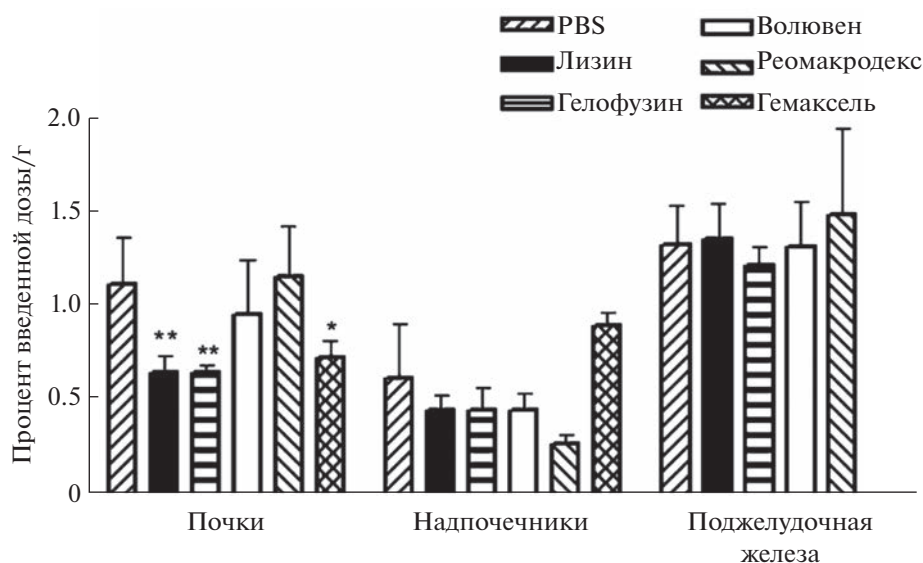


Рис. 10. Данные о биораспределении, полученные с помощью различных расширителей плазмы через 20 ч после внутривенного введения ^{111}In -октреотида крысам. Крысам вводили PBS, лизин (80 мг), гелофузин (20 мг), волювен (20 мг), реомакродекс (30 мг) или гемаксель (17.5 мг) (0.5 мл внутривенно) за 2–5 мин до введения ^{111}In -октреотида. Результаты представлены в виде среднего значения %ID/г; столбики ошибок указывают SD. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Адаптировано из Van Eerd et al. [20].

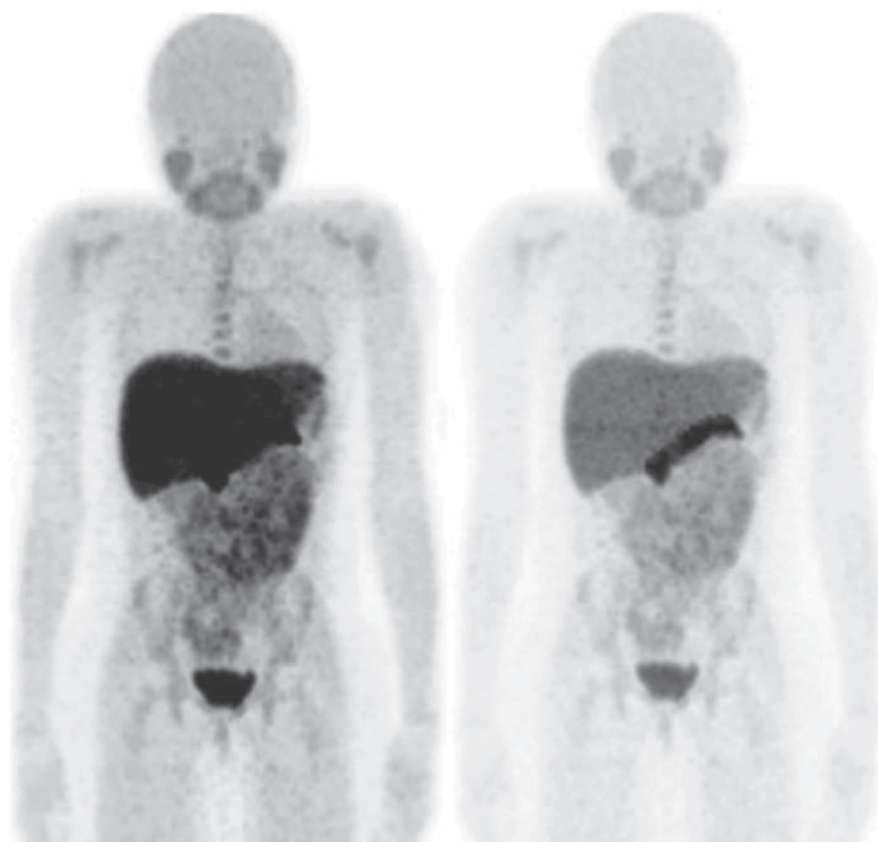


Рис. 11. Проекционное изображение передней части тела с максимальной интенсивностью у 7-летней девочки, обследованной на предмет новообразования головного мозга. Визуализация с двумя различными интенсивностями, чтобы показать относительное распределение ^{11}C -метионина [21].

этих органов. Интенсивное поглощение в верхней части живота может ограничить диагностическую полезность ^{11}C -метионина в этой области.

Фармакокинетика и дозиметрия ^{11}C -метионина у взрослых описаны Deloar et al. на основе данных ПЭТ всего тела [22]. Поджелудочная железа, печень, мочевой пузырь и почки показали наибольшее начальное поглощение ^{11}C -метионина. Субъекты в этом исследовании подвергались сканированию в несколько моментов времени для расчета дозиметрии. Поджелудочная железа и печень имели наибольшую активность среди исследованных органов.

Первые исследования с использованием ^{18}F -FLT у людей показали физиологическое поглощение в костном мозге, печени и мочевыводящих путях. Поглощение не наблюдается в головном мозге, скелетных мышцах и миокарде. Изучено распределение этого РФП в теле человека (рис. 12). Выяснено, что наблюдается повышенное поглощение ^{18}F -FLT в костном мозге, а также в печени и селезенке [23].

Tolvanen et al. [16] изучили распределение ^{11}C -холина у людей. В основном препарат накапливался в почечной коре, слюнных железах, печени, селезенке, поджелудочной железе, крови и мышцах (рис. 13). Особое внимание было уделено

оценке дозы РФП в костях, т.к. костный мозг очень чувствителен к радиации. Результаты ПЭТ-исследований не демонстрировали возможность визуализации костных структур.

Для оценки безопасности $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -аннексина-V Kemerink et al. исследовали его биораспределение у шести добровольцев мужского пола (рис. 14) [24]. Результаты показали следующее: почки накапливали ~50% введенной дозы через 3 ч после инъекции, печень — 13%, красный костный мозг — 9.2%, селезенка — 4.6%. Биологический период полураспада активности, зарегистрированной по всему организму, был длительным (69.7 ч). Обнаружено, что поглощенные дозы составляют 196 ± 31 Гр/МБк для почек, 41 ± 12 Гр/МБк для селезенки, 16.9 ± 1.3 Гр/МБк для печени и 8.4 ± 0.9 Гр/МБк для красного костного мозга. Никаких побочных эффектов не наблюдалось.

В обзоре Lee et al. описаны результаты ПЭТ-исследований у людей с использованием ^{18}F -FMISO. Показано максимальное поглощение в мочевом пузыре (из-за высокого поглощения в моче) и высокое поглощение — в кишечнике, печени и почках. Наименьшее поглощение выявлено в таких органах и тканях, как кровь, селезенка, сердце, легкие, мышцы, кости и головной мозг [25].

Исследование биораспределения ^{111}In -октреотида в организме человека предоставляет ценную

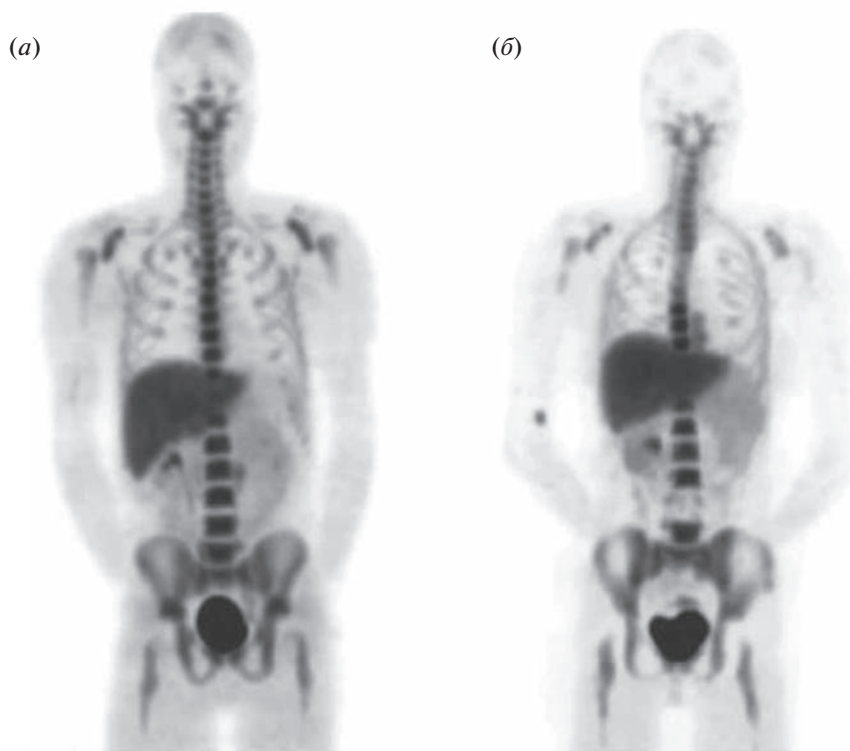


Рис. 12. Нормальное распределение ^{18}F -FLT, выявленное с помощью ПЭТ. Влияние лучевой терапии на активность костного мозга в четвертом поясничном позвонке (а) и средних грудных позвонках (б). Адаптировано из Agoool et al. [23].

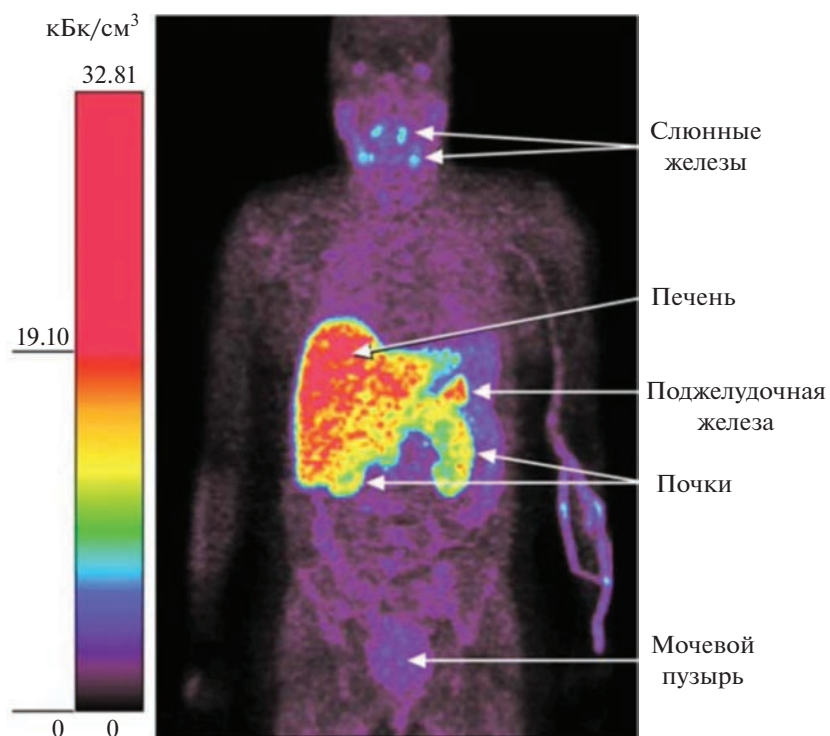


Рис. 13. Репрезентативное корональное ПЭТ-изображение всего тела пациента с ревматоидным артритом через 10 мин после инъекции ^{11}C -холина. Адаптировано из Tolvanen et al. [16].

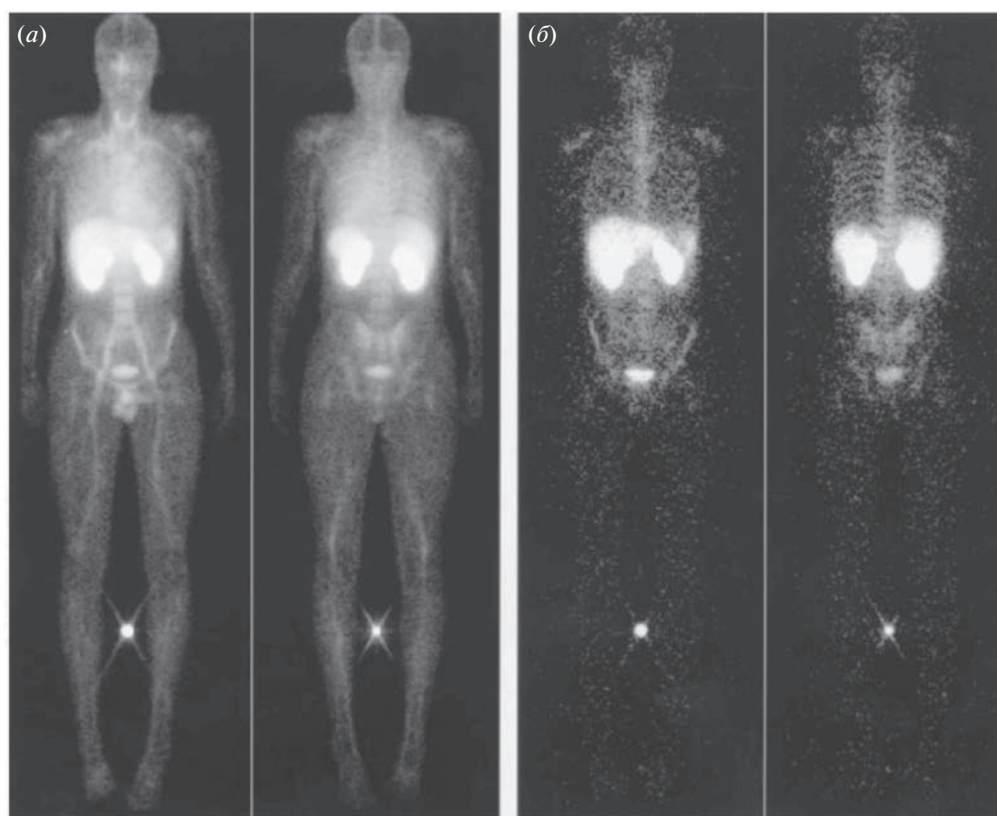


Рис. 14. Сопряженные снимки всего тела 22-летнего добровольца мужского пола через 30 мин (а) и 24 ч (б) после внутривенной инъекции $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -аннексина-V. Адаптировано из Kemerink et al. [24].

информацию о его локализации в тканях. У здоровых людей относительно высокое поглощение этого препарата наблюдается в селезенке, печени, почках и мочевом пузыре. Слабое поглощение также может быть в гипофизе, щитовидной железе и слюнных железах. При применении препарата обычно наблюдается видимая активность кишечника, которая в основном увеличивается на отсроченных изображениях. Активность сердечно-сосудистого кровотока обычно видна на ранних изображениях, и, таким образом, отсроченные изображения более полезны для изображения поражений средостения (патологических состояний, которые захватывают область средостения, т.е. пространство между грудиной и позвоночником, где расположены органы грудной полости) [26]. Согласно работе Forssell-Aronsson et al. [27], в которой было рассмотрено биораспределение введенного внутривенно [^{111}In -DTPA-Phe1]-октреотида 100 пациентам, среди опухолевых тканей в среднем наивысшая активность (%IA/кг) была обнаружена в карциноидных опухолях, а именно 0.33–77 %IA/кг. Для медуллярной карциномы щитовидной железы поглощение было на уровне 0.017–7.8 %IA/кг, а для дифференцированных опухолей щитовидной железы – в пределах 0.061–88 %IA/кг. Интересно, что в данной работе не было выявлено различий в поглощении октреотида доброкачественными и злокачественными опухолями. В то же время два метастаза лимфатических узлов одной из гюртлеклеточной карцином щитовидной железы имели очень высокие значения поглощения (40 и 88 %IA/кг соответственно). Для рака молочной железы наивысшая активность ^{111}In составляла 0.61–7 %IA/кг. Во всех эндокринных опухолях поджелудочной железы (EPT – endocrine pancreatic tumours), кроме одного случая инсулиномы, выявлена очень высокая активность ^{111}In . В целом наивысшая активность ^{111}In регистрировалась в основном в метастазах (а не в первичных опухолях), что наблюдалось в случаях метастазов лимфатических узлов и печени, хотя было несколько исключений.

МИШЕНЬ ДЛЯ РФП

Опухолевые клетки отличаются от здоровых тканей не только своей нестабильностью и быстрым делением, но и способностью накапливать РФП. Это свойство позволяет использовать РФП в диагностике и лечении различных видов рака. Однако для достижения максимальной эффективности лечения необходимо точно определить мишени, на которые будут направлены РФП. В данном разделе мы рассмотрим, какие мишени используются для доставки РФП в раковые ткани, и как это влияет на эффективность лечения.

Метионин – незаменимая аминокислота, необходимая для клеточного роста и репликации. По мере репликации клеток возрастает потребность в синтезе белка и фосфолипидов, что делает транспорт и регенерацию незаменимых аминокислот критически важными для роста опухоли. Известно, что облегченный транспорт аминокислот усиливается через капилляры глиомы, и опухоли могут стимулировать увеличенную экспрессию переносчиков аминокислот в их поддерживающей сосудистой сети [28]. Зависимость от метионина может отражать общий дисбаланс в транسمетилировании, который приводит к гиперметилированию одних веществ и гипометилированию других в опухолевых клетках.

^{18}F -FLT проникает в клетку как посредством пассивной диффузии, так и облегченного транспорта Na^+ -зависимыми носителями. Впоследствии ^{18}F -FLT фосфорилируется тимидинкиназой 1 (TK1) в ^{18}F -FLT-монофосфат, после чего он задерживается в клетке [29]. Установлено, что TK1 – один из маркеров пролиферирующих клеток, который может быть использован при оценке раковой опухоли [30]. Так, выяснено, что активность TK1 в злокачественных клетках в 3–4 раза выше, чем в доброкачественных, что способствует большему накоплению ^{18}F -FLT в опухолевых клетках по сравнению со здоровой тканью.

При образовании опухоли повышается уровень внутриклеточного фосфорилхолина, являющегося ключевым промежуточным продуктом в синтезе фосфатидилхолина. Именно поэтому быстро пролиферирующие опухолевые клетки содержат большое количество фосфатидилхолина и других фосфолипидов. При введении ^{11}C -холина он переносится в указанные клетки специфичными транспортерами, а также может поглощаться через гематоэнцефалический барьер и клеточную мембрану [31].

Один из признаков начала апоптоза клеток – образование фосфатидилсерина на поверхности клетки. Фосфатидилсерин – простой анионный фосфолипид, который обычно ограничен внутренним листком плазматической мембраны. Аннексин-V обладает высоким сродством к клеточным мембранам с привязанным фосфатидилсерином, поэтому аннексин-V используется для выявления апоптоза в гемопоэтических клетках, нейронах, фибробластах, эндотелиальных клетках, гладкомышечных клетках, карциномах, лимфомах. Также в исследовании Stratton et al. [32] этот белок был предложен в качестве средства визуализации для обнаружения тромбов *in vivo*, поскольку активированные тромбоциты экспрессируют большое количество фосфатидилсерина на своей поверхности.

^{18}F -FMISO – биологический маркер тканевой гипоксии. Подробно процесс аккумуляции

^{18}F -флуоромизонидазола в слабо оксигенированных тканях описан Lee et al. [25]. ^{18}F -FMISO попадает в клетку путем пассивной диффузии, где восстанавливается ферментами нитроредуктазами, после чего может сохраняться в пределах клетки лишь при условии пониженного парциального давления кислорода в ткани. В нормально снабжаемых кислородом тканях родительское вещество (изначальная форма РФП, которая не прошла процесс метаболизма) ^{18}F -FMISO быстро реоксигенируется избыточным кислородом и не остается в клетках таких тканей. Отсюда следует, что наблюдается обратная корреляция накопления РФП и содержания кислорода в конкретной ткани. В то же время важное условие сохранения ^{18}F -FMISO в клетке — наличие функционирующих редуктаз, которые не работают в некротизированных тканях. Таким образом, мишенью для данного РФП могут быть все патологии, при которых наблюдается пониженное снабжение тканей кислородом (но не некроз).

Октреотид, представляющий собой октапептид, — это аналог натурального гормона соматостатина, и, соответственно, он прикрепляется к опухолевым клеткам, имеющим рецепторы соматостатина [33].

ПРИМЕНЕНИЕ РФП В ДИАГНОСТИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ

В силу того, что разные РФП реагируют на разных возбудителей в клетках, их применение также отличается. В данном разделе для каждого РФП приведены примеры заболеваний, при которых их можно использовать в качестве веществ для диагностики.

^{11}C -метионин в основном используется в диагностике очаговых поражений в центральной нервной системе. Имеются также исследования с использованием этого радиофармпрепарата в диагностике первичного, вторичного и третичного гиперпаратиреоза, а также множественной миеломы. Также ^{11}C -метионин может применяться для диагностики лимфопролиферативных заболеваний и солидных опухолей.

^{18}F -FLT представляет собой ПЭТ-индикатор, который все чаще используется в исследованиях ПЭТ/КТ для оценки онкологического ответа, являясь биомаркером опухолевой пролиферации для нескольких типов рака, таких как НМРЛ (немелкоклеточный рак легкого), плоскоклеточный рак головы и шеи, рак молочной железы.

^{11}C -холин используется в ПЭТ-диагностике для выявления таких заболеваний, как рак предстательной железы, пищевода, мочевого пузыря и опухоли головного мозга. Также проводились исследования, в которых данный препарат приме-

нялся для визуализации синовиальной пролиферации, связанной с ревматоидным артритом.

Медицинские применения для визуализации меченого аннексина-V разрабатываются с целью использования в онкологии, при трансплантации органов и терапии сердечно-сосудистых заболеваний. В частности, этот препарат позволяет визуализировать апоптотические клетки при остром инфаркте миокарда, миокардите, отторжении трансплантата сердца, нестабильной атеросклеротической бляшке и опухоли после эффективной химиотерапии. Примечательно, что $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -аннексин-V был использован для мониторинга терапевтического эффекта антиапоптотических препаратов у пациентов с сердечной недостаточностью [34].

^{18}F -FMISO представляет собой биомаркер тканевой гипоксии, характерной для солидных опухолей. Так, описывается его применение для диагностики опухолей головы и шеи, плоскоклеточного рака (рак кожи) [35]. Помимо этого, успешным оказалось применение ^{18}F -FMISO в диагностике сарком мягких тканей [36].

Как говорилось выше, октреотид реагирует с рецепторами соматостатина и, соответственно, визуализирует все патологические процессы, при которых возможна экспрессия соматостатиновых рецепторов [37]: опухоли с высоким уровнем экспрессии рецепторов, опухоли симпатoadrenalовой системы (феохромоцитома, нейробластома, ганглионеврома и параганглиома), гастроэнтеропанкреатические опухоли (ГЭП), мелкоклеточный рак легкого, рак молочной железы, лимфомы, астроцитомы и др.

Большинство клинических исследований с использованием ^{11}C -метиона направлено на диагностику различных заболеваний мозга (глиомы, глиобластомы). Проведен обзор исследований, в которых оценивалась точность использования ПЭТ с ^{11}C -метионином для обнаружения глиомы головного мозга и метастаз [38]. Выяснено, что ПЭТ с ^{11}C -метионином показывали точность 76–100% как при глиомах низкой, так и высокой степени злокачественности, но при этом был сделан вывод, что ПЭТ с ^{11}C -метионином не позволяет оценить степень злокачественности глиомы. Проведено исследование, направленное на оценку точности использования ^{11}C -метиона при диагностике множественной миеломы [39]. Обследованы 19 человек с выявленным заболеванием. ПЭТ/КТ с ^{11}C -метионином выявила активную множественную миелому у 15 (78.9%) из 19 пациентов, у 7 (36.8%) из 19 субъектов была выявлена диссеминированная (распространенная) форма заболевания.

Был проведен анализ статьи, представляющей обзор последних ПЭТ-исследований с использо-

ванием ^{18}F -FLT с целью оценки диагностической эффективности данного метода [29]. При исследовании мелкоклеточного рака легких РФП продемонстрировал 86%-ное накопление в злокачественных тканях, причем в доброкачественных тканях обнаружение отсутствовало, что свидетельствует о 100%-ной специфичности данного препарата. При диагностировании опухолей грудной клетки выявлено следующее: при обнаружении злокачественных образований препарат продемонстрировал 56%-ную точность, но при этом специфичность составляла 100%. При исследовании опухолей головного мозга ^{18}F -FLT характеризуется недостаточными показателями и ограниченной способностью визуализации. Однако данный РФП показал более высокие результаты специфичности при обнаружении рецидивов по сравнению с ^{18}F -FDG. В целом не совсем понятно, может ли ^{18}F -FLT быть достаточно специфичным и отличать здоровую ткань от злокачественной в головном мозге. При исследовании колоректального рака ^{18}F -FLT показал высокую чувствительность (>90%) со специфичностью 76%. ^{18}F -FLT смог дифференцировать саркому мягких тканей низкой и высокой степени злокачественности в соответствии с системой классификации, однако невозможно было различить доброкачественные и низкодифференцированные злокачественные опухоли мягких тканей.

Lara et al. [39] изучали эффективность использования ^{11}C -холина для диагностики множественной миеломы. Эксперименты проводили вместе с препаратом ^{11}C -метионином на 19 пациентах. ПЭТ/КТ с использованием ^{11}C -холина показала положительный результат у 14 (73.7%) из 19 пациентов. У остальных четырех (21.1%) пациентов метаболически активной миеломы выявить не удалось. Что касается интрамедуллярных поражений множественной миеломы, ПЭТ/КТ с ^{11}C -холином выявила поражение аппендикулярного скелета у 11 (57.9%) из 19 пациентов.

^{11}C -холин применяется для наблюдения за пациентами с раком простаты. Krause et al. [40] провели исследование с участием 63 пациентов с раком простаты с биохимическим рецидивом после первичного лечения ^{11}C -холином методом ПЭТ/КТ. Выявлена значительная и строгая корреляция между частотой обнаружения рака: частота обнаружения составила 36% для простатического специфического антигена (ПСА) в концентрации <1 нг/мл, 43% — при 1–2 нг/мл, 62% — при 2–3 нг/мл и 73% — при концентрации ≥ 3 нг/мл. Общая частота выявления рака простаты с использованием ^{11}C -холина методом ПЭТ/КТ составила 59%.

Один из альтернативных методов маркировки аннексина-V — использование $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -гидразиникотинамид-аннексина-V — $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-ан-

нексина-V. Применение данной модификации обеспечивает гораздо более простое и быстрое получение данного препарата со значительно более высокими радиохимическими выходами при комнатной температуре и требует существенно более низких начальных активностей (1.11–1.48 ГБк). Все эти преимущества делают $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-аннексин-V гораздо более подходящим препаратом для рутинного производства и быстрого применения в клинических условиях по сравнению с другими методами маркировки $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -аннексина-V. Исследование 18 пациентов с раком головы и шеи показало высокую корреляцию между количественным поглощением опухолью $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -аннексина-V и количеством апоптотических опухолевых клеток. Однако средний процент абсолютного поглощения опухолью введенной дозы на 1 см³ объема опухоли составил всего 0.0003% через 1 ч после инъекции и 0.0001% через 5–6 ч ($p = 0.012$) [41]. Nagula et al. [42] описали применение $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -аннексина-V для визуализации апоптоза при отторжении сердечного аллотрансплантата. В этом исследовании с участием 18 реципиентов сердечного аллотрансплантата у пяти пациентов выявлено положительное поглощение миокардом $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -аннексина-V, а у 13 пациентов поглощение отсутствовало.

Hirata et al. в ПЭТ-исследованиях с препаратом ^{18}F -FMISO для глиомы IV класса получили 100%-ную чувствительность и 100%-ную специфичность. При этом ^{18}F -FDG, использовавшийся для сравнительного исследования тех же опухолей, при такой же чувствительности показал только 66%-ную специфичность [43].

Согласно исследованию Shi et al. [44], ^{111}In -октреотидная скintiграфия оказалась полезной для определения как первичных опухолей, так и отдаленных метастазов для большинства испытуемых ($n = 48$). В данной работе октреотидная скintiграфия показала для карциноидов чувствительность 95%, в то время как для ПЭТ-измерений чувствительность составила всего 90.6%, что соответствует диапазону значений чувствительности ^{111}In -октреотида (85–95%). Среди всех 83 опухолевых поражений 33 (44%) были обнаружены посредством КТ, 29 (43%) — с помощью МРТ и 72 (87%) — с использованием процедуры Osteoscan (скintiграфия с ^{111}In -октреотидом). В то же время, в отличие от МРТ, уровень детектирования костных карциноидных метастазов был низким в данном исследовании (30%). Согласно исследованию тех же Rubello et al. [26], ^{111}In -октреотидная скintiграфия продемонстрировала высокую чувствительность для выявления феохромоцитомы (86%), параганглиомы (100%) и нейробластомы (89%). Однако злокачественное новообразование надпочечников может быть

скрыто наличием интенсивной деятельности почек. Более того, ^{111}In -октреотид не является специфическим индикатором симпатомедуллярных опухолей, поскольку он демонстрирует значительное поглощение в большинстве других нейроэндокринных опухолей, включая доброкачественные и злокачественные, а также в некоторых неэндокринных опухолях, при гранулематозных заболеваниях и аутоиммунных расстройствах. Это поглощение связано с широким распространением по всему организму клеток, экспрессирующих рецепторы соматостатина на своей поверхности, включая активированные лимфоциты. Таким образом, представляется разумным рассматривать сцинтиграфию с ^{111}In -октреотидом в качестве метода второго выбора для симпатомедуллярной визуализации после сцинтиграфии метаиодбензилгуанином (МИБГ), особенно когда результат анализа с использованием МИБГ полностью или частично ложноотрицательный. И наоборот, благодаря своей высокой чувствительности, сцинтиграфию с ^{111}In -октреотидом можно рассматривать как метод сцинтиграфической визуализации первого выбора при нейроэндокринных опухолях, таких как карциноиды, опухоли гипофиза, панкреатические и желудочно-кишечные предшественники аминов. Что касается карциноидов, то в обширном метаанализе Hoefnagel рассчитал чувствительность 86% в группе из 451 пациента, получавшего ^{111}In -октреотид, в то время как в группе из 275 пациентов, получавших ^{131}I -МИБГ, чувствительность составила 70%. Таким образом, ^{111}In -октреотид характеризуется очень высокой чувствительностью, подтвержденной многочисленными исследованиями, но в то же время, вследствие широкой распространенности соматостатиновых рецепторов, экспрессируемых в том числе и здоровыми клетками, специфичность данного РФП недостаточно высокая.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ПЭТ и ОФЭКТ — перспективные методы диагностики злокачественных новообразований, которые не только позволяют получать изображения опухоли, но и представляют собой новый инструмент исследования биологии опухоли без проведения инвазивных процедур. На сегодняшний день в клинике преимущественно используются РФП, нацеленные на метаболизм глюкозы. Тем не менее некоторые метаболически активные ткани или поражения, включая миокард, ткань головного мозга, области воспаления и некоторые доброкачественные опухоли, также могут продемонстрировать повышенное поглощение агентов визуализации, что приводит к невысокой специфичности визуализации с использованием таких препаратов. Применение РФП на основе

иных маркеров позволит увеличить точность и специфичность в диагностике.

^{11}C -метионин — перспективный ПЭТ-РФП. В последние годы появляется все больше исследований, направленных на диагностику и прогнозирование опухолей головного мозга с помощью ^{11}C -метионина.

^{18}F -FLT показывает высокие результаты в современных исследованиях, для некоторых типов рака он оказывается более надежным по сравнению с распространенной ^{18}F -FDG. Благодаря своим свойствам он позволяет обнаружить пролиферацию тканей и обладает 100%-ной специфичностью в головном мозге.

^{11}C -холин накапливается непосредственно в опухолевых клетках, что обеспечивает высокую точность диагностики метастазов всех типов. На сегодняшний день большое количество исследований данного препарата посвящено визуализации рака простаты, т.к. он наиболее эффективен при данном типе заболеваний.

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Аннексин-V — недорогой и легкодоступный препарат. Кроме того, его короткий период полураспада (6 ч) оптимален для ОФЭКТ-визуализации малых молекул, пептидов и небольших белков, а его низкая энергия распада (0.14 МэВ) обеспечивает низкие дозы облучения для пациентов. В совокупности эти желательные характеристики привели к появлению значительного количества работ, в которых исследовали использование $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Аннексина-V для выявления апоптоза.

^{18}F -FMISO — наиболее широко используемый и валидированный ПЭТ-РФП для неинвазивной оценки гипоксии, который приобретает все возрастающую значимость благодаря его потенциалу предсказания реакции на лечение и предоставления прогнозов для широкого диапазона патологических процессов.

^{111}In -ДТРА-октреотид — наиболее распространенный РФП для ОФЭКТ, позволяющий с высокой точностью и специфичностью производить диагностику широкого спектра опухолевых заболеваний, при которых наблюдается как высокая, так и низкая экспрессия соматостатиновых рецепторов.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-24-10046).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wadsack W., Mitterhauser M. // Eur. J. Radiology. 2010. V. 73. P. 461–469.
<https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2009.12.022>
2. Lee Y.S. // Open Nuclear Med. J. 2010. V. 2. P. 178–185.
<https://doi.org/10.2174/1876388X01002010178>
3. Lodi F., Malizia C., Castellucci P., Cicoria G., Fanti S., Boschi S. // Nuclear Med. Biol. 2012. V. 39. P. 447–460.
<https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2011.10.016>
4. Szydło M., Jadwiński M., Chmura A., Gorczewski K., Sokół M. // Contemp. Oncol. (Pozn). 2016. V. 20. P. 229–236.
<https://doi.org/10.5114/wo.2016.61566>
5. Hara T., Yuasa M. // Appl. Radiat. Isot. 1999. V. 50. P. 531–533.
[https://doi.org/10.1016/S0969-8043\(98\)00097-9](https://doi.org/10.1016/S0969-8043(98)00097-9)
6. Bailey D., Humm J., Todd-Pokropek A., van Aswegen A. // Nuclear Medicine Physics. A Handbook for Teachers and Students. Vienna: International Atomic Energy Agency, 2014.
7. Wood B.L., Gibson D.F., Tait J.F. // Blood. 1996. V. 88. P. 1873–1880.
<https://doi.org/10.1182/blood.V88.5.1873.1873>
8. Tait J.F., Brown D.S., Gibson D.F., Blankenberg F.G., Strauss H.W. // Bioconjug. Chem. 2000. V. 11. P. 918–925.
<https://doi.org/10.1021/bc000059v>
9. Jacobson O., Kiesewetter D.O., Chen X. // Bioconjug. Chem. 2015. V. 26. P. 1–18.
<https://doi.org/10.1021/bc500475e>
10. Hermanne A., Adam-Rebele R., Van den Winkel P., Tárkányi F., Takács S. // Radiochim. Acta. 2014. V. 102. P. 1111–1126.
<https://doi.org/10.1515/ract-2013-2233>
11. Afzelius P., Nielsen O.L., Alstrup A.K., Bender D., Leifsson P.S., Jensen S.B., Schönheyder H.C. // Am. J. Nuclear Med. Mol. Imaging. 2016. V. 6. P. 42.
12. Stole S., Jakubíková L., Kukurová I. // Interdiscip. Toxicol. 2011. V. 4. P. 52–55.
<https://doi.org/10.2478/v10102-011-0010-1>
13. Barthel H., Cleij M.C., Collingridge D.R., Hutchinson O.C., Osman S., He Q., Luthra S.K., Brady F., Price P.M., Aboagye E.O. // Cancer Res. 2003. V. 63. P. 3791–3798.
14. Rowe J.A., Morandi F., Wall J.S., Akula M., Kennel S.J., Osborne D., Martin E.B., Galyon G.D., Long M.J., Stuckey A.C., LeBlanc A.K. // Veterinary Radiol. Ultrasound. 2013. V. 54. P. 299–306.
<https://doi.org/10.1111/vru.12024>
15. Zheng Q.H., Stone K.L., Mock B.H., Miller K.D., Fei X., Liu X., Wang J.Q., Glick-Wilson B.E., Sledge G.W., Hutchins G.D. // Nuclear Med. Biol. 2002. V. 29. P. 803–807.
[https://doi.org/10.1016/S0969-8051\(02\)00339-6](https://doi.org/10.1016/S0969-8051(02)00339-6)
16. Tolvanen T., Yli-Kerttula T., Ujula T., Autio A., Lehtikoinen P., Minn H., Roivainen A. // Eur. J. Nuclear Med. Mol. Imaging. 2010. V. 37. P. 874–883.
<https://doi.org/10.1007/s00259-009-1346-z>
17. Tait J.F., Brown D.S., Gibson D.F., Blankenberg F.G., Strauss H.W. // Bioconjug. Chem. 2000. V. 11. P. 918–925.
<https://doi.org/10.1021/bc000059v>
18. Blankenberg F.G., Katsikis P.D., Tait J.F., Davis R.E., Naumovski L., Ohtsuki K., Kopiwoda S., Abrams M.J., Strauss H.W. // J. Nuclear Med. 1999. V. 40. P. 184–191.
19. Seelam S.R., Lee J.Y., Kim Y.J., Lee Y.-S., Jeong J.M. // J. Radiopharm. Mol. Probes. 2015. V. 1. P. 137–144.
<https://doi.org/10.22643/JRMP.2015.1.2.137>
20. Van Eerd J.E.M., Vegt E., Wetzels J.F.M., Russel F.G.M., Masereeuw R., Corstens F.H.M., Oyen W.J.G., Boerman O.C. // J. Nuclear Med. 2006. V. 47. P. 528–533.
21. Harris S.M., Davis J.C., Snyder S.E., Butch E.R., Vāvere A.L., Kocak M., Shulkin B.L. // J. Nuclear Med. 2013. V. 54. P. 1902–1908.
<https://doi.org/10.2967/jnumed.112.118125>
22. Deloar H.M., Fujiwara T., Nakamura T., Itoh M., Imai D., Miyake M., Watanuki S. // Eur. J. Nuclear Med. 1998. V. 25. P. 629–633.
<https://doi.org/10.1007/s002590050265>
23. Agool A., Glaudemans A.W.J.M., Boersma H.H., Dierckx R.A.J.O., Edo Vellenga E., Slart R.H.J.A. // Eur. J. Nuclear Med. Mol. Imaging. 2011. V. 38. P. 166–178.
<https://doi.org/10.1007/s00259-010-1531-0>
24. Kemerink G.J., Liu X., Kieffer D., Ceyssens S., Mortelmans L., Verbruggen A.M., Steinmetz N.D., Vanderheyden J.-L., Green A.M., Verbeke K. // J. Nuclear Med. 2003. V. 44. P. 947–952.
25. Lee S.T., Scott A.M. // Semin. Nucl. Med. 2007. V. 37. P. 451–461.
<https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2007.07.001>
26. Rubello D., Bui C., Casara D., Gross M.D., Fig L.M., Shapiro B. // Eur. J. Endocrinol. 2002. V. 147. P. 13–28.
<https://doi.org/10.1530/eje.0.1470013>
27. Forssell-Aronsson E., Bernhardt P., Nilsson O., Tisell L.-E., Wängberg B., Ahlman H. // Acta Oncol. 2004. V. 43. P. 436–442.
<https://doi.org/10.1080/02841860410030670>
28. Singhal T., Narayanan T.K., Jain V., Mukherjee J., Mantil J. // Mol. Imaging Biol. 2008. V. 10. P. 1–18.
<https://doi.org/10.1007/s11307-007-0115-2>
29. Been L.B., Suurmeijer A.J.H., Cobben D.C.P., Jager P.L., Hoekstra H.J., Elsinga P.H. // Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 2004. V. 31. P. 1659–1672.
<https://doi.org/10.1007/s00259-004-1687-6>
30. Сергеева H.C., Парилова H.K., Маршутина H.B., Меуснер И.С. // Усп. мол. онкол. 2017. Т. 4. С. 17–23.
<https://doi.org/10.17650/2313-805X-2017-4-1-17-23>
31. Cornford E.M., Braun L.D., Oldendorf W.H. // J. Neurochemistry. 1978. V. 30. P. 299–308.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1978.tb06530.x>
32. Stratton J.R., Dewhurst T.A., Kasina S., Reno J.M., Cerqueira M.D., Baskin D.G., Tait J.F. // Circulation. 1995. V. 92. P. 3113–3121.
<https://doi.org/10.1161/01.cir.92.10.3113>

33. Дедов И.И., Вакс В.В. // Проблемы эндокринологии. 2004. Т. 50. С. 42–48.
<https://doi.org/10.14341/probl11628>
34. Doue T., Ohtsuki K., Ogawa K., Ueda M., Azuma A., Saji H., Strauss H.W., Matsubara H. // J. Nucl. Med. 2008. V. 49. P. 1694–1700.
<https://doi.org/10.2967/jnumed.107.050260>
35. Reischl G., Dorow D.S., Cullinane C., Katsifis A., Roselt P., Binns D., Hicks R.J. // J. Nuclear Med. 2007. V. 43. P. 365.
36. Rajendran J.G., Wilson D.C., Conrad E.U., Peterson L.M., Bruckner J.D., Rasey J.S., Chin L.K., Hofstrand P.D., Grierson J.R., Eary J.F., Krohn K.A. // Eur. J. Nuclear Med. Mol. Imaging. 2003. V. 30. P. 695–704.
<https://doi.org/10.1007/s00259-002-1096-7>
37. Bombardieri E., Ambrosini V., Aktolun C., Baum R.P., Bishof-Delaloye A., Del Vecchio S., Maffioli L., Mortelmans L., Oyen W., Giovanna Pepe G., Chiti A. // Eur. J. Nuclear Med. Mol. Imaging. 2010. V. 37. P. 1441–1448.
<https://doi.org/10.1007/s00259-010-1473-6>
38. Glaudemans A.W.J.M., Enting R.H., Heesters M.A.A.M., Dierckx R.A.J.O., van Rheeën R.W.J., Walenkamp A.M.E., Start R.H.J.A. // Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 2013. V. 40. P. 615–635.
<https://doi.org/10.1007/s00259-012-2295-5>
39. Lapa C., Kircher M., Da Via M., Schreder M., Rasche L., Kortüm K.M., Einsele H., Buck A.K., Hänscheid H., Samnick S. // Clin. Nucl. Med. 2019. V. 44. P. 620–624.
<https://doi.org/10.1097/rln.0000000000002638>
40. Krause B.J., Souvatzoglou M., Tuncel M., Herrmann K., Buck A.K., Praus C., Schuster T., Geinitz H., Treiber U., Schwaiger M. // Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 2008. V. 35. P. 18–23.
<https://doi.org/10.1007/s00259-007-0581-4>
41. Van de Wiele C., Lahorte C., Vermeersch H., Loose D., Mervillie K., Steinmetz N.D., Vanderheyden J.L., Cuvelier C.A., Slegers G., Dierck R.A. // J. Clin. Oncol. 2003. V. 21. P. 3483–3487.
<https://doi.org/10.1200/jco.2003.12.096>
42. Narula J., Acio E.R., Narula N., Samuels L.E., Fyfe B., Wood D., Fitzpatrick J.M., Raghunath P.N., Tomaszewski J.E., Kelly C., Steinmetz N., Green A., Tait J.F. // Nature Med. 2001. V. 7. P. 1347–1352.
<https://doi.org/10.1038/nm1201-1347>
43. Hirata K., Terasaka S., Shiga T., Hattori N., Magota K., Kobayashi H., Yamaguchi S., Houkin K., Tanaka S., Kuge Y., Tamaki N. // Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 2012. V. 39. P. 760–770.
<https://doi.org/10.1007/s00259-011-2037-0>
44. Shi W., Wang H.S., Pan Z., Wymore R.S., Cohen I.S., McKinnon D., Dixon J.E. // J. Physiol. 1998. V. 511. P. 675–682.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.675bg.x>

Radiopharmaceuticals for Oncology, Nonspecific to Glucose (PET and SPECT)

E. D. Belitskaya*, **, #, V. A. Dimitreva*, **, A. N. Kozlov*, V. A. Oleinikov*, **, and A. V. Zalygyn*, **,

*Phone: +7 (902) 099-70-00; e-mail: belitskayakatya@yandex.ru

*National Research Nuclear University “MEPhI”, Kashirskoe sh. 31, Moscow, 115409 Russia

**Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

To date, the most common drug for the diagnosis of cancer tumors is [^{18}F]-fluorodeoxyglucose, an radiopharmaceuticals for positron emission tomography diagnostics using the fact of increased glucose metabolism by cancer cells. At the same time, there are a number of cases where an approach based on glucose derivatives is not applicable. In many cases, inflammation or other benign processes are indistinguishable from tumor formations. For such cases of non-specificity of oncologies to glucose (not only tumor cells, but also healthy cells actively consume [^{18}F]-fluorodeoxyglucose), the use of other metabolic pathways is required, which, in the case of a specific tumor in this organ, will be specific to the radiopharmaceuticals used.

Keywords: radiopharmaceuticals, radiopharmacology, radiochemistry, PET, SPECT



ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ ПРОТИВ ВИРУСОВ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА

© 2023 г. А. С. Левина*, #, М. Н. Репкова*, В. Ф. Зарытова*

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Сибирское отделение РАН, Россия, 630090 Новосибирск, просп. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 16.02.2023 г.

После доработки 26.02.2023 г.

Принята к публикации 27.02.2023 г.

Вирус простого герпеса (ВПГ) вызывает широкий спектр заболеваний, начиная от относительно легких первичных поражений кожи и заканчивая тяжелыми и часто смертельными эпизодами энцефалита. В настоящее время наиболее эффективными лекарствами для людей, инфицированных ВПГ, являются аналоги нуклеозидов (например, ацикловир), нацеленные на ферменты, кодируемые вирусной ДНК. Эффективность аналогов нуклеозидов снижается из-за плохой растворимости в воде, быстрого внутриклеточного катаболизма, высокой клеточной токсичности и появления устойчивых вирусных штаммов. Антисмысловая технология, в которой используются терапевтические нуклеиновые кислоты (антисмысловые олигонуклеотиды, их производные и аналоги, а также siРНК), представляется перспективной альтернативой противовирусной терапии из-за высокого сродства этих агентов к нуклеиновым кислотам-мишеням, их высокой растворимости в воде и меньшей цитотоксичности. В последнее десятилетие антисмысловые олигонуклеотиды были исследованы в качестве потенциальных лекарств от различных заболеваний, связанных с “вредными” нуклеиновыми кислотами. Олигонуклеотиды с разными химическими модификациями, нацеленные на конкретные участки генома ВПГ, эффективно подавляли вирус. Агенты на основе siРНК продемонстрировали пролонгированное и эффективное (до 99%) ингибирование репликации ВПГ. На основании публикаций за последние 30 лет, рассмотренных в обзоре, можно сделать вывод о перспективности использования терапевтических нуклеиновых кислот для борьбы с герпес-вирусными инфекциями.

Ключевые слова: нуклеозидные аналоги, антисмысловые олигонуклеотиды, siРНК, ВПГ-1, ВПГ-2

DOI: 10.31857/S013234232306009X, **EDN:** EXWSNV

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	591
ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОВ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА ПЕРВОГО И ВТОРОГО ТИПОВ	592
НУКЛЕОЗИДНЫЕ И НУКЛЕОТИДНЫЕ АНАЛОГИ КАК АГЕНТЫ ПРОТИВ ВИРУСОВ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА	594
АНТИСМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ КАК ПРОТИВОВИРУСНЫЕ АГЕНТЫ.....	596

АНТИСМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ ПРОТИВ ВИРУСОВ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА ..	597
Антисмысловые олигонуклеотиды против ВПГ-1	598
Антисмысловые олигонуклеотиды против ВПГ-2	602
МАЛЫЕ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ РНК (siРНК) ПРОТИВ ВИРУСОВ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА	603
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	605
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	607

ВВЕДЕНИЕ

Вирус простого герпеса (ВПГ) вызывает различные заболевания, начиная от относительно легких первичных поражений кожи, слизистых оболочек и эпителия роговицы до тяжелых и часто смертельных эпизодов энцефалита [1] или глазного герпетического кератита, который может привести к серьезному рубцеванию роговицы и слепоте [2].

Сокращения: АО – антисмысловые олигонуклеотиды; ВПГ – вирус простого герпеса; ВПГ-1 – вирус простого герпеса первого типа; ВПГ-2 – вирус простого герпеса второго типа; НК – нуклеиновые кислоты; АСВ – ацикловир; Ага-А – 9-(β-D-арабинофуранозил)аденин; CDV – цидофовир; FamCV – фамцикловир; FIAC – 1-(2'-дезоксисин-2'-[¹⁸F]фтор-β-D-арабинофуранозил)-5-иодоцитозин; IC₅₀ и IC₉₀ – концентрация агента для ингибирования процесса на 50 и 90% соответственно; siРНК – короткие интерферирующие РНК; shРНК – шпилечные РНК; VaCV – валацикловир.

Автор для связи: (тел.: +7 (913) 756-76-93; эл. почта: asl1032@yandex.ru).

ВПГ обладает низкой видовой специфичностью и может одинаково заражать человека и других животных [3]. Вирус герпеса вызывает различные патологии у человека: герпес-вирусную инфекцию плода и новорожденных, инфекции центральной нервной системы и генитальный герпес. Герпетические заболевания особенно тяжело протекают у людей с ослабленным иммунитетом. Таким образом, ВПГ ассоциирован с очень широким патологическим спектром и оказывает значительное воздействие на общественное здоровье.

Распространенность герпес-вирусных инфекций очень высока. По оценкам, 80–90% людей старше 40 лет инфицированы этими вирусами. Эти вирусы неустойчивы в условиях внешней среды, при комнатной температуре сохраняются не более 24 ч; подвержены действию органических растворителей и хлорсодержащих соединений. Способы распространения вирусов простого герпеса чаще всего требуют прямых контактов (через слюну, кровь, слизистые оболочки или др.).

Основные факты, касающиеся вирусов простого герпеса (по данным ВОЗ, 2017 [4]):

- ВПГ, или герпес, бывает двух видов: вирус простого герпеса первого типа (ВПГ-1) и вирус простого герпеса второго типа (ВПГ-2);

- ВПГ-1 передается главным образом через оральный контакт и вызывает оральный герпес (симптомы которого могут проявляться в виде “простуды на губах”), но также может вызывать и генитальный герпес;

- ВПГ-2 относится к инфекциям, передаваемым половым путем, и вызывает генитальный герпес;

- обе формы, ВПГ-1 и ВПГ-2, вызывают пожизненное инфицирование;

- по оценкам, во всем мире вирусом ВПГ-1 инфицированы ~3.7 млрд человек в возрасте до 50 лет (67% населения);

- предполагается, что во всем мире вирусом ВПГ-2 инфицированы ~417 млн человек в возрасте 15–49 лет (11%);

- симптомы герпеса включают болезненные пузырьки или язвы в инфицированной зоне;

- герпетическая инфекция наиболее контагиозна в период наличия симптомов, но может передаваться и в их отсутствие;

- заражение ВПГ-2 увеличивает риск заражения и передачи ВИЧ.

Высокая распространенность вирусов герпеса в человеческой популяции во многом обусловлена их способностью переходить в латентную фазу после продуктивной (литической) фазы инфекции [5]. Латентная инфекция влечет за собой подавление репликации вируса, поддержание вирусного генома в спящем состоянии в инфициро-

ванных клетках и способность к реактивации. Цикл латентности—реактивации позволяет вирусу неопределенно долго находиться внутри организма хозяина с возможностью размножения всякий раз, когда ситуация выгодна вирусу.

Борьба с герпес-вирусными инфекциями — актуальная проблема здравоохранения. Ни одна вакцина еще не была одобрена для лечения и профилактики ВПГ-инфекций. В настоящее время наиболее эффективными лекарствами для людей, инфицированных ВПГ, являются аналоги нуклеозидов, нацеленные на кодируемые вирусом ферменты. Однако эффективность таких препаратов снижается главным образом из-за появления резистентных вирусных штаммов. Антисмысловая технология, в которой используются терапевтические нуклеиновые кислоты (антисмысловые олигонуклеотиды, их производные и аналоги, а также короткие интерферирующие РНК — siРНК), представляется перспективной альтернативой противовирусной терапии из-за высокого сродства этих агентов к нуклеиновым кислотам-мишеням, их высокой растворимости в воде и меньшей цитотоксичности. Следует иметь в виду, что современные противогерпесные препараты подавляют репликацию ВПГ в литической фазе. Молекулярные механизмы, контролирующие переход из литической в латентную фазу и обратно, требуют специального исследования для создания новых терапевтических средств, нацеленных на латентную инфекцию.

Данный обзор посвящен использованию терапевтических нуклеиновых кислот (антисмысловых олигонуклеотидов, их производных и аналогов, а также siРНК) как агентов против ВПГ-1 и ВПГ-2. В дополнение кратко рассмотрены работы, касающиеся использования нуклеозидных и нуклеотидных аналогов в качестве препаратов для борьбы с герпесными инфекциями.

ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОВ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА ПЕРВОГО И ВТОРОГО ТИПОВ

Вирус простого герпеса первого типа (ВПГ-1, Human alphaherpesvirus 1) вызывает у человека оральный герпес, а вирус простого герпеса второго типа (ВПГ-2, Human alphaherpesvirus 2) — генитальный герпес. Эти вирусы нейротрофные и нейроинвазивные, т.е. после заражения могут мигрировать в нервную систему. Они вызывают специфические иммунологические реакции и характеризуются значительными вариациями в последовательности их геномов. ВПГ-2 особенно опасен для людей с ослабленной иммунной системой (например, для ВИЧ-инфицированных), а также для тех, кто недавно перенес операцию по трансплантации органов.

Как оральный, так и генитальный герпес, как правило, протекают бессимптомно, но иногда могут вызывать появление болезненных волдырей или язв в месте заражения. Раз появившись, вирусы остаются в организме в латентной форме на всю жизнь, а симптомы болезни могут проявиться через много лет. Существующие препараты могут уменьшить тяжесть и частоту симптомов, но не устраняют инфекцию.

ВПГ-1 и ВПГ-2 обычно проникают в организм через кожу или слизистую оболочку и могут привести к локальному поражению в месте заражения. Вирус проникает в тройничные или крестцовые ганглии, где может переходить в латентное состояние. Любые причины, приводящие к иммуносупрессии, обуславливают обострение вирусного заболевания, при этом реактивированный вирус распространяется из ганглиев в нижние слои эпидермиса. Исторически сложилось так, что ВПГ-1, персистирующий в тройничных ганглиях, считался причиной рецидива герпеса на губах, в то время как ВПГ-2 в крестцовых ганглиях вызывал рецидивирующий генитальный герпес. Однако ВПГ-2 также может вызывать оролабиальный герпес; новые данные показывают, что на ВПГ-1 приходится до 50% новых случаев генитального герпеса.

Как и все герпесвирусы, ВПГ имеет две фазы жизнедеятельности: литическую и латентную [6]. Во время литической фазы ВПГ продуцирует инфекционные вирусные частицы для заражения других клеток и организмов, в то время как во время латентной фазы наблюдается ограниченная экспрессия генов и отсутствие инфекционных вирусных частиц. ВПГ может находиться в латентном состоянии в нейронах и способен вызывать заболевание как во время первичной инфекции, так и при реактивации. Механизмы, приводящие к латентности и реактивации, которые обуславливаются вирусными факторами и факторами хозяина, до конца не ясны.

Вирусы простого герпеса — часть большого семейства двухцепочечных ДНК-вирусов с характерной архитектурой вириона. Вирусная частица состоит из нескольких компонентов (рис. 1а). Линейная геномная двухцепочечная ДНК плотно упакована внутри икосаэдрического капсида, который состоит из поверхностных капсомеров (всего 161) и имеет диаметр ~115–130 нм; 150 капсомеров в основном состоят из шести молекул одного вида белка, а 11 капсомеров представляют собой пентамеры того же белка. Капсид окружает сложный белковый слой, тегумент, состоящий из нескольких видов белков. Этот слой, в свою очередь, ограничен самым внешним элементом, оболочкой из липидного бислоя со встроенными молекулами белка (обычно гликозилированными), что дает общий диаметр вирусной частицы ~200 нм.

Геном ВПГ содержит ~150000 п.н., образующих, по крайней мере, 74 гена. В грубом приближении белок-кодирующие гены распределяются с общей плотностью одного гена на 1500–2000 нт. Они транскрибируются РНК-полимеразой хозяина [7]. Вирусная ДНК содержит области уникальных последовательностей, обрамленные прямыми или инвертированными повторами (рис. 1б) [8].

Вирус попадает в клетку после слияния вирусной оболочки и клеточной мембраны. ВПГ использует гликопротеины на своей поверхности для связывания вируса с гепарансульфатом на поверхности клеток-хозяев. Внедрение вируса в клетку подробно описано в обзорах Connolly et al. [1] и Spear et al. [3]. Во время миграции в ядро капсид деградирует. Вирусная транскрипция, репликация ДНК, образование капсида вокруг генетического материала вируса и сборка капсида происходят исключительно в ядре клетки [9].

Вирусы герпеса характеризуются быстрым циклом репликации и могут размножаться во многих тканях, особенно эктодермального происхождения. Репликация ВПГ, как и других герпес-вирусов, — это результат согласованно регулируемого, последовательно упорядоченного каскада событий транскрипции и трансляции, которые классифицируются как немедленно-ранние, ранние и поздние процессы, регулируемые соответствующими генами: immediate-early (IE или α), early (E или β) и late (L или γ) [8]. Немедленно-ранние гены транскрибируются первыми без необходимости предшествующего синтеза вирусных белков. Первая фаза транскрипции соответствует синтезу ранних матричных РНК, кодирующих белки, участвующие в транскрипции вирусных промоторов и в репликации вирусной ДНК. Репликация ДНК осуществляется ферментами вирусного происхождения, включающими, в частности, ДНК-полимеразу и тимидинкиназу. Немедленно-ранние (IE) гены регулируют последующую экспрессию E- и L-генов с помощью транскрипционных и посттранскрипционных механизмов [9, 10]. Затем происходит транскрипция E-генов, экспрессия которых зависит от наличия продуктов IE-генов. E-гены кодируют ферменты метаболизма вирусной репликации, в частности рибонуклеотидредуктазу, тимидинкиназу и ДНК-полимеразу. Экспрессия генов E-группы знаменует начало репликации вирусной ДНК. Гены типа L, которые экспрессируются позже, кодируют белки и структурные гликопротеины, участвующие в образовании капсомеров и оболочек. В общих чертах, ранние гены кодируют ферменты, участвующие в метаболизме нуклеотидов и репликации ДНК плюс ряд гликопротеинов оболочки, а поздние гены кодируют в основном структурные белки вириона.

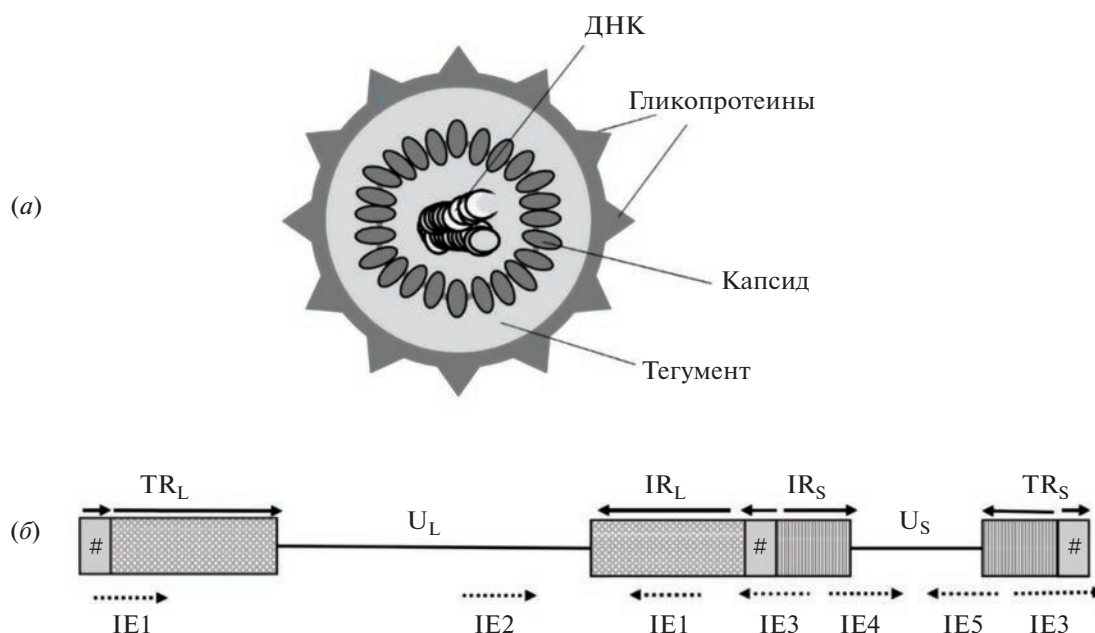


Рис. 1. Вирус простого герпеса. (а) – Структура вириона; (б) – структура ДНК, состоящая из уникальных последовательностей U_L и U_S (unique long and unique short) и фланкирующих прямых или инвертированных повторяющихся последовательностей TR_L , TR_S , IR_L и IR_S (terminal repeat long, terminal repeat short, internal repeat long, internal repeat short). Короткая последовательность # повторяется на концах генома и также присутствует в обратной ориентации между IR_L и IR_S . Пунктирными стрелками показано расположение немедленно-ранних транскриптов IE1–IE5.

Создание лекарств, способных ингибировать экспрессию IE-генов, могло бы снижать репликацию вируса на ранних стадиях заражения.

НУКЛЕОЗИДНЫЕ И НУКЛЕОТИДНЫЕ АНАЛОГИ КАК АГЕНТЫ ПРОТИВ ВИРУСОВ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА

Противовирусные препараты на основе аналогов нуклеозидов используются для лечения инфекций, вызванных ВПГ, уже более 45 лет [11] и до настоящего времени являются молекулами “золотого стандарта”. Они используются для подавления функций вирусной ДНК-полимеразы, тимидинкиназы и рибонуклеотидредуктазы. Эти агенты требуют первоначального фосфорилирования вирусной тимидинкиназой. Затем клеточные киназы генерируют активные для вирусной ДНК-полимеразы трифосфаты аналогов нуклеозидов, которые останавливают ДНК-полимеризацию, т.е. ингибируют репликацию вирусной ДНК. Эффективность нуклеозидных аналогов ограничена необходимостью раннего введения (в течение 24 ч при ВПГ и 72 ч при опоясывающем герпесе).

Аналоги нуклеозидов можно разделить на два основных класса: аналоги пиримидиновых и пуриновых нуклеозидов. Аналоги пиримидина — производные урацила и цитидина, аналоги пурина — производные гуанозина (ациклогуанозина). Вирусная тимидинкиназа более чувствительна

(на порядки величины) к пиримидиновым нуклеозидам, чем к гуанозиновым. Кроме того, аналоги пиримидина являются субстратами тимидинфосфорилазы, которая расщепляет гликозидную связь между сахаром и основанием, а аналоги гуанозина устойчивы к этому ферменту.

К соединениям класса производных пиримидина относится, например, устаревший препарат 5-иодо-2'-дезоксифуридин (5-I-dUrd) [12] для лечения ВПГ-гингивостоматита и глазного стромального кератита. Его применение в контролируемых клинических исследованиях ВПГ-энцефалита выявило высокую токсичность [13].

Были синтезированы 20 аналогов 2-тиопиримидиновых нуклеозидов и исследована их ингибирующая активность в отношении ВПГ-1 и ВПГ-2 [13]. 2'-Дезокси-2-тиоуридин (или 2-тиотимидин) и их 5-галогенированные производные проявляли анти-ВПГ-активность в клеточной системе. 2'-Дезокси-5-галогенированные-2-тиоцитидины также были активными в отношении ВПГ. Замена атома галогена в 5-м положении пиримидиновых колец на более тяжелый атом увеличивала активность против ВПГ. 2'-Дезокси-5-метил- и 2'-дезоксифуридин-5-иодо-2-тиоуридин показали наибольшую активность против ВПГ. Цитотоксичность аналогов 2-тиопиримидиновых нуклеозидов была меньше, чем у 2-оксипроизводных. Индекс селективности 2'-дезоксифуридин-5-иодо-2-тиоуридина был выше, чем у 5-иодоуридина.

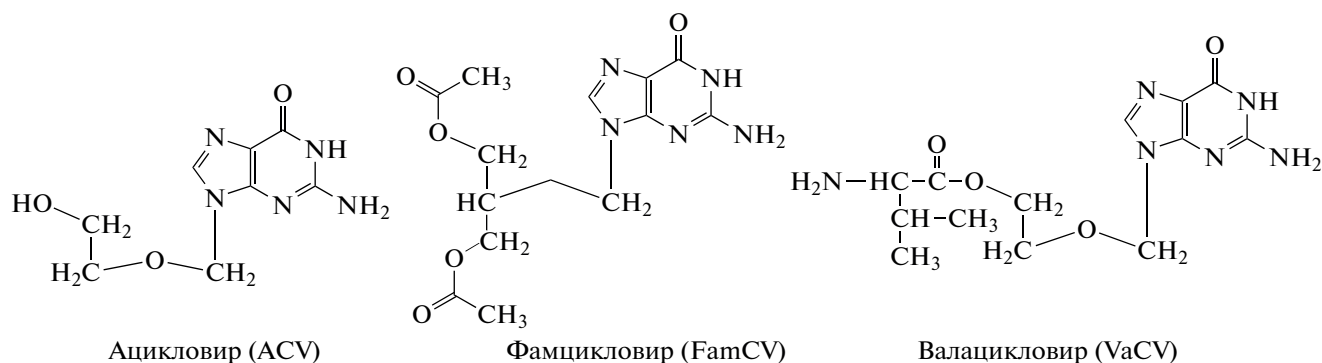


Рис. 2. Структура наиболее эффективных нуклеозидных аналогов для лечения герпес-вирусных инфекций.

Фтор-меченный 1-(2'-дезоксигуанозил)-5-иодоцитозин (^{18}F -FIAC) представляет собой аналог цитидина, синтезированный для позитронно-эмиссионной томографии для визуализации гена тимидинкиназы ВПГ-1 [14]. FIAC — мощный ингибитор репликации вируса при концентрации всего 10 нМ. В то же время FIAC проявляет ограниченную цитотоксичность ($\text{TC}_{50} = 21.7$ мкМ) для незараженных клеток, что указывает на то, что FIAC не является субстратом для тимидинкиназы хозяина.

Была синтезирована серия аналогов 3-дезауридина (3-DU) и оценена их антигерпетическая активность против ВПГ-1 *in vitro* в клетках Vero. Показано, что производные С3-арилированного 3-дезоксидеоксиуридина могут представлять собой новое семейство противогерпетических средств. Интерес к аналогам дезоксиуридина связан с тем, что замена в положении С3 может привести к получению агентов с противовирусной активностью при низкой клеточной токсичности. Однако активность полученных производных уступает таковой для референс-препарата ацикловира [15].

Ряд аналогов пуриновых нуклеозидов, которые препятствуют репликации вирусной ДНК, были одобрены для лечения ВПГ-инфекций человека. 9-(β -D-Арабинофуранозил)аденин (Ara-A, vidarabine) был использован для лечения кератита, энцефалита, неонатальных инфекций и инфекций центральной нервной системы, вызванных вирусом герпеса (преимущественно ВПГ-2) [16, 17]. Сообщения о клинической эффективности противоречивы, основной недостаток для практического применения — крайне низкая растворимость Ara-A в воде.

Вирусная типоспецифическая ДНК-полимераза индуцируется в клетках хозяина при заражении вирусом простого герпеса (ВПГ). Этот фермент необходим для репликации вируса, и его свойства отличаются от свойств ДНК-полимераз хозяина, поэтому он является логической мишенью для разработки селективных противовирус-

ных соединений. Самый широко используемый препарат для воздействия на вирусную ДНК-полимеразу — ацикловир (ACV, рис. 2), разработанный американским фармакологом Г. Элайон, запатентованный в 1974 г. и одобренный для медицинского применения в 1981 г. В 1988 г. Г. Элайон вместе с Д. Блэком и Д. Хитчингсом получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине за разработку принципов создания препаратов, ориентированных на “молекулярные мишени”. Ацикловир — “золотой стандарт” для лечения инфекций слизистых оболочек, кожи и системных инфекций ВПГ-1 и ВПГ-2, инфекций, вызванных вирусом ветряной оспы (ВПГ-3) и цитомегаловирусом.

Ацикловир представляет собой производное гуанозина, 9-(2-гидроксиэтоксиметил)гуанин (рис. 2), который становится активным после фосфорилирования вирусной тимидинкиназой в инфицированных клетках. Активный ингредиент, трифосфат ацикловира, — это субстрат для вирусной ДНК-полимеразы. Сам по себе ACV — конкурентный ингибитор вирусной тимидинкиназы [18], тогда как ACV-трифосфат (ACV-TP) действует как конкурентный ингибитор вирусной ДНК-полимеразы [19]. Местное применение ацикловира уменьшает распространение вируса и ускоряет заживление ран.

6-Тиогуанин (6-TG) [20] — клинически одобренный препарат для лечения острого миелобластного лейкоза у детей, ингибирующий множественные штаммы ВПГ-1 *in vitro* и *in vivo*. 6-TG более эффективен, чем ACV. В клеточной системе значение IC_{50} составляет 0.104 мкМ для 6-TG по сравнению с 1.253 мкМ для ACV. Индекс селективности для 6-TG $\text{SI} > 6000$. При инфекции ВПГ-1 в системе *in vivo* 6-TG в дозе 500 мкМ при местном нанесении на веки значительно ингибирует репликацию ВПГ-1 и ослабляет индуцированный вирусом патогенез. Кроме того, 6-TG эффективен против устойчивых к ACV штаммов ВПГ-1.

К сожалению, использование АСВ, как и других нуклеозидных аналогов, приводит к выработке резистентности. Основная причина – мутации в гене тимидинкиназы, которая после этого становится неспособной фосфорилировать нуклеозидные аналоги. Ацикловир, как и Ага-А, плохо растворим в воде (0.2%), и эта физическая характеристика также ограничивает его применение.

Ацикловир послужил прототипом для разработки целого ряда новых ациклических или карбоциклических аналогов гуанозина [21]. Производные ацикловира – пенцикловир (PCV) и его ацетилированное производное фамцикловир (FamCV) (рис. 2). PCV обладает в ~100 раз более высоким сродством к вирусной тимидинкиназе по сравнению с АСВ, что приводит к образованию гораздо большего количества соответствующего трифосфата. С другой стороны, трифосфат ацикловира проявляет в ~100 раз большее сродство к вирусной ДНК-полимеразе, чем трифосфат пенцикловира [22].

Ганцикловир (GCV), аналог гуанозина, имеет дополнительную гидроксильную группу на предполагаемом 3'-углероде по сравнению с АСВ. Подобно АСВ, GCV демонстрирует плохую пероральную биодоступность, что было преодолено созданием валганцикловира (VGCV) путем присоединения валина [23]. Попав в организм, VGCV превращается в свою активную форму.

В статье De Clercq et al. [24] приведена сравнительная противовирусная активность, основанная на IC_{50} ацикловира (0.1–1 мкМ против ВПГ-1 и ВПГ-2), пенцикловира (0.1–1 мкМ против ВПГ-1 и 1–10 мкМ против ВПГ-2) и ганцикловира (1–10 нМ в отношении ВПГ-1, ВПГ-2). Таким образом, самое активное из упомянутых производных – ганцикловир.

В последние годы разработаны новые противогерпесные препараты на основе нуклеозидов и нуклеотидов, которые либо проходят испытания, либо уже одобрены для использования в клинической практике [21, 25]. Потенциальная проблема, связанная с АСВ, – его низкая пероральная биодоступность. Эта проблема была устранена путем присоединения валина к АСВ с образованием валацкловира (VaCV, рис. 2) [25]. VaCV имеет гораздо более высокую скорость всасывания в кишечнике, что приводит к меньшему расходу препарата при каждой пероральной дозе. При метаболизме в печени и почках валин отщепляется от VaCV, и высвободившийся АСВ приобретает свойственный ему механизм действия.

Как отмечалось ранее, устойчивость к нуклеозидным аналогам в основном приобретается в результате мутаций в гене тимидинкиназы, которая необходима для фосфорилирования, без которого ни один из аналогов нуклеозидов не активен в отношении вирусов герпеса. Один из способов реше-

ния этой проблемы – использование нуклеотидных аналогов, уже содержащих монофосфат.

Примером может служить цидофовир (CDV), аналог монофосфата дезоксицитидина. Устойчивость к CDV возникает в результате мутаций в гене вирусной ДНК-полимеразы, которые могут приводить к устойчивости вируса также к аналогам нуклеозидов. Основным недостатком использования CDV – высокая токсичность для почек [26]. Другой препарат, бринцидофовир, получен после присоединения цепочки липида к CDV [27]. Этот препарат менее токсичен и более эффективен для ингибирования вируса при более низкой общей дозе [28]. Аналог dAMP, адефовир, также ингибирует репликацию ВПГ [29].

Из всех созданных нуклеозидных аналогов наиболее эффективными лекарственными средствами против ВПГ признаны ацикловир (АСВ), фамцикловир (FamCV) и валацикловир (VaCV) (рис. 2) из-за их высокой пероральной биодоступности и быстрого метаболизма в их активные формы. По данным ВОЗ, эти препараты помогают снизить тяжесть и частоту появления симптомов [4].

Следует отметить, что противогерпесные препараты на основе нуклеозидных и нуклеотидных аналогов не в состоянии полностью подавить репродукцию, выделение и передачу вируса. Развитие устойчивости – также важная проблема. Кроме того, при длительном применении аналогов пуриновых нуклеозидов в клинической практике происходит их эффективный катаболизм, который не только снижает биологическую активность препарата, но и приводит к образованию токсических катаболитов.

АНТИСМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ КАК ПРОТИВОВИРУСНЫЕ АГЕНТЫ

Очевидно, что поиск новых путей диагностики и терапии герпес-вирусных инфекций весьма актуален. Желательно разработать препараты и методы терапии, которые одновременно высокоэффективны и не имеют значительных побочных эффектов. Антисмысловые олигонуклеотиды (АО) – потенциальные фармакологические агенты, мощно и высокоспецифично ингибирующие экспрессию мРНК генов различных патогенов, в том числе вирусов.

Терапевтические нуклеиновые кислоты (НК) – перспективные кандидаты для противовирусной терапии, поскольку они обладают высоким сродством к нуклеиновым кислотам и могут быть подобраны практически против любой такой мишени. Они хорошо растворимы в воде, обладают высоким ингибирующим потенциалом и проявляют ограниченную токсичность и иммуногенность [30, 31]. Производные олигонуклеотидов стали

рассматриваться в качестве перспективных терапевтических препаратов более 40 лет назад [32, 33]. В качестве агентов на основе нуклеиновых кислот используются олигонуклеотиды, их аналоги, рибозимы, ДНКзимы, аптамеры, siРНК и др. [31] с различными модификациями как в сахарофосфатном остове, так и в структуре рибозы или гетероциклических оснований [34, 35].

Препараты на основе нуклеиновых кислот — основа нового направления медицины, поскольку они избирательно распознают комплементарные области мишеней — НК — и влияют на их функции в клетках, что позволяет ингибировать экспрессию определенных генов, ответственных за развитие заболевания, не затрагивая гены хозяина. По сравнению с низкомолекулярными фармацевтическими препаратами, агенты на основе НК обладают рядом преимуществ — высокой специфичностью, низкими побочными эффектами и возможностью перенацеливания препаратов на любые целевые НК-мишени, — в то время как поиск новых низкомолекулярных препаратов обычно занимает годы.

Возможны различные механизмы действия АО (рис. 3), один из которых — регулирование сплайсинга. Пре-мРНК сплайсируется в зрелую мРНК в ядре перед трансляцией в цитоплазму. Связываясь с пре-мРНК, АО могут модулировать альтернативный сплайсинг, продуцируя различные варианты белка, что может быть определенным преимуществом для терапии [36]. Другой вариант действия АО — связывание с комплементарными участками мРНК целевых генов, что приводит либо к механическому аресту мРНК, либо к ее деградации с помощью РНКазы Н. В обоих случаях ингибируется экспрессия соответствующего гена [35, 36].

В последнее десятилетие АО-препараты исследовались как потенциальные лекарства от таких заболеваний, как рак [37], диабет [38], боковой амиотрофический склероз (БАС) [39], астма [40], ревматоидный артрит [41], а также заболеваний, вызванных вирусами, например, вирусом иммунодефицита человека [42], вирусом гепатита С [43] и вирусами гриппа [44–48].

Интенсивные исследования в области использования лекарственных препаратов на основе НК начались в 1990-е гг., что привело к появлению в 1998 г. первого противовирусного лекарственного олигонуклеотидного препарата Vitravene (фомивирсен), предназначенного для лечения инфекции, вызванной цитомегаловирусом [49]. Кроме фомивирсена еще несколько АО были одобрены Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA): мипомерсен для лечения гомозиготной семейной гиперхолестеринемии, этеплирсен для лечения мышечной дистрофии Дюшенна, спинраз (нусинер-

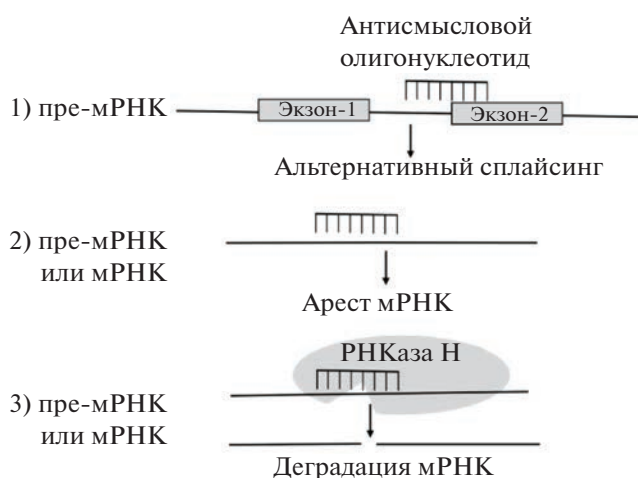


Рис. 3. Возможные механизмы действия антисмысловых олигонуклеотидов.

сен) для лечения спинальной мышечной атрофии, мираверсен для воздействия на вирус гепатита С и др. [50].

АНТИСМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ ПРОТИВ ВИРУСОВ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА

Олигонуклеотиды с различными химическими модификациями, нацеленные на определенные участки генома ВПГ, продемонстрировали различную эффективность при подавлении репликации вирусов герпеса. Сайты сплайсинга немедленно-ранних транскриптов можно рассматривать как возможную мишень для антисмыслового ингибирования. Часто использовались олигонуклеотиды, направленные на акцепторный сайт сплайсинга пре-мРНК немедленно-ранних транскриптов ВПГ IE4 и IE5. В этом случае олигонуклеотиды ингибируют сплайсинг пре-мРНК и, тем самым, синтез соответствующих белка и ДНК, что приводит к подавлению роста вируса. Сайты инициации трансляции немедленно-ранних генов — также часто используемые мишени для воздействия АО, которые содержат последовательность САТ, комплементарную иницирующему кодону AUG в мРНК мишени. Область мРНК, соответствующая сайтам инициации трансляции, вероятно, не образует вторичную структуру и, следовательно, доступна для антисмысловых молекул [51].

В табл. 1 и 2 приведены данные по использованию олигонуклеотидов для подавления репликации ВПГ-1 и ВПГ-2 соответственно. Рассмотрим некоторые работы более подробно.

Антисмысловые олигонуклеотиды против ВПГ-1

Aurelian et al. [52] использовали 12-звенные 2'-*O*-метилрибоолигонуклеотиды с чередующимися фосфодиэфирными и метилфосфонатными межнуклеотидными группами. Один из них, направленный на акцепторный сайт сплайсинга пре-мРНК немедленно-ранних генов ВПГ-1 IE4 и IE5, подавлял репликацию вируса на 80% при концентрации 1 мкМ (табл. 1, № 1).

В работе Kulka et al. [53] 13-звенные олигонуклеотиды с метилфосфонатными межнуклеотидными группами подавляли продукцию ВПГ-1 *in vitro* и *in vivo*. Олигонуклеотид, направленный на акцепторный или донорный сайты сплайсинга пре-мРНК IE4,5 или на сайт инициации трансляции гена IE4, ингибировал рост вируса в клетках на 80–90% при очень высокой концентрации 100–200 мкМ. У мышей наблюдали подавление роста вируса на ~80% при местном применении препарата в концентрации 500 мкМ, а этот же олигонуклеотид, несущий остаток псоралена, после УФ-облучения в месте нанесения подавлял вирус *in vivo* на ~90% при той же концентрации (табл. 1, № 2).

В работе тех же авторов показано [54], что совместное применение олигонуклеотидов, направленных на акцепторный сайт сплайсинга пре-мРНК IE4,5 и на сайты инициации трансляции генов IE1 и IE4 в разных комбинациях, дает синергический эффект, приводя к 70–80%-ному подавлению репликации ВПГ-1 в клеточной системе по сравнению с использованием отдельных олигонуклеотидов (23–28%) при концентрации 12 мкМ (табл. 1, № 3).

Blumenfeld et al. [55] использовали 18-звенный олигонуклеотид с фосфодиэфирными или тиофосфатными межнуклеотидными группами, направленный на акцепторный сайт сплайсинга пре-мРНК IE4 и IE5. Олигонуклеотид Р=S проявил большую активность по сравнению с олигонуклеотидом Р=О, а в присутствии липофектамина был максимально эффективным (подавление репликации ВПГ-1 на 90% при концентрации 10 нМ) (табл. 1, № 4).

В попытках определить и идентифицировать оптимальные мишени для антисмыслового ингибирования вирусов Reuman et al. [10] провели скрининг ста 20-звенных олигонуклеотидов, направленных на различные участки мРНК целевых генов ВПГ-1. Олигонуклеотиды содержали по две тиофосфатных группы на обоих концах для защиты от нуклеаз. Шесть олигонуклеотидов продемонстрировали заметный противовирусный эффект в клеточной системе, а самым эффективным оказался олигомер (50%-ное подавление репликации ВПГ-1 при концентрации 9 мкМ), который был нацелен на область начала трансляции мРНК IE110 (табл. 1, № 5). В работе Peyman et al.

[56] показано, что увеличение числа тиофосфатных групп повышало противовирусную активность олигонуклеотидов, и при замене всех фосфодиэфирных групп на тиофосфатные все олигонуклеотиды проявляли активность при минимальной ингибирующей концентрации 1–10 мкМ. Однако при этом полностью утрачивалась специфичность, т.е. зависимость от последовательности.

Аналогичный эффект отмечен в работе Birch-Hirschfeld et al. [57], в которой тот же олигонуклеотид с полностью тиофосфатными группами (табл. 1, № 6) в клетках почек зеленой марышки (ГМК) проявил высокую активность против ВПГ-1 (ингибирование 90% при концентрации 20 мкМ) по сравнению с частично модифицированными или полностью фосфодиэфирными межнуклеотидными группами (5% при 40 мкМ).

В работах Shoji et al. [58, 59] тиофосфатные олигонуклеотиды (15-мер и 20-мер соответственно), направленные на акцепторный сайт сплайсинга пре-мРНК IE5, почти полностью подавляли ВПГ-1 при концентрации соответственно 10 и 12.5 мкМ (табл. 1, № 7 и 8), в отличие от фосфодиэфирного аналога, который был совершенно неактивен. Использование трансфекционных агентов для доставки олигонуклеотида в клетки не привело к увеличению противовирусного эффекта тиофосфатного олигонуклеотида, однако фосфодиэфирный олигомер, который не проявил никакого эффекта даже при концентрации >680 мкМ, в присутствии липофектина стал активным ($IC_{50} = 0.9$ мкМ), и все-таки его эффект был ниже по сравнению с тиофосфатным аналогом. Авторы сделали вывод о том, что нет необходимости в использовании трансфекционных агентов, т.к. они приводят к увеличению токсичности. В работе той же группы авторов [60] вместо трансфекционных агентов была использована липофильная группировка (остаток гераниола), присоединенная к олигонуклеотиду, что способствовало проникновению в клетки и позволило повысить его противовирусную активность (табл. 1, № 9).

Vinogradov et al. [61] использовали фосфодиэфирные олигонуклеотиды, модифицированные путем присоединения гидрофобных группировок по 3'-концу (акридин или гептандиол) и 5'-концу (ундецил или холестерил), повышающих стабильность и проникающую способность. Модифицированные таким образом олигонуклеотиды проявили высокую активность против ВПГ-1 (до 100% при концентрации 4 мкМ при введении через 22 ч после инфекции) (табл. 1, № 10).

Двухцепочечный олигонуклеотид, образующий шпильку, проявил не очень высокую активность против ВПГ-1 в клетках Vero (табл. 1, № 11) [62]. Олигонуклеотид, несущий фотоактивируемый остаток псоралена и направленный на акцепторный сайт сплайсинга пре-мРНК IE22 и IE 47, ин-

Таблица 1. Антисмысловые олигонуклеотиды для подавления репликации ВПГ-1

№	Тип АО* (трансфекционный агент)	Последовательность (5'-3')	Мишень	IC ₅₀ (IC ₉₀), мкМ	Ингибирование, % (концентрация, мкМ)	Модели <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>	Ссыл- ка
1	P-CH ₃ /P=O, 2'-O-Me	GGCGTCCTCCTT (3'-5')	Акцепторный сайт сплайсинга пре-мРНК IE4,5	0.17 (1.7)	80 (1)	Клетки HeLa	[52]
2	P-CH ₃	TTCCTCCTGCGG	Акцепторный сайт сплайсинга пре- мРНК IE4,5	20	80–90 (100–200)	Клетки HeLa	[53]
		GCTTACCCGTGC	Донорный сайт сплайсинга пре-мРНК IE4,5	25			
		AATGTCGGCCAT	Сайт инициации трансляции гена <i>IE4</i>	20			
		TTCCTCCTGCGG	Акцепторный сайт сплайсинга пре- мРНК IE4,5	–	80 (500)	Мыши Balb/c	
		Psoralen-TTCCTCCTGCGG			90 (500) (УФ)		
3	P-CH ₃	Psoralen-GCGGGGCTCCAT (A)	Сайт инициации трансляции гена <i>IE1</i>	17 (110)	28 (12) (УФ)	Клетки HeLa	[54]
		TTCCTCCTGCGG (B)	Акцепторный сайт сплайсинга пре- мРНК IE4,5	20 (95)	25 (12) (УФ)		
		AATGTCGGCCAT (C)	Сайт инициации трансляции гена <i>IE4</i>	20 (98)	23 (12)		
		A + B		4 (17)	70 (12) (УФ)		
		A + C		3 (15)	80 (12) (УФ)		
4	P=O	ACGTTCTCCTCCTGCGGAA (3021)	Акцепторный сайт сплайсинга пре- мРНК IE4,5	14	90 (40)	Клетки Vero	[55]
	P=S			–	100 (40)		
	P=S (липофектамин)			8	90 (0.01)		
5	Сто АО, по две P=S на обоих концах	GCGGGGCTCCATGGGGTCTG (максимальный эффект)	Сайт инициации трансляции гена <i>IE110</i> , кодирующего регуляторный белок	–	50 (9)	Клетки Vero	[10]
6	P=S	GCGGGGCTCCATGGGGTCTG	Сайт инициации трансляции гена <i>IE110</i> , кодирующего регуляторный белок	–	90 (20) для P=S	Клетки GMK	[57]
7	P=S	AGGGCGTTCTCCTCTG	Акцепторный сайт сплайсинга пре- мРНК IE5	4	~100 (~10)	Клетки Vero	[58]

Таблица 1. Окончание

№	Тип АО* (трансфекционный агент)	Последовательность (5'-3')	Мишень	IC ₅₀ (IC ₉₀), мкМ	Ингибирование, % (концентрация, мкМ)	Модели <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>	Ссыл- ка
8	P=S без липофек- тина	ACGAGGGCGGTTCCCTCCTGCG	Акцепторный сайт сплайсинга пре- мРНК IE5	2.07	~100 (12.5)	Клетки Vero	[59]
	P=O + липофектин			0.9	—		
9	P=O	Geranyl-GCGGGGTGAGCCCC	пре-мРНК IE5	—	~10 (2.5) без Ger ~100 (2.5) с Ger	Клетки Vero	[60]
10	P=O	Undecyl-CGTTCCCTCCTGC-Acг Chol-GGAAAAACATCGCGGTT GTT-Hept	Сайт сплайсинга 983—994 мРНК IE5 Область старт-кодона мРНК гена, кодирующего вирусную ДНК-полиме- разу	—	90 (2) 100 (4)	Клетки Vero	[61]
11	Шпильчатый АО (липофектин)	CCCCGATCGTCCACACGGAGC GCG GGGGCTAGCAGGTGTGC CTCGCGC	Ген IE, кодирующий белок ICP4	0.3	60 (1)	Клетки Vero	[62]
12	P=O	Psoralen-GGGCGTCCCTCCTT	Акцепторный сайт сплайсинга пре- мРНК IE22 и IE47	—	80 (0.5) (УФ-облучение)	Клетки Vero	[63]
13	P=S	GACCCATTTCGAGACGAC	Область AUG кодона гена UL12-4, кодирующего щелочную ДНКазу	>250	80 (40)	Клетки Vero	[64]
14	P=S	ACCGAGGTCCATGTGCGTACGC	Область иницирующего кодона гена, кодирующего капсидный белок UL13	—	90 (4)	Клетки HeLa	[65]
15	P=S	GCCGAGGTCCATGTGCGTACGC (1082)	Сайт инициации трансляции мРНК белка UL13	0.275	99.5 (4)	Ретикуло- циты кролика	[66]
16	РРМО**	GGTCGTATGCGGGCTGGAGGG TCGC	Участок, примыкающий к сайту иници- ации трансляции мРНК гена ICP0	—	70—98% (20)	Клетки кожи кролика	[70]
					37.5—50% (10 мкг)	Мыши Webster	
		GGTGTGCGGATATGGCCTCTGG TGG	Участок, примыкающий к сайту иници- ации трансляции мРНК гена ICP27		88% (20)	Клетки кожи кролика	

* Олигонуклеотиды с метилфосфатными (P-CH₃), фосфодиэфирными (P=S), тиофосфатными (P=O), фосфодиэфирными (P=S) межнуклеотидными группами и 2'-O-метильными (2'-O-Me) группами.

** Морфолиновые олигонуклеотиды, конъюгированные с транспортным пептидом (РРМО).

Таблица 2. Антисмысловые олигонуклеотиды для подавления репликации ВПГ-2

№	Тип АО* (трансфекционный агент)	Последовательность (5'-3')	Мишень	IC ₅₀ (IC ₉₀), мкМ	Ингибирование, % (концентрация, мкМ)	Модели <i>in vitro/in vivo</i>	Ссыл- ка
1	P=O	GCGCCCGGCTGCGAGAA (3023)	Акцепторный сайт сплайсинга пре-мРНК IE4,5	24	40 (20); 60 (40)	Клетки Vero	[55]
	P=S			6	80 (20); 100 (40)		
2	P=S	AGGGCGTTCCCTCCTG	Акцепторный сайт сплайсинга пре-мРНК IE5	0.25	~100 (0.5)	Клетки Vero	[59]
3	P=S	GCCGAGGTCCATGTCGTACGC (1082)	Сайт инициации трансляции мРНК белка UL13	0.25	99.5 (4)	Ретикулоциты кролика	[66]
4	P-CH ₃ /P=O, 2'-O-Me	GCCATTGGAACC (3'-5')	Сайт инициации трансляции мРНК белка R1	0.11 (1)	89 (1); 99 (5)	Клетки HeLa	[52]
5	P-CH ₃ /P=O, 2'-O-Me (вирусный вектор)	TGCCATTGGAACC + UTARVE (вектор)	Сайт инициации трансляции мРНК белка R1	0.002	~80 (0.01)	Клетки A549	[71]
6	РРМО**	GGTTCCATGAGCCGGIGTAGGGTA	Сайт инициации трансляции мРНК гена ICP0	–	73 (20)	Клетки Vero	[72]
		GTAGCCATGTTGTAGTGC GCCGG	Сайт инициации трансляции мРНК гена ICP27		~90 (20)		
		GTAGCCATGTTGTAGTGC GCCGG	Сайт инициации трансляции мРНК гена ICP27		50 (100)	Хлопковые крысы	

* Олигонуклеотиды с метилфосфонатными (P-CH₃), фосфоэфирами (P=O), тиоэфирными (P=S) межнуклеотидными группами и 2'-O-метильными группами.

** Морфолиновые олигонуклеотиды, конъюгированные с транспортным пептидом (РРМО).

гибировал ВПГ-1 на 80% при концентрации 0.5 мкМ после облучения клеток УФ-светом (табл. 1, № 12) [63].

Chiba et al. [64] для подавления репликации ВПГ-1 использовали олигонуклеотиды с тиофосфатными группами, направленные на AUG-содержащую область гена щелочной ДНКазы. Самый активный из олигонуклеотидов при концентрации 40 мкМ ингибировал репликацию вируса в клетках Vero на ~80% (табл. 1, № 13), при этом количество мРНК соответствующего гена уменьшалось на 88%, что указывает на антисенс-механизм действия олигонуклеотида.

Noke et al. [65] показали большую противовирусную активность олигонуклеотида с полностью модифицированными тиофосфатными межнуклеотидными группами (подавление репликации ВПГ-1 ~90%, табл. 1, № 14) по сравнению с частично модифицированными олигомерами (20–30%).

Draper et al. [66] исследовали противовирусную активность большого числа олигонуклеотидов Р=О и Р=S, направленных на различные участки мРНК генов ВПГ-1 и ВПГ-2. Вирусный белок UL13 демонстрирует высокую степень консервативности и соответствия нуклеотидной последовательности среди гомологов различных ВПГ-1 и ВПГ-2, поэтому он представляет собой подходящую мишень для антисмыслового ингибирования. Капсидный белок вириона UL13, обладающий протеинкиназной активностью, участвует в специфическом фосфорилировании капсидных белков вириона. Как и в других случаях, тиофосфатные аналоги оказались намного более активными, чем олигонуклеотиды Р=О. Наиболее эффективный олигонуклеотид Р=S 1082, направленный на сайт инициации трансляции мРНК белка UL13, ингибировал репликацию обоих вирусов в клеточной системе на 99.5% при концентрации 4 мкМ (табл. 1, № 15 и табл. 2, № 5). Его активность была сравнима с активностью ацикловира. Олигонуклеотид Р=S 1082 проявил активность в отношении устойчивых к АСВ штаммам вируса. Кроме того, на кроликах было показано, что местное применение Р=S 1082 значительно уменьшало тяжесть ВПГ-индуцированного стромального кератита (табл. 1, № 15 и табл. 2, № 3).

Вышеперечисленные работы были проведены 20–30 лет назад. Чаще всего в них использовались олигонуклеотиды с нативными фосфодиэфирными или модифицированными (тиофосфатными, метилфосфонатными) межнуклеотидными группами. После некоторого перерыва работы по использованию антисенс-технологии в отношении герпесных инфекций были продолжены. На новом этапе использования антисенс-технологии для борьбы с вирусами герпеса стали применяться агенты на основе нуклеиновых кислот следующего поколения, в частности морфолиновые олигонук-

леотиды (РМО) и siРНК. РМО представляют собой аналоги олигонуклеотидов, содержащих морфолиновые кольца вместо рибозы [67]. Они устойчивы к клеточным нуклеазам и не теряют способность образовывать комплементарные дуплексы с РНК-мишенями. РМО, конъюгированные с транспортным пептидом (РРМО) используются в качестве противовирусных антисенс-олигомеров во многих работах (например, [68, 69]).

Moerdyk-Schauwecker et al. [70] исследовали противогерпесный эффект РРМО, направленных на участки, примыкающие к сайту инициации немедленного-ранних генов ВПГ-1 (*ICP0* и *ICP27*), важных для жизнедеятельности вируса. Белок *ICP0* предотвращает подавление вирусной ДНК, а белок *ICP27* функционирует на всех стадиях биогенеза мРНК: транскрипции, процессинга, трансляции и др. Конъюгат РРМО, направленный на сайт инициации трансляции мРНК гена *ICP0*, ингибировал в клеточной системе репликацию нескольких штаммов ВПГ-1 (70–98%), включая устойчивые к ацикловиру штаммы (70–90%) при концентрации 20 мкМ, и проявил значительную эффективность *in vivo* на модели глазной герпетической инфекции у мышей (снижение частоты заболеваний глаз на 37.5–50.0% по сравнению с контрольной группой) (табл. 1, № 16).

Антисмысловые олигонуклеотиды против ВПГ-2

Относительно небольшое число исследований посвящено воздействию антисмысловых олигонуклеотидов на ВПГ-2, причем авторы этих работ, как правило, одновременно исследовали противовирусный эффект в отношении обоих типов вируса.

Blumenfeld et al. [55] использовали 18-звенный олигонуклеотид 3023 (табл. 2, № 1) с тиофосфатными или фосфодиэфирными межнуклеотидными группами, направленный на акцепторный сайт сплайсинга пре-мРНК IE4 и IE5 ВПГ-2. Полностью тиофосфатный олигонуклеотид 3023 проявил высокую противовирусную активность (подавление репликации вируса на 100% при концентрации 40 мкМ, табл. 2, № 1), аналогичную активности олигонуклеотида 3021, направленного на такую же область ВПГ-1 (табл. 1, № 4).

Олигонуклеотид Р=S, направленный на акцепторный сайт сплайсинга пре-мРНК IE5, был использован для подавления репликации как ВПГ-1 (табл. 1, № 7), так и ВПГ-2 (табл. 2, № 2) [58]. В обоих случаях было показано практически полное ингибирование обоих типов вируса при концентрации 0.5 мкМ.

Draper et al. [66] подтвердили большую эффективность олигонуклеотидов Р=S. Один и тот же олигонуклеотид Р=S 1082, направленный на сайт инициации трансляции мРНК белка UL13, ис-

пользовали для воздействия на ВПГ-1 и ВПГ-2, поскольку последовательность гена, кодирующего этот белок, гомологична для обоих типов вируса. Как и в случае ВПГ-1, использованный олигонуклеотид ингибировал репликацию ВПГ-2 на 99.5% при концентрации 4 мкМ (табл. 1, № 15 и табл. 2, № 3).

Aurelian et al. [52, 71], как и в случае работы с ВПГ-1, использовали модифицированный 2'-О-метилрибоолигонуклеотид с чередующимися фосфодиэфирными и метилфосфонатными межинуклеотидными группами, направленный на сайт инициации трансляции мРНК белка R1 (также известного как ICP10) ВПГ-2. Ингибирование репликации ВПГ-2 было высокоэффективным (99% при концентрации 5 мкМ) (табл. 2, № 4). Концентрацию олигонуклеотида удалось значительно снизить при использовании вирусного вектора UTARVE для доставки олигонуклеотида в клетки (ингибирование 80% при концентрации 0.01 мкМ) (табл. 2, № 5).

В работе Eide et al. [72] морфолиновый олигонуклеотид (РРМО), направленный на сайт инициации трансляции мРНК гена *ICP27*, ингибировал репликацию ВПГ-2 *in vitro* на ~90% при концентрации 20 мкМ (табл. 2, № 6), причем был более эффективен при профилактическом применении. Эффективное ингибирование (84%) показано также для штаммов, устойчивых к ацикловиру. На модели *in vivo* на крысах, зараженных ВПГ-2, показан благоприятный эффект РРМО, применение которого привело к уменьшению генитальных поражений и снизило смертность на 50% по сравнению с контролем.

МАЛЫЕ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ РНК (siРНК) ПРОТИВ ВИРУСОВ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА

Один из классов олигонуклеотидных терапевтических средств — двухцепочечные siРНК (длина 21–25 нт). Показано, что siРНК связываются с комплексом белков RISC (RNA-induced silencing complex), в состав которого входит эндонуклеаза семейства Argonaute (AGO). Одна из цепей siРНК (пассажирская) деградирует и удаляется из комплекса с RISC. Оставшаяся (направляющая) цепь в составе RISC связывается с комплементарным участком целевой РНК. После точной комплементации эндонуклеаза AGO в составе RISC разрушает выявленную РНК. Процесс разрушения РНК с участием siРНК и комплекса белков RISC каталитический. Благодаря такому механизму действия молекула siРНК может быть использована для нацеливания почти на все гены, представляющие интерес.

Агенты на основе siРНК использовались для подавления репликации ВПГ обоих типов в большом числе исследований (~200 работ). siРНК по-

давляет экспрессию генов, как и в случае АО, специфичным для последовательности образом. Основные проблемы, связанные с использованием siРНК, — их быстрый гидролиз под действием клеточных нуклеаз и необходимость разработки эффективной системы доставки к клеткам-мишеням. В обзорах [73–75] рассмотрен механизм действия siРНК и способы ее доставки в клетки при использовании против вирусов ВПГ и ВИЧ. Особые сложности возникают при доставке siРНК в клетки в случае ВПГ-2. В обзоре Baxi et al. [76] рассмотрены системы для усиления вагинальной доставки siРНК на основе липидов, полимерных наночастиц, транспортных пептидов и др. В обзоре Manda et al. [75] исследованы различные мишени для воздействия siРНК и обсуждены преимущества нацеливания на менее изученный ген *UL10*.

В настоящем обзоре мы упомянем некоторые из работ последних лет (вплоть до 2022 г.), касающиеся конкретного воздействия siРНК на мРНК определенных генов ВПГ-1 и ВПГ-2.

Mollaei et al. [77] использовали две siРНК, доставленные с помощью трансфекционного агента и нацеленные на различные участки гена *UL42* ВПГ-1, который кодирует многофункциональный полипептид, ассоциированный с вирусной ДНК-полимеразой и жизненно важный для репликации ДНК вируса. Использование более эффективной siРНК привело к снижению титра ВПГ-1 на 90–99% и блокированию экспрессии гена *UL42* на 96–99% в экспериментах *in vitro*. Авторы показали специфичность действия использованной siРНК. Следует отметить, что высокий противовирусный эффект достигался при использовании достаточно низких (наномолярных) концентраций препаратов (табл. 3, № 1).

Jbara-Agbaria et al. [78] для подавления репликации ВПГ-1 использовали siРНК, направленную на мРНК гена, кодирующего белок ICP0, который важен для регуляции вирусной инфекции (предотвращает подавление вирусной ДНК). Авторы исследовали роль различных трансфекционных агентов для действия siРНК. При использовании липофектамина для доставки siРНК в клетки продемонстрирована значительная противовирусная активность препарата при концентрации 1.5–6 мкг/мл (соответствует ~0.1–0.4 мкМ), выраженная в уменьшении числа бляшек и в снижении уровня экспрессии белка ICP0 (табл. 3, № 2).

Белки *UL29* и *UL28* ВПГ-1 имеют решающее значение для его репликации и упаковки соответственно. Song et al. [79] для подавления репликации ВПГ-1 использовали шпилечные РНК (shРНК), нацеленные на гены *UL29* и *UL28* и доставленные в клетки в составе вектора аденовируса человека 5-го типа с дефектом репликации. Результаты показали, что shРНК, доставляемые с

Таблица 3. Малые интерферирующие РНК (siРНК) для подавления репликации ВПГ-1

№	Тип АО (трансфекционный агент)	Мишень (клетки <i>in vitro</i> ; модель <i>in vivo</i>)	Ингибирование, % (концентрация, нМ)	Модель <i>in vitro/in vivo</i>	Ссылка
1	siРНК, Р=О (транспортный пептид)	мРНК гена, кодирующего белок UL42	96–99 (0.5–30)	Клетки HeLa	[77]
2	siРНК, Р=О (липофектамин)	мРНК гена, кодирующего белок ICP0	~85 (400)	Клетки HaCaT	[78]
3	shРНК, Р=О (аденовирусный вектор)	мРНК генов белков UL28 и UL29, ответственных за репли- кацию и упаковку	90–98	Клетки Vero	[79]
4	Набор siРНК, Р=О (липофектамин)	Разные участки мРНК гена, кодирующего белок UL29	99.9 (50)	Клетки U373MG	[80]
5	Набор siРНК, Р=О	Разные участки мРНК гена, кодирующего белок UL29	Выживаемость 60% (250 пмоль на один глаз)	Мыши BALB/c	[81]
6	Набор siРНК, Р=О (липофектамин)	Разные участки мРНК гена, кодирующего белок UL29	98 (10)	Клетки Vero	[82]
7	Набор siРНК, Р=О, 2'-F (липофектамин)	Разные участки мРНК гена, кодирующего белок UL29	99 (1.8)	Эпителиальные клетки роговицы глаза человека	[83]

помощью вектора, значительно (в 10 и 20 раз соответственно) подавляли репликацию ВПГ-1 *in vitro*. Использование двух shРНК, направленных одновременно на оба гена, давали синергический эффект (подавление репликации на 98%) (табл. 3, № 3).

Группа исследователей под руководством V. Hukkanen [80–83] использовала ферментативно созданные наборы siРНК для подавления репликации ВПГ. Проведена оценка противовирусной активности набора siРНК, нацеленных на гены *UL54*, *UL29* или *UL27*, против различных патогенных штаммов ВПГ-1 [80]. Исследование проводили на трех клеточных линиях, представляющих ткани хозяина, которые поддерживают репликацию ВПГ-1: эпителиальные, глазные и нервные клетки. На клетках астроцитомы человека U373MG показано, что пул, нацеленный на ген *UL29* (10 пмоль на лунку), оказывает наиболее выраженный противовирусный эффект (ингибирование вируса на три порядка) (табл. 3, № 4).

В работе той же группы авторов [81] исследована противовирусная активность набора siРНК, направленных на ген *UL29*, *in vivo* на мышах линии BALB/c. Показано уменьшение вирусной нагрузки, облегчение симптомов болезни и значительное увеличение выживаемости по сравнению с контролем (60 против 20%) (табл. 3, № 5).

Проведена оценка противовирусного потенциала ферментативно полученного набора siРНК, нацеленных на мРНК гена *UL29* ВПГ-1, против 17 циркулирующих штаммов ВПГ-1 в сравнении

с ацикловиром [82]. В клеточной системе значения IC_{50} для siРНК (0.5–3.0 нМ) были гораздо ниже по сравнению с ацикловиром (350–1911 нМ). Кроме того, показано, что устойчивый к ацикловиру штамм ВПГ-1, лишенный тимидинкиназы, высокочувствителен к используемой siРНК ($IC_{50} = 1.0$ нМ) и подавляется на 98% при концентрации 10 нМ (табл. 3, № 6).

Показана высокая эффективность набора 2-фтор-модифицированных антивирусных siРНК, нацеленных на ген *UL29* ВПГ-1, в эпителиальных клетках роговицы глаза человека [83]. Репликацию вируса удалось снизить на 99% при использовании полностью или частично модифицированных siРНК при концентрации 2.6 и 1.8 нМ соответственно, в то время как практически такая же эффективность немодифицированных siРНК достигалась при большей концентрации (5.5 нМ) (табл. 3, № 7).

Достаточно много работ посвящено использованию siРНК против ВПГ-2. Особое внимание уделено способам доставки siРНК.

Steinbach et al. [84] использовали siРНК для нокдауна нектина, рецепторного белка клетки-хозяина, необходимого для первоначального связывания и последующего распространения вируса. Показано, что siРНК в виде конъюгата с наночастицами PLGA (poly(lactic-co-glycolic acid)) (si-NP) или в присутствии липофектина (si-LP) обеспечила подавление синтеза мРНК нектина в клетках HeLa до 80% при концентрации 100 нМ

Таблица 4. Малые интерферирующие РНК (siРНК) для подавления репликации ВПГ-2

№	Тип АО (трансфекционный агент)	Мишень (клетки <i>in vitro</i> , модель <i>in vivo</i>)	Ингибирование, % (концентрация, нМ)	Модель <i>in vitro/in vivo</i>	Ссылка
1	siРНК, Р=О (наночастицы PLGA или липофектин)	мРНК гена нектина	50–80 (100)	Клетки HeLa	[84]
			85–95 (0.5 нмоль на мышь)	Мыши C57BL/6	
2	Chol-siРНК, Р=S	мРНК гена нектина или гена, кодирующего белок UL29	97–98 (не указано)	Клетки NIH3T3	[85]
			Выживаемость 60–80 (2 нмоль/кг)	Мыши BALB/c	
3	siРНК, Р=О (олигофектамин)	мРНК гена, кодирующего белок UL29	96–98 (100)	Клетки NIH3T3 или Vero	[86]
			Выживаемость 75 (0.5 нмоль) <i>in vivo</i>	Трансгенные мыши	
4	Au-siРНК, Р=О	мРНК генов, кодирующих капсомер UL18.1 и ДНК- связывающий белок UL29.2	~100 (2–4)	Клетки Vero	[87]

(по siРНК). Интравагинальное введение si-NP и si-LP мышам (0.5 нмоль на мышь) привело к увеличению выживаемости зараженных мышей и уменьшению показателей клинического расстройства, а подавление экспрессии мРНК нектина достигал 85–95% (табл. 4, № 1).

В работе Wu et al. [85] использование тиофосфатных siРНК, конъюгированных с холестерином (chol-siРНК) и направленных на ген нектина или белка UL29, привело к 97–98%-ному подавлению репликации ВПГ-2 *in vitro*. Интравагинальное введение chol-siРНК защищало мышей от ВПГ-2 в течение недели, независимо от того, вводили препарат до или после заражения. При концентрации 2 нмоль/кг использование chol-siРНК повышало выживаемость мышей до 60–80% (табл. 4, № 2).

Palliser et al. [86] использовали siРНК, конъюгированные с олигофектамином и нацеленные на мРНК генов UL5, UL27 и UL29 ВПГ-2 (кодирующих, соответственно, комплекс геликазы–праймазы, гликопротеин В оболочки и ДНК-связывающий белок). Показано, что наиболее эффективная siРНК UL29 в клеточной системе подавляет вирусную репликацию на 96–98% при концентрации 100 нМ. На трансгенных мышях, несущих ген *GFP*, показано, что интравагинальное введение siРНК UL29 (0.5 нмоль) улучшает выживаемость мышей до 75%, причем у выживших мышей не наблюдалось клинических проявлений заболевания (табл. 4, № 3).

Palliser et al. [87] показали, что siРНК, конъюгированные с наночастицами золота и направленные на различные гены ВПГ-2, представляют собой многообещающую платформу для разра-

ботки новых противoinфекционных препаратов. В этом случае нет необходимости в дополнительном трансфекционном агенте для доставки siРНК в клетки. В работе использованы siРНК, направленные на гены, кодирующие капсид UL18.1 и ДНК-связывающий белок UL29.2. Оба препарата практически полностью ингибировали репликацию ВПГ-2 в культуре клеток при концентрации 2–4 нМ (табл. 4, № 4), в отличие от полностью неактивных siРНК, не связанных с золотом.

Currie et al. [88] разработали наноноситель на основе полисукцинимиды, метоксиполиэтиленгликоля и пиренметиламина (PPAP) для доставки siРНК. На примере нокдауна гена домашнего хозяйства *GAPDH* (~97%) показано потенциальное применение PPAP-siРНК для интравагинальной доставки siРНК для борьбы с инфекциями, передающимися половым путем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Герпес – хроническая вирусная инфекция. При попадании в организм человека вирус простого герпеса сохраняется там на всю жизнь. Избавиться от него навсегда, к сожалению, невозможно, поскольку вирус остается в нервных клетках в латентном состоянии и при определенных условиях (например, при снижении иммунитета, простуде, стрессе и т.д.) реактивируется и снова начинает размножаться.

Появление штаммов ВПГ, устойчивых к применяемым в настоящее время нуклеозидным препаратам, а также токсическое действие этих препаратов делают поиск альтернативных методов лечения актуальной задачей. Разработка методов

с использованием антисенс-технологии — перспективный шаг в данном направлении. Успех этой стратегии зависит как от эффективной системы доставки в клетки, так и от выбора подходящей мишени.

Терапевтические нуклеиновые кислоты, рассмотренные в данном обзоре в качестве перспективных препаратов против ВПГ, действуют на мРНК, продукт транскрипции вирусной ДНК.

Разброс данных об эффективности применения тех или иных антисенс-реагентов связан с несколькими причинами:

- антисенс-реагенты направлены на различные участки разных генов;
- применяли антисенс-реагенты, модифицированные различным образом;
- использовали разные дозы при заражении вирусами;
- исследовали воздействие антисенс-реагентов на разных этапах заражения;
- применяли разные способы доставки антисенс-реагентов в клетки;
- использовали разные модели (клетки или животные).

Тем не менее можно сделать несколько общих выводов.

В качестве мишеней для антисенс-реагентов почти всегда используются мРНК немедленно-ранних генов (*IE*), в частности генов белков ICP (Infected Cell Polypeptides), причем чаще всего используются сайты инициации трансляции этих генов, включающих иницирующий кодон AUG. Акцепторные сайты сплайсинга *IE*-транскриптов — также часто используемые мишени.

Олигонуклеотиды с природными фосфодиэфирными межнуклеотидными группами практически неэффективны без дополнительных приемов, обеспечивающих их доставку в клетки (например, использование трансфекционных агентов или конъюгирование с определенными группировками). Чаще всего используются частично или полностью модифицированные олигонуклеотиды с тиофосфатными межнуклеотидными группами.

В самых ранних работах для достижения ощутимого противовирусного эффекта часто использовались олигонуклеотиды в очень высокой концентрации (вплоть до 100 или даже 500 мкМ, см. табл. 1, № 2), хотя в некоторых случаях хорошие результаты (до 100% ингибирования) были получены при использовании меньших, но все же микромолярных концентраций (например, табл. 1, № 7, 8 и 10).

В большинстве случаев описано использование антисмысловых олигонуклеотидов для подав-

ления репликации ВПГ-1. Что касается ВПГ-2, то, как правило, эти исследования — продолжение работ, касающихся ВПГ-1. В некоторых случаях для подавления репликации обоих вирусов используется один и тот же олигонуклеотид, поскольку нуклеотидные последовательности генов-мишеней у обоих типов вирусов гомологичны (см., например, работы Shoji et al. [59] (табл. 1, № 7 и табл. 2, № 2) и Draper et al. [66] (табл. 1, № 15 и табл. 2, № 3).

Следует отметить, что в последние годы для борьбы с герпес-вирусными инфекциями почти не используются АО или их аналоги в качестве агентов для непосредственного воздействия на вирусы. Однако появились работы по успешному использованию АО для воздействия на TNF- α , который играет роль в иммунопатологии и репликации вируса в модели острого ретинита, вызванного ВПГ-1 (например, [89–91]).

Достаточно много работ посвящено применению siРНК против ВПГ-1 и ВПГ-2, причем как в исследованиях *in vitro*, так и *in vivo*. Внимание исследователей в последние годы переключилось на siРНК, которые используются для подавления репликации не только вирусов герпеса, но и других вирусов, а также для воздействия на гены, ответственные за другие заболевания (онкологические наследственные, нейродегенеративные и др.).

Большое значение в последние годы придается решению проблемы доставки АО и siРНК в клетки. Эта проблема особенно сложна в случае борьбы с ВПГ-2 и другими инфекциями, передаваемыми половым путем. При разработке эффективной системы доставки следует учитывать различные физиологические барьеры, такие как pH и эпителий влагалища, препятствующих проникновению siРНК в клетки при местном применении [76].

Необходимо подчеркнуть, что siРНК используются в гораздо меньших (наномолярных) концентрациях по сравнению с микромолярными концентрациями АО, что свидетельствует об экономической целесообразности использования siРНК, несмотря на их более высокую стоимость по сравнению с АО.

Во всех работах отмечается селективность действия АО и siРНК, т.е. противовирусный эффект достигается исключительно агентами, комплементарными выбранным мРНК-мишеням. Таким образом, подтверждается антисенс-механизм воздействия на вирусный геном. Кроме того, показано, что используемые препараты в рабочих концентрациях не токсичны *in vitro* и *in vivo*.

В целом на основании литературных данных, рассмотренных в данном обзоре, можно сделать вывод о перспективности использования тера-

пептических нуклеиновых кислот для борьбы с герпес-вирусными инфекциями. Антисенс-терапия в настоящее время проходит клиническую оценку; это способствует масштабным исследованиям, и можно надеяться на ощутимые успехи этого направления в отношении не только вирусных инфекций, но и других заболеваний, ассоциированных с нуклеиновыми кислотами.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-00184).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описание исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Connolly S.A., Jackson J.O., Jardtzyk T., Longnecker R. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2011. V. 9. P. 369–381. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2548>
2. Crooke R.M., Hoke G.D., Shoemaker J.E. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992. V. 36. P. 527–532. <https://doi.org/10.1128/AAC.36.3.527>
3. Spear P.G., Longnecker R. // *J. Virology.* 2003. V. 77. P. 10179–10185. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.19.10179-10185.2003>
4. Всемирная организация здравоохранения. Вирус простого герпеса. <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>
5. Knipe D.M., Raja P., Lee J.S. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. P. 11993–11994. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516224112>
6. Zhu S., Viejo-Borbolla A. // *Virulence.* 2021. V. 12. P. 2670–2702. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1982373>
7. McGeoch D.J., Rixon F.J., Davison A.J. // *Virus Res.* 2006. V. 117. P. 90–104. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.01.002>
8. Roizman B., Knipe D.M., Whitley R.J. // *Herpes Simplex Viruses. Fields Virology* / Eds. Knipe D.M., Howley P.M. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
9. Sedlackova L., Rice S.A. // *J. Virol.* 2008. V. 82. P. 1268–1277. <https://doi.org/10.1128/JVI.01588-07>
10. Peyman A., Helsberg M., Kretzschmar G., Mag M., Grabley S., Uhlmann E. // *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* 1995. V. 376. P. 195–198. <https://doi.org/10.1515/bchm3.1995.376.3.195>
11. Field H.J. // *J. Clin. Virol.* 2001. V. 21. P. 261–269. [https://doi.org/10.1016/s1386-6532\(00\)00169-4](https://doi.org/10.1016/s1386-6532(00)00169-4)
12. Breeden C.J., Hall T.C., Tyler H.R. // *Ann. Intern. Med.* 1966. V. 65. P. 1050–1056. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-65-5-1050>
13. Shigeta S., Mori S., Kira T., Takahashi K., Kodama E., Konno K., Nagata T., Kato H., Wakayama T., Koike N., Saneyoshi M. // *Antivir. Chem. Chemother.* 1999. V. 10. P. 195–209. <https://doi.org/10.1177/095632029901000404>
14. Chan P.C., Wu C.Y., Chang W.Y., Chang W.T., Alaud-din M., Liu R.S., Lin W.J., Chen F.D., Chen C.L., Wang H.E. // *Nucl. Med. Biol.* 2011. V. 38. P. 987–995. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2011.04.003>
15. Lalut J., Tripoteau L., Marty C., Bares H., Bourgougnon N., Felpin F.X. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012. V. 22. P. 7461–7464. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.10.047>
16. Thomson C., Whitley R. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2011. V. 697. P. 221–230. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7185-2_15
17. Chong E.M., Wilhelmus K.R., Matoba A.Y., Jones D.B., Coats D.K., Paysse E.A. // *Am. J. Ophthalmol.* 2004. V. 138. P. 474–475. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2004.04.027>
18. Elion G.B. // *Am. J. Med.* 1982. V. 73. P. 7–13. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(82\)90055-9](https://doi.org/10.1016/0002-9343(82)90055-9)
19. Furman P.A., St Clair M.H., Spector T. // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. P. 9575–9579.
20. Chen D., Liu Y., Zhang F., You Q., Ma W., Wu J. // *Microbiol. Spectr.* V. 9. P. e00646-21. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00646-21>
21. Sadowski L.A., Upadhyay R., Greeley Z.W., Margulies B.J. // *Viruses.* 2021. V. 13. P. 1228. <https://doi.org/10.3390/v13071228>
22. Lazarus H.M., Belanger R., Candoni A., Aoun M., Jurewicz R., Marks L. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999. V. 43. P. 1192–1197. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.5.1192>
23. Jung D., Dorr A. // *J. Clin. Pharmacol.* 1999. V. 39. P. 800–804. <https://doi.org/10.1177/00912709922008452>
24. De Clercq E., Andrei G., Snoeck R., De Bolle L., Naesens L., Degrebe B., Balzarini J., Zhang Y., Schols D., Leyssen P., Ying C., Neyts J. // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2001. V. 20. P. 271–285. <https://doi.org/10.1081/NCN-100002298>
25. Birkmann A., Zimmermann H. // *Curr. Opin. Virol.* 2016. V. 18. P. 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.01.013>
26. Meier P., Dautheville-Guibal S., Ronco P.M., Rossert J. // *Nephrol. Dial. Transplant.* 2002. V. 17. P. 148–149. <https://doi.org/10.1093/ndt/17.1.148>
27. Ahmed A. // *Infect. Disord. Drug Targets.* 2011. V. 11. P. 475–503. <https://doi.org/10.2174/187152611797636640>

28. Griffiths P., Lumley S. // *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2014. V. 27. P. 554–559.
<https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000107>
29. Aduma P., Connelly M.C., Srinivas R.V., Fridland A. // *Mol. Pharmacol.* 1995. V. 47. P. 816–822.
30. Hagedorn P.H., Yakimov V., Ottosen S., Kammler S., Nielsen N.F., Hog A.M., Hedtjörn M., Meldgaard M., Möller M.R., Orum H., Koch T., Lindow M. // *Nucleic Acid Ther.* 2013. V. 23. P. 302–310.
<https://doi.org/10.1089/nat.2013.0436>
31. Mescalchin A., Restle T. // *Molecules.* 2011. V. 16. P. 1271–1296.
<https://doi.org/10.3390/molecules16021271>
32. Belikova A.M., Zarytova V.F., Grineva N.I. // *Tetrahedron Lett.* 1967. V. 37. P. 3557–3562.
[https://doi.org/10.1016/s0040-4039\(01\)89794-x](https://doi.org/10.1016/s0040-4039(01)89794-x)
33. Zamecnik P., Stephenson M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1978. V. 75. P. 280–284.
<https://doi.org/10.1073/pnas.75.1.280>
34. Bennett C.F. // *Annu. Rev. Med.* 2019. V. 70. P. 307–321.
<https://doi.org/10.1146/annurev-med-041217-010829>
35. Shen X., Corey D.R. // *Nucleic Acids Res.* 2018. V. 46. P. 1584–1600.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx1239>
36. Havens M.A., Hastings M.L. // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44. P. 6549–6563.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw533>
37. Castanotto D., Stein C.A. // *Curr. Opin. Oncol.* 2014. V. 26. P. 584–589.
<https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000127>
38. Hnik P., Boyer D.S., Grillone L.R., Clement J.G., Henry S.P., Green E.A. // *J. Diabetes Sci. Technol.* 2009. V. 3. P. 924–930.
<https://doi.org/10.1177/193229680900300440>
39. Amado D.A., Davidson B.L. // *Mol. Ther.* 2021. V. 29. P. 345–358.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.04.008>
40. Seguin R.M., Ferrary N. // *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2009. V. 18. P. 1505–1517.
<https://doi.org/10.1517/13543780903179294>
41. Roman-Blas J.A., Jimenez S.A. // *Osteoarthritis Cartilage.* 2006. V. 14. P. 839–848.
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2006.04.008>
42. Matzen K., Elzaouk L., Matskevich A.A., Nitzsche A., Heinrich J., Moelling K. // *Nat. Biotechnol.* 2007. V. 25. P. 669–674.
<https://doi.org/10.1038/nbt1311>
43. Janssen H.L.A., Reesink H.W., Lawitz E.J., Zeuzem S., Rodriguez-Torres M., Patel K., van der Meer A.J., Patrick A.K., Chen A., Zhou Y., Persson R., King B.D., Kauppinen S., Levin A.A., Hodges M.R. // *N. Engl. J. Med.* 2013. V. 368. P. 1685–1694.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1209026>
44. Wong J.P., Christopher M.E., Salazar A.M., Sun L.Q., Viswanathan S., Wang M., Saravolac E.G., Cairns M.J. // *Front. Biosci. Schol.* 2010. V. 2. P. 791–800.
<https://doi.org/10.2741/s102>
45. Ge Q., Pастей M., Kobasa D., Puthavathana P., Lupfer C., Bestwick R.K., Iversen P.L., Chen J., Stein D.A. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006. V. 50. P. 3724–3733.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00644-06>
46. Zhang T., Wang T., Zhao P., Liang M., Gao Y., Yang S., Qin C., Wang C., Xia X. // *Int. Immunopharmacol.* 2011. V. 11. P. 2057–2061.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.08.019>
47. Levina A.S., Repkova M.N., Ismagilov Z.R., Shikina N.V., Malygin E.G., Mazurkova N.A., Zinov'ev V.V., Evdokimov A.A., Baiborodin S.I., Zarytova V.F. // *Sci. Rep.* 2012. V. 2. P. 256.
<https://doi.org/10.1038/srep00756>
48. Levina A.S., Repkova M.N., Bessudnova E.V., Filippova E.I., Mazurkova N.A., Zarytova V.F. // *Beilstein J. Nanotechnol.* 2016. V. 7. P. 1166–1173.
<https://doi.org/10.3762/bjnano.7.108>
49. Perry C.M., Balfour J.A. // *Drugs.* 1999. V. 57. P. 375–380.
<https://doi.org/10.2165/00003495-199957030-00010>
50. Yu A.M., Tu M.J. // *Pharmacol. Ther.* 2022. V. 230. P. 107967.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107967>
51. Cantin E.M., Podsakoff G., Willey D.E., Openshaw H. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 1992. V. 312. P. 139–149.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3462-4>
52. Aurelian L., Smith C.C. // *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2000. V. 10. P. 77–85.
<https://doi.org/10.1089/oli.1.2000.10.77>
53. Kulka M., Wachsman M., Miura S., Fischelevich R., Miller P.S., Ts'o P.O., Aurelian L. // *Antiviral. Res.* 1993. V. 20. P. 115–130.
[https://doi.org/10.1016/0166-3542\(93\)90002-z](https://doi.org/10.1016/0166-3542(93)90002-z)
54. Kulka M., Smith C.C., Levis J., Fischelevich R., Hunter J.C., Cushman C.D., Miller P.S., Ts'o P.O. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994. V. 38. P. 675–680.
<https://doi.org/10.1128/AAC.38.4.675>
55. Blumenfeld M., Meguenni S., Poddevin B., Vasseur M. // *WO1995004141A1*, 09.02.1995.
56. Peyman A., Helsberg M., Kretzschmar G., Mag M., Rytte A., Uhlmann E. // *Antivir. Res.* 1997. V. 33. P. 135–139.
[https://doi.org/10.1016/s0166-3542\(96\)01003-0](https://doi.org/10.1016/s0166-3542(96)01003-0)
57. Birch-Hirschfeld E., Knorre C.M., Stelzner A., Schmidtke M. // *Nucleos. Nucleot.* 1997. V. 16. P. 623–628.
<https://doi.org/10.1080/07328319708002926>
58. Shoji Y., Shimada J., Mizushima Y., Iwasawa A., Nakamura Y., Inouye K., Azuma T., Sakurai M., Nishimura T. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996. V. 40. P. 1670–1675.
<https://doi.org/10.1128/AAC.40.7.1670>
59. Shoji Y., Norimatsu M., Shimada J., Mizushima Y. // *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 1998. V. 8. P. 255–263.
<https://doi.org/10.1089/oli.1.1998.8.255>
60. Shoji Y., Ishige H., Tamura N., Iwatani W., Norimatsu M., Shimada J., Mizushima Y. // *J. Drug Target* 1998. V. 5.

- P. 261–273.
<https://doi.org/0.3109/10611869808995880>
61. Vinogradov S.V., Suzdaltseva Y., Alakhov V.Y., Kabanov A.V. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994. V. 203. P. 959–966.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.2275>
62. Clusel C., Meguenni S., Elias I., Vasseur M., Blumenfeld M. // *Gene Expr.* 1995. V. 4. P. 301–309.
63. Jacob A., Duval-Valentin G., Ingrand D., Thuong N.T. // *Eur. J. Biochem.* 1993. V. 216. P. 19–24.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18111.x>
64. Chiba A., Ogasawara M., Yoshida I., Knox Y.M., Suzutani T. // *Tohoku J. Exp. Med.* 2000. V. 192. P. 141–149.
<https://doi.org/doi/10.1620/tjem.192.141>
65. Hoke G.D., Draper K., Freier S.M., Gonzalez C., Driver V.B., Zounes M.C., Ecker D.J. // *Nucleic Acids Res.* 1991. V. 19. P. 5743–5748.
<https://doi.org/10.1093/nar/19.20.5743>
66. Draper K.G., Ecker D.J., Mirabelli C.K., Crooke S.T. // *Patent US 6310044 B1*, publ. 30.10.2001.
67. Nelson M.H., Stein D.A., Kroeker A.D., Hatlevig S.A., Iversen P.L., Moulton H.M. // *Bioconjug. Chem.* 2005. V. 16. P. 959–966.
<https://doi.org/10.1021/bc0501045>
68. Patel D., Opriessnig T., Stein D.A., Halbur P.G., Meng X.J., Iversen P.L., Zhang Y.J. // *Antiviral Res.* 2008. V. 77. P. 95–107.
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.09.002>
69. Ge Q., McManus M.T., Nguyen T., Shen C.H., Sharp P.A., Eisen H.N., Chen J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 2718–2723.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0437841100>
70. Moerdyk-Schauwecker M., Stein D.A., Eide K., Blouch R.E., Bildfell R., Iversen P., Jin L. // *Antiviral Res.* 2009. V. 84. P. 131–141.
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.07.020>
71. Smith C.C., Kulka M., Aurelian L. // *Int. J. Oncol.* 2000. V. 17. P. 841–850.
<https://doi.org/10.3892/ijo.17.4.841>
72. Eide K., Moerdyk-Schauwecker M., Stein D.A., Bildfell R., Koelle D.M., Jin L. // *Antivir. Ther.* 2010. V. 15. P. 1141–1149.
<https://doi.org/10.3851/IMP1694>
73. Wheeler L.A. // *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 2014. V. 2014. P. 125087.
<https://doi.org/10.1155/2014/125087>
74. Katakowski J.A., Palliser D. // *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2010. V. 12. P. 192–202.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20373263>
75. Manda V., Josyula V.R., Hariharapura R.C. // *VirusDis.* 2019. V. 30. P. 180–185.
<https://doi.org/10.1007/s13337-018-00508-z>
76. Baxi K., Sawarkar S., Momin M., Patel V., Fernandes T. // *Drug Del. Transl. Res.* 2020. V. 10. P. 962–974.
<https://doi.org/10.1007/s13346-020-00741-4>
77. Mollaei H., Monavari S., Arabzadeh S., Shahrabadi M.S., Fazlalipour M. // *J. Antivir. Antiretrovir.* 2014. V. 6. P. 114–119.
<https://doi.org/10.4172/JAA.10000106>
78. Jbara-Agbaria D., Blondzik S., Burger-Kentischer A., Agbaria M., Nordling-David M.M., Giterman A., Aizik G., Rupp S., Golomb G. // *Pharmaceutics.* 2022. V. 14. P. 633.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030633>
79. Song B., Liu X., Wang Q., Zhang R., Yang T., Han Z., Xu Y. // *J. Neurovirol.* 2016. V. 22. P. 799–807.
<https://doi.org/10.1007/s13365-016-0453-4>
80. Paavilainen H., Lehtinen J., Romanovskaya A., Nygårdas M., Bamford D.H., Poranen M.M., Hukkanen V. // *J. Med. Virol.* 2016. V. 88. P. 2196–2205.
<https://doi.org/10.1002/jmv.24578>
81. Paavilainen H., Lehtinen J., Romanovskaya A., Nygårdas M., Bamford D.H., Poranen M.M., Hukkanen V. // *Antivir. Ther.* 2017. V. 22. P. 631–637.
<https://doi.org/10.3851/IMP3153>
82. Kalke K., Lehtinen J., Gnjatovic J., Lund L.M., Nyman M.C., Paavilainen H., Orpana J., Lasanen T., Frejborg F., Levanova A.A., Vuorinen T., Poranen M.M., Hukkanen V. // *Viruses.* 2020. V. 12. P. 1434.
<https://doi.org/10.3390/v12121434>
83. Kalke K., Lund L.M., Nyman M.C., Levanova A.A., Urtti A., Poranen M.M., Hukkanen V., Paavilainen H. // *PLoS Pathog.* 2022. V. 18. e1010688.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010688>
84. Steinbach J.M., Weller C.E., Booth C.J., Saltzman W.M. // *J. Control. Release.* 2012. V. 162. P. 102–110.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.06.008>
85. Wu Y., Navarro F., Lal A., Basar E., Pandey R.K., Manoharan M., Feng Y., Lee S.J., Lieberman J., Palliser D. // *Cell Host Microbe.* 2009. V. 5. P. 84–94.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.12.003>
86. Palliser D., Chowdhury D., Wang Q.Y., Lee S.J., Bronson R.T., Knipe D.M., Lieberman J. // *Nature.* 2006. V. 439. P. 89–94.
<https://doi.org/10.1038/nature04263>
87. Wolff N., Kollenda S., Klein K., Loza K., Heggen M., Brochhagen L., Witzke O., Krawczyk A., Hilger I., Eppe M. // *Nanoscale Adv.* 2022. V. 4. P. 4502–4516.
<https://doi.org/10.1039/d2na00250g>
88. Currie S., Kim S., Gu X., Ren X., Lin F., Liu S., Yang C., Kim J., Liu S. // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2020. V. 196. P. 111287.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111287>
89. Grajewski R.S., Li J., Wasmuth S., Hennig M., Bauer D., Heiligenhaus A. // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2012. V. 250. P. 231–238.
<https://doi.org/10.1007/s00417-011-1840-4>
90. Li J., Wasmuth S., Bauer D., Baehler H., Hennig M., Heiligenhaus A. // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2008. V. 246. P. 1265–1273.
<https://doi.org/10.1007/s00417-008-0839-y>
91. Mei H., Xing Y., Yang J., Wang A., Xu Y., Heiligenhaus A. // *Pathobiology.* 2009. V. 76. P. 45–50.
<https://doi.org/10.1159/000178155>

Therapeutic Nucleic Acids against Herpes Simplex Viruses

A. S. Levina^{*, #}, M. N. Repkova^{*}, and V. F. Zarytova^{*}

[#]Phone +7 (913) 756-76-93; e-mail: asl1032@yandex.ru

^{*}Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, pr. Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

The Herpes simplex virus (HSV) causes a wide range of diseases, ranging from relatively mild primary skin lesions to severe and often fatal episodes of encephalitis. Currently, the most effective drugs for HSV-infected people are nucleoside analogs (e.g., acyclovir) targeting enzymes encoded by viral DNA. The effectiveness of nucleoside analogs is reduced because of poor solubility in water, rapid intracellular catabolism, high cellular toxicity, and the appearance of resistant viral strains. Antisense technology that exploits nucleic acid fragments (NA-based agents) is a promising alternative to antiviral therapy due to the high affinity of these agents to target nucleic acids, their high solubility in water, and lower cellular toxicity. In the last decade, antisense oligonucleotides have been investigated as potential drugs for various diseases associated with “harmful” nucleic acids. Oligonucleotides with different chemical modifications targeted at specific regions of the HSV genome have shown effectiveness in suppressing the virus. siRNA-based agents have demonstrated prolonged and effective (up to 99%) inhibition of HSV replication. Based on the publications reviewed in the review over the past 30 years, it can be concluded about the prospects of using NA-based agents to combat herpes viral infections.

Keywords: nucleoside analogs, antisense oligonucleotides, siRNA, HSV-1, HSV-2



ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ МОЛОКА ЧЕЛОВЕКА И МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© 2023 г. Ш. Ф. Каримова*, #, Г. О. Исмаилова*

*Ташкентский педиатрический медицинский институт, Узбекистан, 100140 Ташкент, ул. Богишамол, 223

Поступила в редакцию 03.09.2022 г.

После доработки 13.09.2022 г.

Принята к публикации 14.09.2022 г.

В обзоре описаны химический состав и свойства молока, значение молока для развития ребенка и формирования его отдельных органов и систем. Подробно рассмотрен химический состав молозива и зрелого молока; представлены подробные данные об отдельных компонентах молока: белках, жирах, углеводах, минеральных веществах, витаминах, ферментах; проведено сравнение химического состава молока человека и отдельных млекопитающих; дана характеристика таких биологически активных соединений, как гормоны и защитные факторы молока. В то время как женское молоко содержит большое количество различных компонентов (>400), соотношение которых меняется в зависимости от потребностей каждого конкретного ребенка, находящегося на грудном вскармливании, в состав молочных смесей самых передовых разработок входит всего 40–50 компонентов.

Ключевые слова: лактация, белки, углеводы, жиры, минеральные вещества, витамины, ферменты молока, защитные факторы, гормоны

DOI: 10.31857/S0132342323060076, EDN: EXNGWS

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	611
ЛАКТАЦИЯ	612
Гуморальная регуляция	612
Нейрональная регуляция	612
Факторы, влияющие на лактацию	612
СОСТАВ МОЛОКА	613
Белки	615
Жиры	617
Углеводы	618
Минеральные вещества	618
Витамины	618
Ферменты	619
Защитные факторы	620
Циклические нуклеотиды (сAMP и сGMP)	620
Гормоны	620
Биологически активные вещества	623
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	624
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	624

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время доказано, что идеальная пища для новорожденного – грудное молоко. С молоком матери он получает белки, жиры, углеводы, минеральные вещества, витамины, иммуноглобулины, ряд физиологически важных веществ, в том числе факторы роста, гормоны, ферменты и другие необходимые для своего роста и развития компоненты. Материнское молоко не могут заменить никакие самые современные искусственные молочные смеси. Несмотря на то, что в производстве этих смесей используются добавки, приближающие их по химическому составу к материнскому молоку, они не могут выполнять те тонкие регуляторные функции, которые выполняют компоненты женского молока [1–4].

Содержащиеся в материнском молоке гормоны, ферменты, факторы роста и другие компоненты обеспечивают правильное развитие и формирование детского организма. Антитела, иммунные комплексы предохраняют младенца от болезнетворных микроорганизмов. Кроме того, грудное вскармливание, осуществляемое достаточно длительное время, снижает риск развития аллергических заболеваний [5–8].

В настоящем обзоре обобщены и систематизированы данные литературы о лактации и содержании в молоке белков, жиров, углеводов, минеральных веществ, витаминов, ферментов, защитных факторов, гормонов; сопоставлен состав

Сокращения: АКТГ – адренотропный гормон; ГЛ – гонадолиберин; ГР – гормон роста; КС – кортикостероиды; ПГ – простагландин; ПЛЧ – плацентарный лактоген человека; ПР – прогестерон; ПРЛ – пролактин; ТТГ – тиреотропный гормон; сAMP – циклический АМФ; ЭП – эритропоэтин; ЭФР – эпидермальный фактор роста.

Автор для связи: (тел.: +9 (9897) 727-71-84; эл. почта: kshf53@mail.ru).

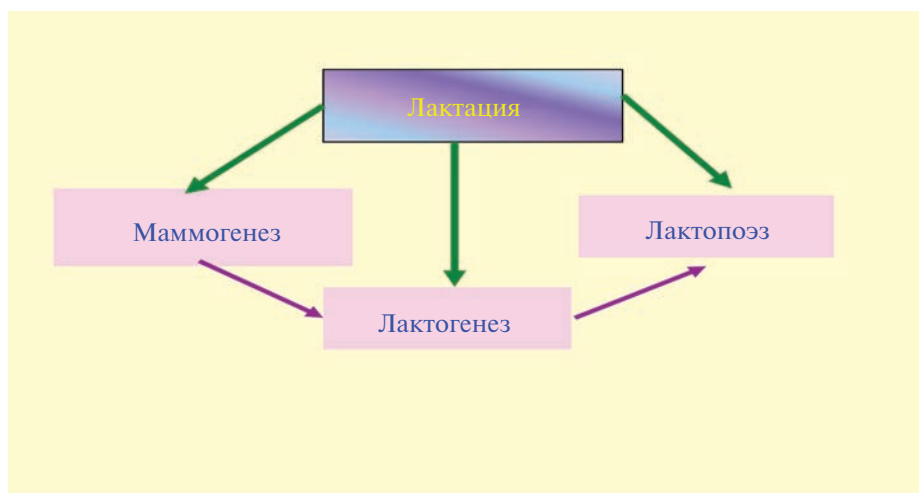


Рис. 1. Этапы лактационной функции.

женского и коровьего молока, являющегося основным субстратом для искусственных молочных смесей и прикорма; продемонстрирована уникальность состава женского молока, обеспечивающего всестороннее правильное развитие грудного ребенка.

ЛАКТАЦИЯ И ЕЕ РЕГУЛЯЦИЯ

Лактация (период вскармливания молоком) — сложный гормонально обусловленный физиологический процесс. Он протекает при участии всего материнского организма и обеспечивается совместным взаимодействием эндокринной системы матери (гипофиз, щитовидная железа, яичники, поджелудочная железа, надпочечники и др.) и ребенка. Формирование молочной железы начинается в период полового созревания и продолжается во время беременности и в течение всей жизни женщины [9, 10].

Суть лактации определяется четырьмя основными процессами (рис. 1): 1) маммогенез — развитие структуры молочной железы; 2) лактогенез — начало выработки молока после родов; 3) лактопоез — процесс поддержания лактации после того, как она уже началась; это стадия лактации, в которой происходят интенсивные секреторные реакции в молочных железах; 4) галактокинез — процесс выведения молока (молокоотдача), основная роль в котором принадлежит гормону окситоцину [9, 10].

Гуморальная регуляция

Синтез молока обеспечивается рядом гормонов. В этом процессе немаловажную роль играют прогестерон, пролактин, хорионический соматомаммотропин, тиролиберины, тироксин, инсулин и др. Пролактин необходим для нормального

развития молочных желез, синтеза молока и обеспечения лактации. Также он контролирует секрецию прогестерона и тормозит секрецию фолликулостимулирующего гормона, обеспечивая нормальный менструальный цикл [9, 10]. Выведению молока способствует окситоцин, стимулирующий сокращение миоэпителиальных клеток, окружающих ареолы и протоки молочной железы. Благодаря этому молоко, выработанное под воздействием гормона пролактина, выделяется из груди. На фоне лактации подавляется синтез гонадотропных гормонов, что связано с блокадой высвобождения гонадолиберина гипоталамуса. В это время происходит снижение уровня эстрогенов в крови, особенно прогестерона, а также наблюдаются изменения в выработке других гормонов [9, 10].

Нейрональная регуляция

Нейрональная регуляция лактации осуществляется за счет “сосательного” рефлекса (рис. 2), в основе которого лежит рефлекторная дуга: раздражение нервных окончаний соска → афферентный нейрон спинного ганглия → ассоциативно-эфферентные нейроны латерального и промежуточного ядер спинного мозга → эфферентные нейроны симпатических ганглиев → постганглионарные адренергические волокна → миоэпителиальные клетки концевых отделов молочных желез [10].

Факторы, влияющие на лактацию

На процесс лактации влияют многие факторы: здоровье женщины, ее питание во время беременности и в период кормления грудью, режимы дня, труда и отдыха. Пища матери в этот период должна содержать полноценные белки, углеводы, жиры, витамины и минеральные вещества. Осо-

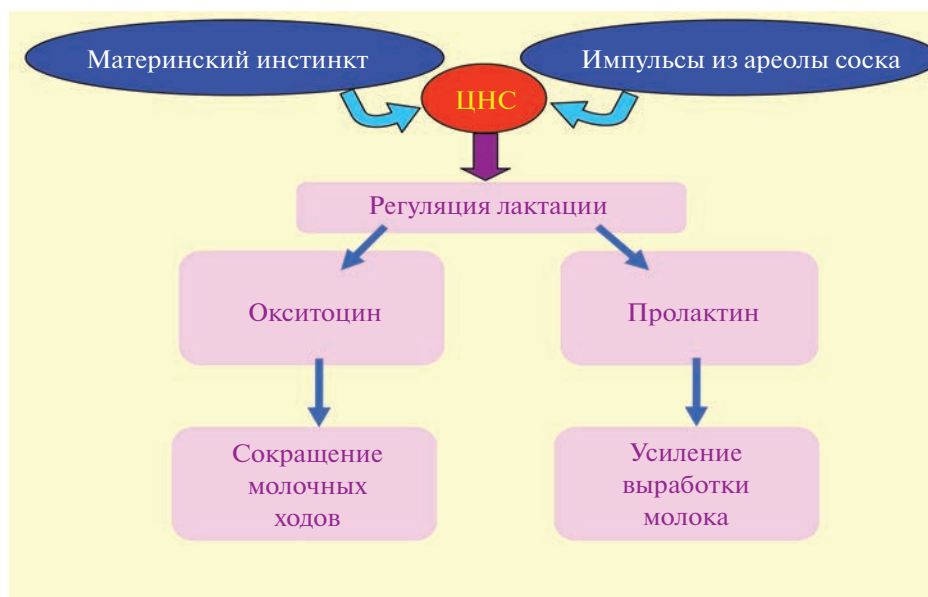


Рис. 2. Регуляция лактации.

бое значение имеет поступление достаточного количества белка, используемого для образования ферментов, гормонов, иммуноглобулинов и др. [1, 2].

ХИМИЧЕСКИЕ КОМПОНЕНТЫ МОЛОКА

Молоко — продукт молочных желез, предназначенный для питания новорожденного у любого животного из класса млекопитающих. У человека ребенок рождается крайне незрелым, его основные органы и иммунная система не полностью развиты. Для своего выживания младенец нуждается в грудном вскармливании. Вырабатываемое грудными железами молоко — это лучшая пища, обеспечивающая всестороннее правильное развитие новорожденного [11]. В нем есть все необходимые питательные вещества, в том числе ~7% (60–70 г/л) углеводов, ~1% (8–10 г/л) белка и ~4% (35–40 г/л) жира, витамины, соли и микроэлементы (~1%), вода (87%) в таких количествах и соотношениях, которые наиболее полно отвечают потребностям быстро растущего организма ребенка (табл. 1). Грудное молоко содержит не только необходимые для развития ребенка питательные вещества, но и широкий спектр микроорганизмов — бактерий, вирусов, простейших и грибов, образующих микробиом грудного молока. В молоке здоровых женщин доминируют молочнокислые бактерии *L. gasseri* и *L. fermentum*, обеспечивающие микробную колонизацию ЖКТ новорожденного, формирование иммунной системы и защиту от инфекционных заболеваний. Микробиом грудного молока формируется преимущественно из бактерий кишечника матери в результате их ак-

тивной миграции в молочные железы через лимфатическую систему и непосредственно влияет на состояние молочных желез при лактации [12].

В данном обзоре рассмотрен химический состав молока человека и сельскохозяйственных животных (корова, коза, кобыла, овца, буйволица) (табл. 1–6). В качестве продукта питания наиболее широко используется коровье молоко, следующее по частоте потребления — козье молоко. Также в некоторых регионах употребляют в пищу овечье, кобылье, лосиное, оленьё молоко. В северных регионах в качестве альтернативы коровьему молоку используют молоко самок северного оленя, его отличает очень высокая калорийность. Это и логично в условиях сурового климата — жирность оленьего молока составляет >17%, содержание белка ~11%.

Для дополнительного вскармливания детей (в случае нехватки или отсутствия материнского молока) лучше использовать козье молоко [13]. Оно легче усваивается, жиры козьего молока отличаются от жиров других видов животных наличием большого количества каприновой и линолевой кислот, молекулы жира в козьем молоке мельче, что способствует лучшему его усвоению организмом ребенка. Белки козьего молока расщепляются быстрее и усваиваются лучше белков коровьего молока, что крайне важно для младенцев. Их аминокислотный состав близок к аминокислотному составу белков женского молока. Содержание железа в козьем молоке в 1.5 раза больше, чем в коровьем. Биодоступность железа и кальция из козьего молока значительно выше по сравнению с коровьим молоком. Козье молоко богато витаминами А, содержит больше железа и

Таблица 1. Химический состав и энергетическая ценность женского молока и молока некоторых видов животных (в среднем на 100 мл) [60, 61]

Вид молока	Содержание, г				Энергетическая ценность, ккал
	белки	жиры	лактоза	минеральные вещества	
Женское	1.1	4.2	7.0	0.2	70
Коровье	2.8	3.2	4.8	0.7	58
Козье	3.0	4.2	4.5	0.8	68
Овчье	5.6	7.7	4.8	0.8	111
Кобылье	2.3	1.0	5.8	0.4	41
Верблюжье	4.0	5.1	4.9	0.7	82
Буйволиное	4.0	7.8	4.8	0.8	105
Ослиное	1.9	1.4	6.2	0.5	46
Олень	10.9	17.1	2.8	1.5	209

магния, чем коровье молоко. Козье молоко менее термоустойчиво (выдерживает 130°C в течение 19 мин), т.к. содержит больше ионизированного кальция. Продукция из козьего молока менее распространена из-за его относительной дороговизны, а также специфичного вкуса и запаха [13].

В табл. 4 сопоставлен состав женского и коровьего молока. Как можно увидеть из представленных данных, содержание белков, жиров, углеводов и минеральных элементов в женском молоке и молоке отдельных млекопитающих отличается (эти различия будут подробно рассмотрены далее в соответствующих подразделах).

В сыром молоке женщин и других млекопитающих имеются ферменты, которые при попадании с молоком в пищеварительный тракт дополняют действие ферментов пищеварительных соков ребенка [14].

В молоко поступают и гормоны, которые принимают участие в обменных процессах, а также иммуноглобулины, которые покрывают незрелую поверхность кишечника новорожденных и тем самым образуют защитный слой, предохраняющий от инфицирования вирусами, бактериями и другими патогенными микроорганизмами, а также паразитами [4–7]. В то время как женское молоко содержит >400 различных компонентов, соотношение которых меняется в зависимости от потребностей каждого конкретного ребенка, в смесях самых передовых разработок всего 40–50 таких компонентов. Несмотря на существенные достижения в разработке и промышленном производстве современных молочных продуктов для детского питания, все еще существует разница в темпах физического развития, в частности ежемесячных ростовых прибавок, между детьми первого года жизни, находящимися на грудном и искусственном вскармливании [6–8].

Молоко матери — особая жидкость, выполняющая не только питательную функцию, но и защищающая ребенка от инфекций [15, 16]. Исследователями установлено, что дети, вскормленные грудью, к 7.5–8 годам значительно опережают по своему развитию детей, получавших молочные смеси [1, 8]. И чем дольше по времени ребенок находится на грудном вскармливании, тем выше показатели его интеллектуального развития. Кроме того, такие дети в 2 раза реже страдают нервными расстройствами, обладают более устойчивой психикой, лучше учатся в школе [1, 4].

В первые 2–3 дня лактации выделяется молозиво — секрет молочных желез, образующийся в последние дни беременности и в первые 3–5 дней после родов, далее оно сменяется переходным, а затем и зрелым молоком. Новорожденные дети не могут перерабатывать большое количество жидкости, поэтому молозиво выделяется в небольших количествах. Молозиво представляет собой желтоватую и более густую жидкость, чем зрелое молоко, и имеет специфический запах [17]. Молозиво отличается по физико-химическим свойствам от молока, по своему составу молозиво ближе к крови, чем к молоку, являясь важной промежуточной формой при переходе от парентерального питания плода к питанию женским молоком. Молозиво более калорийное, чем зрелое молоко, и содержит меньше углеводов, больше белков, жирорастворимых витаминов и минеральных веществ (табл. 5), таких как хлор, хром, цинк, фосфор, магний, калий, кальций, железо. Около половины белков молозива составляют глобулины. Молозиво содержит больше белых кровяных телец, иммуноглобулинов, лизоцима, лактоферрина, олигосахаридов и других защитных факторов, чем зрелое грудное молоко. Оно дает ребенку первую иммунную защиту от большинства вирусов и бактерий, с которыми ему придется столк-

нуться сразу после рождения и в дальнейшей внеутробной жизни [15, 16]. Иммуноглобулины не расщепляются пищеварительной системой младенца, поэтому они способны выполнять свои функции. Молозиво содержит также факторы роста белковой природы. Присутствующие в молозиве соли магния обладают послабляющим действием, активируют перистальтику, освобождают кишечник от первородного кала (мекония). К концу лактации молоко напоминает молозиво своим высоким уровнем иммуноглобулинов, они защищают отлучаемого от груди ребенка от инфекционных заболеваний. После 4–5 дней лактации у матери вырабатывается переходное молоко — по сравнению с молозивом, в нем меньше белка и минеральных веществ, а количество жира повышается (табл. 5). Одновременно увеличивается и объем вырабатываемого молока, что отвечает увеличивающимся потребностям растущего ребенка.

Через 2–4 недели выделяется зрелое молоко, которое имеет белый цвет и отличается большим содержанием жиров. После четырех недель содержание питательных веществ и соотношение ингредиентов в зрелом молоке в целом остается довольно стабильным. Однако состав зрелого молока в разные периоды лактации и в разные кормления продолжает варьировать [17, 18].

Таким образом, кормящую мать и вскармливаемого молока ребенка можно рассматривать как взаимодополняющую пару, сообщающуюся иммунными факторами и системой сбалансированных питательных ингредиентов, которые направлены на удовлетворение всех потребностей грудного ребенка.

Белки

Общее количество белков в женском молоке составляет ~1%, что в 2–3 раза ниже, чем в коровьем молоке. Содержание казеина в начале лактации низкое (соотношение сывороточные белки/казеин 90 : 10), а в зрелом молоке становится выше (соотношение сывороточные белки/казеин 60 : 40). Казеин ответственен за связывание двух минеральных веществ — ионов кальция и фосфора. Казеин обеспечивает их поступление в организм новорожденных, где они могут использоваться для нормального роста и развития костной системы, синтеза гормонов, укрепления ногтей и волос, улучшения свертываемости крови, стимуляции нервной системы [14, 19, 20].

Кроме того, женское молоко содержит α -лактальбумины, лактоферрин, лизоцим, сывороточный альбумин (табл. 4) [1, 2, 7, 14, 18–20]. α -Лактальбумины активируют синтетазу лактозы, которая соединяет молекулы галактозы и глюкозы, образуя при этом дисахарид лактозу. α -Лакталь-

Таблица 2. Содержание минеральных веществ в молоке некоторых видов животных (на 100 г продукта) [62]

Показатели	Содержание в молоке (сыром)				
	коровье	козье	овечьё	кобылье	буйволиное
Зола, %	0.7	0.8	0.8	0.4	0.8
Макроэлементы, мг					
Калий	146	145	198	64	130
Кальций	122	143	178	89	174
Магний	14	14	11	9	23
Натрий	50	47	26	—	47
Нитраты	0.04	—	—	—	—
Сера	29	—	—	—	—
Фосфор	92	89	156	54	109
Хлор	110	35	76	—	68
Микроэлементы, мкг					
Железо	67	100	92	61	54
Иод	16	11	16	—	—
Кобальт	0.8	—	5.0	1.4	0.9
Марганец	6	17.2	11	2.9	17
Медь	12	20	13	22	20
Молибден	5	—	8	—	2
Олово	4	—	—	—	—
Селен	2	—	—	—	—
Фтор	29	—	—	—	19
Хром	2	—	—	—	—
Цинк	457	—	500	—	575

Примечание. Зола — несгорающий остаток, образующийся из минеральных примесей при полном сгорании.

бумин прочно связывает ионы цинка и кальция, что обуславливает бактерицидную и противоопухолевую функцию данного белка [21]. Также было показано, что при расщеплении α -лактальбумина образуются мелкие пептиды с различными функциями, включая ингибирование роста патогенов, стимулирование роста бифидобактерий, модулирование иммунной системы и стимулирование абсорбции минералов. α -Лактальбумины и β -глобулины синтезируются в молочных железах, а лактоферрин и иммуноглобулины проникают из крови. В женском молоке содержится большое количество иммуноглобулинов (они будут описаны ниже, в подразделе о защитных факторах).

В коровьем молоке больше белка казеина (76–86% от общего белка). В женском молоке он находится в форме β -казеина, а в коровьем — в форме α -казеина. В коровьем молоке содержится ~40 белков, которые могут выступать аллергенами для человека. С учетом физико-химических свойств их разделяют на казеины (80% белков молока) и сывороточные белки (20%). Сыворотка содержит

Таблица 3. Содержание витаминов в молоке некоторых видов животных (на 100 г продукта) [62]

Витамин	Содержание в молоке				
	коровье	козье	овечье	кобылье	буйволиное
Витамин А, мг	0.025	0.06	0.05	0.02	0.06
Каротин, мг	0.015	0.04	0.01	0.03	—
Витамин D, мкг	0.05	0.06	—	—	—
Витамин E, мг	0.09	0.09	0.18	—	0.20
Витамин C, мг	1.50	2.00	5.00	0.40	2.50
Витамин B6, мг	0.05	0.05	—	0.03	0.02
Витамин B12, мкг	0.40	0.10	0.50	0.35	0.32
Биотин, мкг	3.20	3.10	8.10	1.00	—
Пантотеновая кислота (витамин B5), мг	0.38	0.30	0.41	0.25	0.34
Рибофлавин (витамин B2), мг	0.15	0.14	0.35	0.04	0.13
Тиамин (витамин B1), мг	0.04	0.04	0.06	0.03	0.06
Холин, мг	23.60	14.20	30.00	—	—

Таблица 4. Сопоставление состава женского и коровьего молока (в расчете на 100 мл) [62]

Компонент	Содержание в молоке	
	женское	коровье
Белки, г,	0.9–1.0	2.8–3.2
в том числе:		
казеин, мг	260	2600
сывоточные белки, мг	700	670
α -лактальбумин, мг	26	120
лактоферрин, мг	170	0
лизозим, мг	50	0
иммуноглобулины, мг	105 (95% IgA)	66 (90% IgG)
β -лактоглобулин, мг	0	30
Жир, г	3.9–4.5	3.0–3.5
ПНЖК/НЖК	0.4	0.04
Соотношение ω -6/3	8 : 1	0.9 : 1
Углеводы, г	6.8–7.2 (β -лактоза)	4.5 (α -лактоза)
Натрий, мг	18	77
Калий, мг	45.5	143
Кальций, мг	25.5	120

преимущественно глобулярные белки, β -лактоглобулин и α -лактальбумин, лактоферрин и иммуноглобулины. β -Лактоглобулина в женском молоке нет [14]. Аллергенность белка β -лактоглобулина коровьего молока недостаточно изучена. При кормлении детей коровьим молоком у них могут образовываться IgE-антитела к β -лактоглобулинам и частично к α -лактальбуминам, что может быть возможной причиной аллергии к белкам коровьего молока [13].

Содержание аминокислоты цистеина, а также таурина в женском молоке выше, чем в коровьем молоке. Таурин необходим для соединения солей желчи в процессе пищеварения. В центральной нервной системе он участвует в регуляции проведения нервного импульса или его торможении. Таурин гиперполяризует нейроны и подавляет их возбуждение, он также необходим для развития сетчатки глаза и особенно для нормального развития недоношенных детей.

Таблица 5. Основной состав молозива (в разные дни лактации), переходного и зрелого женского молока (в расчете на 100 мл)

Показатель	Содержание в молоке			
	молозиво		переходное молоко	зрелое молоко
	2–3-й дни	4–5-й дни	6–7-й дни	
Белки, г	5–6	2.0–2.5	1.5–2.1	1.0–1.5
Жиры, г	2	4	3.5–4.0	4.0–4.5
Углеводы, г	4.5	—	—	6.5–7.5
Минеральные соли, г	0.4–0.5	—	—	0.2–0.3
Витамин А, мг	0.16	—	0.09	0.06
Витамин Е, мг	1.5	—	0.9	0.2
Калорийность, ккал	80–150	70–75	60.5–67.5	65–70

Белки молока, у которых состав и соотношение незаменимых аминокислот сходны с таковыми у новорожденного, очень хорошо усваиваются. Наиболее благоприятное качество и количество белка в женском молоке влияет на заселение кишечника “правильной” микрофлорой, способствует оптимальному всасыванию минеральных веществ (особенно железа, кальция, цинка), а также формирует здоровье ребенка ко взрослому периоду, снижая вероятность развития ожирения, диабета, гипертонии в их дальнейшей жизни.

Жиры

Количество жиров в молозиве составляет 2%, а в зрелом молоке — до 4.0–4.5% (табл. 5). Известно, что на протяжении кормления состав грудного молока меняется. “Переднее” молоко ребенок высасывает в начале кормления. Это водянистое молоко, богатое протеином, лактозой, витаминами, минералами и водой. “Заднее” молоко ребенок получает в конце кормления. Оно более белое, т.к. содержит больше жиров. Жиры повышают калорийность “заднего” молока и составляют более половины его состава. Для роста и развития ребенка требуется как “переднее”, так и “заднее” молоко [2, 14, 22]. Основные жиры женского молока — триглицериды, 1,2-диацилглицерины, моноацилглицерины, гликолипиды, фосфолипиды, жирные кислоты, стеролы. Жирнокислотный состав характеризуется относительно высоким содержанием незаменимых полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), концентрация которых в женском молоке в 12–15 раз выше, чем в коровьем. ПНЖК — это предшественники арахидоновой, эйкозапентаеновой и докозагексаеновой жирных кислот, являющихся важными компонентами клеточных мембран. Из них образуются различные классы простагландинов, лейкотриенов и тромбоксанов. Они необходимы также для мие-

линизации нервных волокон и формирования сетчатки глаз.

Жиры женского молока перевариваются легче, чем жиры коровьего молока, т.к. они в большей степени эмульгированы. Кроме того, в грудном молоке содержится фермент липаза, которая участвует в переваривании жирового компонента молока, начиная с ротовой полости. Активность липазы в женском молоке в 20–25 раз выше активности липаз, содержащихся в свежем коровьем молоке [2, 11, 14, 22]. Высокая усвояемость жиров обеспечивается также более высоким рН в желудке новорожденных детей (4.5–5.0). Коэффициент усвоения жиров женского молока на 1-й неделе жизни составляет 90%, а коровьего — лишь 60%. Под влиянием липаз, содержащихся в женском молоке, ~25% жиров гидролизуются уже в желудке младенца, до поступления их в тонкий кишечник. Цепи жирных кислот содержат 4–22 углеродных атомов, что важно для нормального

Таблица 6. Содержание витаминов в зрелом женском молоке (в расчете на 100 мл) [26, 27]

Витамин	Содержание
Тиамин (витамин В1), мкг	15.4–33.8
Рибофлавин (витамин В2), мкг	48.5–71.0
Ниацин (витамин РР), мкг	220–670
Пантотеновая кислота (витамин В5), мг	0.18–0.23
Пиридоксин (витамин В6), мкг	2–6
Аскорбиновая кислота (витамин С), мг	2–6
Кобаламины (витамин В12), мкг	0.023–0.110
Фолиевая кислота (витамин В9), мкг	4.1–6.8
Ретинол (витамин А), мкг	55
25(ОН) витамин D, IU	5
Токоферол (витамин Е), мг	0.43
Витамин К, мкг	0.1–0.5

состояния желудочно-кишечного тракта (низшие жирные кислоты могут оказывать раздражающее воздействие на кишечник). Холестерин составляет основную часть стеролов в молозиве и молоке. Он необходим для нормального развития организма, особенно головного мозга. Его в 6 раз больше в грудном молоке, чем в молочных смесях. Вместе с жирами ребенок получает жирорастворимые витамины А, D, Е и К.

Углеводы

Основная функция углеводов пищи — обеспечение организма энергией. Потребность в них у новорожденных определяется возрастом и энергетическими тратами организма. Углеводы в женском молоке содержатся в количестве ~7%, основной их представитель — β -лактоза, которая, расщепляясь, пополняет 40% энергетических нужд ребенка. В коровьем молоке содержится ~4.5% α -лактозы. Кроме того, лактоза женского молока вместе с поли- и олигоаминосахарами (β -галактозидфруктоза), количество которых в женском молоке в 40 раз выше, чем в молоке коров, влияет на пищеварительные процессы и формирует характерную для ребенка микрофлору кишечника (в основном бифидофлору). Продукты расщепления лактозы используются для синтеза галактолипидов, ганглиозидов, цереброзидов, необходимых для правильного развития нервной системы новорожденного, построения ферментов в его организме, они также улучшают всасывание кальция, магния, марганца. Часть лактозы доходит до толстой кишки, где она вместе с β -галактозидфруктозой молока обеспечивает необходимую среду для размножения полезной бифидо- и лактофлоры, а также оказывает влияние на формирование мягкого регулярного стула. Бифидобактерии, в свою очередь, подавляют рост кишечной палочки и других патогенных возбудителей и создают более низкую кислотную среду в кишечнике ($\sim$ pH 5.1–5.4 против pH 5.9–7.3 у детей, вскармливаемых исключительно молочными смесями) в течение первых шести недель. Бифидобактерии участвуют в синтезе отдельных витаминов группы В и веществ, сходных с антибиотиками. Микрофлора кишечника у детей на питании искусственными смесями характеризуется большим разнообразием. В ней преобладает кишечная палочка и заметно меньше молочнокислых бактерий [2, 3, 14, 23, 24].

Другая важная функция поли- и олигоаминосахаридов женского молока — способность влиять на формирование соответствующей иммунной реакции к поступлению чужеродных белков в организм новорожденного и возможность избежать формирования пищевой непереносимости к ним [25].

В женском молоке наряду с белками, жирами и углеводами содержатся витамины, минеральные вещества, ферменты и другие компоненты. Рассмотрим их более подробно.

Витамины

Количество витаминов в женском молоке широко варьирует в зависимости от здоровья матери, питания и времени года. В молоке присутствуют практически все витамины, имеющиеся в организме женщины в период лактации [26, 27]. Концентрация витаминов в молоке млекопитающих колеблется в довольно широких пределах (табл. 3, 5, 6). Оценка витаминного состава грудного молока затруднена тем, что для определения количества витаминов используют разные методы определения и единицы измерения их концентрации (мкмоль/л, мкг/л, мкг/мл), поэтому статистические данные представляют в виде средних значений. Содержание витаминов А, В1, В2, В6 и D варьирует в материнском молоке в зависимости от их содержания в рационе женщины и ее обеспеченности этими микронутриентами, а также срока лактации и времени года. Так, если осенью обеспеченность витамином С, каротиноидами улучшается благодаря высокому потреблению свежих овощей и фруктов, то дефицит в рационе витаминов группы В (источник которых — продукты животного происхождения) сохраняется. Крайне низкое содержание витамина К в материнском молоке не зависит от его содержания в рационе матери, поэтому в некоторых случаях, чтобы избежать геморрагических заболеваний у новорожденных, рекомендуются инъекции этого витамина новорожденным [26, 27]. Оценка обеспеченности витамином D кормящих матерей и их детей в зависимости от дозы принимаемого витамина показала, что прием кормящими матерями витамина D необходим для обеспечения достаточного для младенца количества этого витамина в грудном молоке. Профилактика рахита должна проводиться путем назначения витамина D детям, находящимся на грудном вскармливании, либо кормящим матерям. Оптимизация витаминного статуса кормящей матери и, следовательно, качества выделяемого молока, — это естественный и безопасный способ улучшения обеспеченности витаминами грудных детей.

Минеральные вещества

Поступление минеральных элементов в молоко связано с периодом лактации, сезоном года и питанием [2, 28, 29]. Они участвуют как в образовании костной ткани, так и в регуляции важнейших обменных процессов в организме. Сравнительный анализ собранных материалов показал достаточно широкий количественный диапазон

содержания минеральных элементов в молоке. Так, содержание цинка может колебаться в диапазоне 3.09–6.48 мг/кг, меди – в диапазоне 0.83–1.73 мг/кг [28]. Кроме того, показано, что содержание цинка, меди и калия в молоке снижается в течение первых 6 месяцев, а лактозы, жира, кальция и магния остается таким же, как и на более ранних стадиях лактации [28].

Минеральные элементы подразделяют на макро- и микроэлементы. Содержание отдельных минеральных элементов в женском молоке и молоке некоторых видов животных представлено в табл. 2 и 4.

Макроэлементы. Основные макроэлементы молока – натрий, калий, кальций, магний, фосфор и хлор. Кальций и фосфор участвуют в формировании костной ткани. Процессы их всасывания из кишечника и участие в процессе минерализации костной ткани идут одновременно. Кроме того, кальций участвует в передаче нервных импульсов, сокращении мускулатуры, в реакциях свертывания крови и др. Коровье молоко богато калием и кальцием: на 100 мл продукта приходится по 146 и 122 мг этих элементов соответственно. Около 22% всего кальция прочно связано с казеином, остальные 78% составляют фосфаты и цитраты. Хлора содержится 110 мг, фосфора – 92 мг; содержание хлоридов в молоке коров колеблется в диапазоне 80–110 мг, содержание натрия составляет 50 мг, серы – 29 мг, магния – 14 мг в 100 г молока [2, 27, 28].

Содержание кальция в женском молоке варьирует в диапазоне 25–35 мг на 100 мл, фосфора – в диапазоне 13–16 мг (его содержание гораздо более постоянно). Соотношение кальция к фосфору составляет 2 : 1. При грудном вскармливании дети в первые месяцы жизни получают в среднем в сутки 0.135 г натрия и 0.45 г калия.

Содержание большинства минеральных веществ в женском молоке по сравнению с этим же показателем у животных меньше зависит от поступления с пищей, т.к. их дефицит приводит к снижению выведения этих элементов с мочой. Коэффициент усвоения кальция женского молока составляет >60%, а коровьего молока – лишь 20%, таким образом, более высокая доступность кальция женского молока будет способствовать стимуляции процессов минерализации костной ткани у новорожденных. Более того, нужно учесть влияние витамина D, активность которого в женском молоке выше, чем в коровьем. Особую ценность имеет железо, которое занимает промежуточное место между макро- и микроэлементами. Его количество в женском молоке составляет 0.2–0.8 мг/л, в коровьем молоке – в 2–3 раза меньше. Как правило, железодефицитной анемии у детей в ранний период грудного вскармливания не наблюдается. Это связано с тем, что вса-

сывание железа в женском молоке достигает 70%. В коровьем же молоке этот показатель составляет 30%, а в заменителях грудного молока – лишь 10% [29].

Микроэлементы. В молоке содержатся микроэлементы: медь, цинк, кобальт, марганец, иод, фтор, селен, свинец и некоторые другие.

В молоке коров (в расчете на 100 мл) наблюдается высокое содержание цинка (457 мкг). Других микроэлементов содержится меньше: алюминия – 50 мкг, фтора – 29 мкг, стронция – 17 мкг, олова – 4 мкг, меди – 12 мкг, марганца (6 мкг). Еще ниже содержание иода – 16 мкг, молибдена – 5 мкг, селена и хрома – по 2 мкг, кобальта – в пределах 1 мкг. Содержание цинка в женском молоке ниже, чем в коровьем, но его все же достаточно для удовлетворения потребности грудного ребенка. Содержание кобальта и меди в женском молоке составляет 0.04–0.08 мкг/% и 0.05 мг/% соответственно. Кобальт входит в состав витамина B12 (кобаламина), который у коров, в отличие от людей, синтезируют микроорганизмы рубца [28, 30]. Недостаток кобальта и, как следствие витамина B12, особенно остро ощутим в период активной клеточной пролиферации, в частности в системе кроветворения [30]. Молодой организм наиболее чувствителен к недостатку кобальта, поскольку резерв витамина B12 в его печени еще мал. Дефицит меди приводит к снижению биологической доступности железа, депонированного в печени [30]. Со временем это становится причиной изменения гематологических показателей, что проявляется в форме гипохромной микроцитарной анемии. Цинк входит в состав многих металлосодержащих ферментов, участвующих в обмене углеводов, белков, липидов и нуклеиновых кислот. Селен действует как мощный иммуностимулятор. В молоке селен препятствует накоплению продуктов перекисного окисления липидов.

В настоящее время стали популярны растительные аналоги молока (соевое, рисовое, овсяное, миндальное, кокосовое), однако следует отметить, что они проигрывают молоку животных по содержанию как макро- и микроэлементов, так и других веществ, а их употребление рассматривается скорее как вынужденная мера при различных видах аллергии [29].

Ферменты

В связи с низкой секрецией ферментов пищеварительных желез для грудных детей особое значение имеют ферменты женского молока, которые улучшают переваривание и усвоение основных пищевых веществ. Часть из них синтезируется в клетках молочной железы, а другие продуцируются микроорганизмами молока [14, 21, 28].

Из ферментов в молоке присутствуют липаза, лактаза, фосфатаза, редуктаза, пероксидаза, каталаза, трипсин, лизоцим, γ -глутамилтрансфераза, рибонуклеаза и др. [14, 24, 28]. В период грудного вскармливания ребенка в его пищеварительном тракте кооперируются два типа пищеварения: собственное (гидролазами ребенка) и аутолитическое (гидролазами, полученными ребенком с материнским молоком).

Защитные факторы

Немаловажное значение имеет состояние защитной системы молока, с помощью которой ребенок после родов адаптируется к “миру микробов” [21, 31].

Помимо формируемой собственной активной защиты и наряду с пассивно переданными через плаценту антителами, новорожденный получает дополнительно, через материнское молоко, еще и другие защитные факторы, участвующие в антиинфекционной устойчивости ЖКТ новорожденных. Защитные функции женского молока определяются содержащимися в нем клеточными и гуморальными факторами.

К клеточным факторам относятся макрофаги, лизоцим ($\sim 0.4\text{--}0.5$ г/л), лактоферрин, лимфоциты ($0.5\text{--}10$ млн клеток в 1 мл молозива), нейтрофилы, гранулоциты, эпителиальные клетки, бифидум-фактор и др. По мере перехода молозива в зрелое молоко их концентрация снижается. Лизоцим — мощный фактор неспецифической защиты [32, 33], в молоке он находится в более устойчивой форме, чем в крови. Лактоферрин — белок, связанный с железом, его содержание составляет $2\text{--}6$ г/л. Он играет особую роль в обеспечении антимикробной активности женского молока [14, 31]. Кроме того, обнаружены интерфероны, обладающие противовирусной активностью. В зрелом молоке содержится также антистафилококковый фактор, обеспечивающий защиту от вирулентных штаммов стафилококка.

В женском молоке присутствуют все компоненты системы комплемента, участвующие в реализации гуморальной защиты организма от действия чужеродных агентов. Система комплемента — это каскад из 20 протеолитических ферментов плазмы крови, обеспечивающих иммунную реакцию в ответ на взаимодействие антигена с антителом. Эта система отвечает за фагоцитоз, разрушение чужеродных бактерий [32, 33].

Специфический гуморальный иммунный ответ осуществляется также благодаря образованию антител плазматическими клетками в ответ на антигенную стимуляцию В-лимфоцитов. Антитела представляют собой иммуноглобулины, относящиеся к γ -фракции сывороточных белков. Молоко содержит иммуноглобулины всех пяти типов

(IgG, IgM, IgD, IgE, IgA) [21]. Антитела молока обеспечивают, таким образом, специфическую защиту от сапрофитических и энтеропатогенных эшерихий, шигелл, энтеровирусов, кокковой флоры и других микроорганизмов, в том числе вызывающих такие заболевания, как полиомиелит, пневмонию, дизентерию, кандидозы и др. В наиболее высокой концентрации IgA содержится в молозиве (3 г/%), в зрелом молоке концентрация IgA снижается до 1 г/%, но даже к концу лактации удается обнаружить этот белок в молоке [21]. Таким образом, новорожденный, вскармливаемый молоком матери, в первые часы жизни получает большое количество материнского IgA, который в молоке обладает устойчивостью к изменениям pH и действию протеаз пищеварительного тракта и тем самым обеспечивает основательную иммунологическую защиту поверхности слизистой оболочки. Поэтому вскармливаемые грудью дети значительно реже болеют кишечными инфекциями, даже в неблагоприятных санитарно-гигиенических условиях, по сравнению с детьми на искусственном вскармливании. В основе защитного действия IgA лежит его антимикробное свойство, благодаря которому бактерии не абсорбируются в кишечнике, тем самым их патогенность не проявляется. Отсутствие IgA в молоке критично для новорожденного, поскольку выработка собственных иммуноглобулинов у него практически отсутствует.

Циклические нуклеотиды (сАМР и сГМР)

В молоке также обнаружены циклические нуклеотиды (сАМР и сГМР) [2, 14]. Содержание сАМР изучали в молоке женщин и крыс, а также в желудочном содержимом крысят. Средние концентрации сАМР и сГМР в экстрактах цельного молока женщин составляли 83.3 и 15.1 нмоль/мл соответственно; концентрация сАМР в молоке крыс — 128 нмоль/мл, а в желудочном содержимом крысят — 84.0 нмоль/мл; уровень сАМР в плазме крови крыс и крысят — 23 и 27 нмоль/мл соответственно.

Роль циклических нуклеотидов у новорожденных пока не выяснена.

Гормоны

В настоящее время доказано присутствие в молоке целого ряда гормонов [34, 35]. Из гормонов гипоталамуса в молоке выявлены тиреолиберин, гонадолиберин, соматостатин. Их концентрация в молоке равна или больше таковой в сыворотке крови. Наличие этих гормонов, поступивших в организм новорожденного, по-видимому, предохраняет от повышенной нагрузки его незрелую гипоталамо-гипофизарную систему [36].

Из гипофизарных гормонов в молоке различных видов млекопитающих обнаружены гормон роста, адренокортикотропный гормон, пролактин, гонадотропины, тиреотропный гормон и окситоцин [34, 35, 37]. Также выявлены половые и тиреоидные гормоны, инсулин, кальцитонин и др. [35, 38–40].

В молоке обнаружены простагландины, цитокины, эритропоэтин, эпидермальный фактор роста [34, 35, 41, 42].

В настоящее время остается открытым вопрос о роли поступивших с молоком гормонов и биологически активных веществ в развитии потомства. Концентрация гормонов в молоке различается в зависимости от вида млекопитающего, времени суток, периода лактации, частоты кормлений и других факторов. У животных имеет значение и величина помета.

Гонадолиберин (GnRH). В молоке женщин, коров и крыс GnRH определяется в концентрации 0.1–3.0 нг/мл, что заметно превышает его количество в сыворотки крови [36]. Этот факт свидетельствует об определенной физиологической роли в высвобождении гонадотропинов у новорожденных, находящихся на грудном вскармливании. Высокая концентрация GnRH в молоке подразумевает особый механизм его накопления, а также ставит вопрос о возможной экстрагипоталамической природе этого пептида. В продуктах детского прикорма этот гормон отсутствует.

Тиролиберин (TrRH). В женском молоке TrRH содержится в диапазоне 0.25–1.5 нг/мл. Скорость расщепления TrRH в молоке в 5 раз ниже, чем в крови. У новорожденного ребенка TrRH стимулирует синтез тиреотропина и тиреоидных гормонов [34, 35].

Тиреотропный гормон (TSG). Установлено, что TSG присутствует в молоке женщин и крыс, среднее содержание TSG в женском молоке составляет 156 нг/мл. Уровень TSG в молоке зависит от изменений тиреоидной функции женщины в период лактации. Концентрация TSG в крови крыс составляет 219 нг/мл, в молоке крыс – 156 нг/мл [34, 35].

Адренокортикотропный гормон (АСТН). АСТН, имеющийся в молоке крыс в период лактации, поступает из кишечника сосунка в кровь в биологически активной форме и влияет на функцию надпочечников [34, 35].

Гормон роста (GH). Выявлено наличие GH в молоке женщин и крыс. В конце беременности его концентрация в секрете молочной железы женщин составляет 21.7 мкЕД/мл, а в молозиве 4 мкЕД/мл [34, 35].

Пролактин (PRL). Изучению содержания PRL в молоке различных млекопитающих (женщин, крыс, коз, коров и овец) и влияющих на него факторов посвящено множество исследований [34].

Концентрация PRL в молоке разных видов млекопитающих колеблется в диапазоне 5–200 нг/мл. Показано, что у животных она зависит от времени лактации и численности помета. Содержание PRL в молоке крыс увеличивается ко 2–3-му дню лактации до 230 нг/мл, к 6-му дню оно заметно снижается до 140 нг/мл и сохраняется на этом уровне до окончания лактации. Концентрация PRL в молоке женщин составляет в среднем 30 нг/мл. Выявлена отрицательная корреляционная связь между концентрацией PRL в грудном молоке и антропометрическими показателями потомства, а также наступлением периода полового созревания [34]. Была выдвинута гипотеза о том, что PRL материнского молока – это физиологический сдерживающий фактор для несвоевременно раннего повышения массы тела и преждевременного полового созревания потомства [34].

Кортикостероиды (KS). KS выявлены в молоке женщин, коров и крыс [43]. В молоке женщин глюкокортикоиды присутствуют в относительно низкой концентрации, так что их общее количество, поступающее с молоком ребенку, можно считать физиологически незначительным. Синтетические глюкокортикоиды, введенные в умеренных дозах кормящим матерям с терапевтической целью, также оказываются в малом количестве в молоке. Известно, что содержание KS в крови животных одного вида значительно варьирует в зависимости от возраста индивидуума, условий существования, времени года и, кроме того, подчиняется определенному суточному ритму.

Кортизол. Кортизол часто называют гормоном стресса. В молозиве концентрация кортизола достигает высоких уровней, но быстро снижается, и по мере продолжения грудного вскармливания кортизол содержится в молоке в более низких концентрациях [43]. Уровни кортизола в молоке могут влиять на количество секреторного иммуноглобулина А (sIgA). Таким образом, высокие уровни стресса и кортизола могут нарушать защитно-иммунные свойства молока. Научное сообщество не обладает точными сведениями о роли кортизола в молоке, но есть предположения, что у младенцев он может участвовать в контроле движения жидкостей и солей в пищеварительном тракте, в росте поджелудочной железы ребенка, а также помогать ребенку справляться с хроническим стрессом.

Альдостерон. Альдостерон содержится в женском молозиве в концентрации 548.8 пг/мл, по мере созревания молока его концентрация снижается в 2 раза. По мнению исследователей, альдостерон может оказывать влияние на всасывание натрия в ЖКТ младенцев [34].

Половые гормоны. Из стероидных гормонов в молоке различных млекопитающих выявлены

прогестерон, прегнандиол, 17-кетостероиды, эстрогены.

Первоначально эти гормоны в молоке изучали для нужд ветеринарии [34, 35]. Так, для раннего наступления беременности у коров рекомендуется поддерживать высоких концентраций прогестерона в молоке в течение 19 дней или более после отела. Показано, что у них концентрация прогестерона в молоке в 2–4 раза выше, чем в плазме крови [34, 35].

У женщин уровень прогестерона в секрете молочной железы в конце беременности составляет 148 нг/мл, а сразу после родов (24 ч) снижается до 25 нг/мл.

Эстрогены. В настоящее время известно, что содержание эстрогенов зависит от времени года и жирности молока. Большая часть эстрогенов молока находится в конъюгированной форме. Содержание эстрогенов в молоке женщин в течение первых нескольких недель лактации намного превышает таковое в коровьем молоке [34, 35].

Прегнандиол. Вероятно, этот стероид не присутствует в каком-либо ощутимом количестве в молоке коров, однако имеется в молоке женщин. Неонатальную желтуху новорожденных связывают с наличием этого стероида в женском молоке. Этот тип неонатальной желтухи легко обратим и пропадает сразу, как только новорожденного переводят на питание прикормом из коровьего молока [34, 35].

Андрогены. Андрогены изучены в молоке женщин и коров [34, 35], соотношение свободного и конъюгированного тестостерона в молоке, как и в плазме, составило 1 : 1.

Тиреоидные гормоны. Тиреоидные гормоны играют ведущую роль в обмене веществ. Данные об уровне Т3 и Т4 в женском, крысином и коровьем молоке широко варьируют [34, 35, 38–40]. Концентрация Т4 и Т3 в молоке женщин и прикормов составила 1.3 мкг% и 301 нг%, а в сыворотке крови – 3 мкг% и 204 нг% соответственно. Кроме того, при исследовании женского молока было выявлено, что уровень этих гормонов значительно возрастает с увеличением срока лактации, по мере перехода от молозива к зрелому молоку. Наряду с исследованиями молока человека и крысы был проведен анализ коровьего молока и продуктов детского прикорма, изготавливаемых на его основе. Оказалось, что содержание Т4 в коровьем молоке и продуктах детского прикорма предельно низкое. Этот факт положил начало целому ряду исследований уровня тиреоидных гормонов в молоке и выяснению их роли в развитии новорожденных с разным тиреоидным статусом. Т4, поступающий в ЖКТ новорожденных с молоком матери, преодолевает гастроинтестинальный барьер, попадает в кровеносное русло ребенка, включается в тиреоидный баланс и обменные

процессы развивающегося организма и играет важную роль в формировании ферментных систем пищеварительного тракта [34, 35, 39–41].

Плацентарный лактоген человека (hPL). Было определено количество hPL у беременных женщин. В секрете молочной железы его содержится в 10 раз меньше, чем в сыворотке крови. Концентрация hPL снижается во время родов и через 24 ч достигает минимальных значений [44].

Инсулин. Концентрация инсулина в секрете молочной железы в конце беременности составляет 114.6 нг/мл, после родов она значительно снижается и к 5-му дню после родов достигает 21 нг/мл. У женщин, которые прекратили грудное вскармливание, концентрация инсулина в молоке увеличивается до 56 нг/мл. Показано, что содержание инсулина в молоке женщин, свиней и коров соответствует таковому в сыворотке крови. Столь значительное количество инсулина в молоке позволяет предположить, что он играет определенную физиологическую роль в развитии новорожденного [45, 46].

Кальцитонин. Иммунореактивный кальцитонин обнаружен в молоке женщин в концентрации 1.3 нг/мл, что в 10–40 раз больше, чем в сыворотке крови. Наиболее высокое его содержание обнаружено в молозиве, затем оно снижается в течение 1-й недели после родов. Авторы предполагают, что кальцитонин играет важную роль в становлении протейолитической активности ЖКТ новорожденных. Вместе с тем кальцитонин молока, вероятно, активно стимулирует депонирование кальция в костях и, следовательно, играет важную роль в формировании скелета растущего организма [34].

Окситоцин. Концентрация окситоцина в молоке на 2–4-й дни после родов в несколько раз превышает таковую в плазме крови новорожденных. Физиологическая роль окситоцина не выяснена, возможно, он оказывает местное воздействие на ЖКТ новорожденных. Средняя концентрация окситоцина, выявленная в грудном молоке женщин через 2–4 дня после родов, составила 10.0 ± 1.4 мкЕд/мл [34, 35].

Простагландины (PG). Интерес к изучению простагландинов был вызван тем, что они могут играть важную роль в приспособляемости различных физиологических систем новорожденных в период адаптации к внеутробной жизни. Концентрация PGE₂ колебалась в диапазоне 6–130 пг/мл, PGF₂ в диапазоне 221–793 пг/мл. Столь значительные колебания уровня PG в молоке зависели от времени сбора молока и периода лактации [47].

Эритропоэтин (ЕРО). Эритропоэтин – гормон, который вырабатывается почками, он сообщает организму о необходимости производства большего количества красных кровяных телец. Этот

гормон проникает в молоко и может стимулировать выработку эритроцитов у новорожденного. ЕРО, присутствующий в высокой концентрации у анемичных самок крыс, поступает с молоком сосункам и вызывает у них стимуляцию эритропоэза [48].

Несомненно, гормональный состав грудного молока – важный фактор обеспечения жизнедеятельности новорожденного, собственная эндокринная система которого еще функционально не созрела.

Биологически активные вещества

Наряду с гормонами, в молоке обнаружены такие биологически активные вещества, как эпидермальный фактор роста, эндорфины, а также другие белки и пептиды.

Эпидермальный фактор роста (EGF). В настоящее время большой интерес проявляется к изучению содержания EGF в молоке. Его наличие в молоке доказано экспериментально: добавление молока стимулировало синтез ДНК в культуре клеток, в которых рост был искусственно приостановлен. Установлены широкие индивидуальные колебания концентрации иммунореактивного EGF в молоке (в среднем концентрация составляет 80 нг/мл). Продукты детского прикорма не содержат EGF. EGF стабилен к действию кислоты и относительно устойчив к трипсину. Таким образом, присутствующий в молоке EGF может служить важным фактором, обеспечивающим нормальное созревание кишечника новорожденного, способствует заживлению слизистой оболочки кишечника и предотвращает его расстройства [42, 49].

Данные, накопленные за последние годы, значительно расширили наше понимание о факторах роста, цитокинах и гормонах, которые присутствуют в молоке и участвуют в регулировании потребления пищи и энергетическом балансе. Так, например, появились данные о следующих гормонах.

β -Эндорфин. Эндорфины – естественные обезболивающие вещества организма. Считается, что обнаруженный в молоке β -эндорфин помогает новорожденным преодолеть родовой стресс и адаптироваться к жизни вне матки. Высокие уровни β -эндорфина были обнаружены в молоке женщин, родивших вагинальным путем, родивших раньше срока, а также не получавших эпидуральную анестезию в родах [50].

Релаксин. Релаксин играет важную роль в женской репродуктивной системе. Релаксин, как можно догадаться по названию, ослабляет или снимает напряжение мышц, суставов и сухожилий. Релаксин обнаруживается в раннем молоке и далее в зрелом грудном молоке в течение не-

скольких недель после родов. Роль релаксина в молоке до сих пор неизвестна; предполагается, что он может воздействовать на желудок и кишечник новорожденного [50].

Лептин. Лептин – сравнительно недавно открытый полипептид, преимущественно вырабатываемый клетками (адипоцитами) подкожно-жировой клетчатки. Лептин является “гормоном сытости” за счет блокирования синтеза и высвобождения в гипоталамусе нейропептида голода и снижения секреции инсулина (повышение уровня глюкозы в крови стимулирует центр насыщения). Лептин обладает анорексигенным эффектом. Лептин присутствует в молоке, он вырабатывается и секретруется эпителиальными клетками молочных желез. Более того, секреторные эпителиальные клетки могут переносить лептин из крови в молоко. Было обнаружено, что концентрация лептина выше в цельном молоке, чем в обезжиренном [51–57].

Адипонектин. Адипонектин – наиболее распространенный белок, специфичный для жировой ткани, а его многочисленные функции начали выясняться лишь недавно. Адипонектин был обнаружен в женском обезжиренном молоке в диапазоне 4.2–87.9 нг/мл. Уровень адипонектина в женском молоке снижается с увеличением продолжительности лактации. Его концентрация также зависит от жировой массы матери и ее этнической принадлежности [51–57].

Грелин. Грелин – это пептид, вырабатываемый в основном в желудке и названный так за его свойство стимулировать секрецию гормона роста у человека. Значительные концентрации грелина присутствуют в пуповинной крови человека. Грелин обнаружен в молоке, он поступает из плазмы, а также производится и секретруется самой молочной железой. Уровень грелина в грудном молоке выше, чем в плазме. Концентрация грелина перед приемами пищи увеличивается, а после приема пищи уменьшается. Считается, что он дополняет гормон лептин, производимый в жировой ткани. Учитывая, что грелин участвует как в краткосрочной регуляции потребления пищи, стимулируя аппетит, так и в долгосрочной регуляции массы тела, вызывая ожирение, присутствие этого пептида в грудном молоке может быть одним из факторов, влияющих на контроль сытости младенца и массу тела по мере взросления [51, 55–57].

Обестатин. Как и лептин, обестатин проявляет анорексигенное действие. Обестатин – 23-аминокислотный пептид, полученный из предшественника грелинового пептида препрогрелина и продуцируемый желудком, тонкой кишкой человека и слюнными железами. Обестатин идентифицировали в молоке Aydin et al. [55], они обнаружили более высокие его уровни в молоке, чем в крови: уровни обестатина в молозиве и зрелом

молоке более чем в 2 раза превышали соответствующие уровни в крови. Неясно, поступает ли обестатин в молоко из крови или из молочной железы. Действие этого гормона недостаточно изучено. Некоторые авторы сообщают, что он снижает потребление пищи, прибавку массы тела, опорожнение желудка и подавляет перистальтику кишечника [54–57].

Резистин. Резистин – пептидный гормон, регулирующей чувствительность к инсулину. Выявлена положительная корреляция концентрации резистина как в молоке, так и в сыворотке крови с гормональным статусом кормящей матери [58].

IGF-I. Инсулиноподобный фактор роста IGF-I – одноцепочечный полипептид, один из родственных инсулиноподобных гормонов, действующий как первичный медиатор эффектов гормона роста. Совсем недавно IGF-связывающие белки (IGFBP) были идентифицированы в молоке. По данным Конь и соавт. [59], уровень IGF-I в грудном молоке был выше у матерей, чьи дети быстрее прибавляли в массе тела, при этом в молоке у них наблюдалась тенденция к увеличению уровней грелина и лептина. В связи с этим авторы предполагают, что ускорение роста детей этой группы может быть связано с более высоким потреблением ими IGF-I и грелина с грудным молоком. Эти исследования указывают на необходимость дальнейшего изучения возможной функциональной роли гормонально-активных белков грудного молока и их возможной связи с антропометрическими показателями детей, в том числе с развитием избыточной массы тела [51, 54, 57].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя данные обзора, можно выделить следующие моменты.

1) После родов у новорожденного еще не завершен процесс полного развития отдельных органов, систем и всего организма в целом. Созревание иммунной системы, дифференцировка желудочно-кишечного тракта, почек и других органов продолжается в постнатальном периоде, поэтому особенно в течение первого года жизни материнское молоко наиболее ценно для вскармливания ребенка.

2) В раннем постнатальном периоде сохраняется осуществляемая через молоко связь между матерью и обменными процессами в организме новорожденного.

3) Материнское молоко не могут заменить никакие самые современные искусственные молочные смеси. Несмотря на то что в производстве этих смесей используются добавки, приближающие их по химическому составу к материнскому молоку, они не могут выполнять те тонкие регу-

ляторные функции, которые осуществляют собственные компоненты женского молока.

Можно предположить, что в ближайшие годы наука обогатится еще более интересными знаниями о грудном молоке как канале гуморально-гормональной связи матери и младенца.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Caroli M., Vania A., Tomaselli M.A., Scotese I., Tezza G., Verga M.C., Mauro G.D., Antignani A., Miniello A., Bergamini M. // *Nutrients*. 2021. V. 13. P. 3756. <https://doi.org/10.3390/nu13113756>
2. Kim S.Y., Yi D.Y. // *Clin. Exp. Pediatrics*. 2020. V. 63. P. 301–309. <https://doi.org/10.3345/cep.2020.00059>
3. Nuzzi G., Trambusti I., Cicco D.I., Peroni M.E. // *Minerva Pediatr* (Torino). 2021. V. 73. P. 111–114. <https://doi.org/10.23736/S2724-5276.21.06223-X>
4. Bartok C. // *Breastfeed. Med.* 2011. V. 6. P. 117–124. <https://doi.org/10.1089/bfm.2010.0055>
5. Nagel E.M., Kummer L., Jacobs D.R., Jr, Foster L., Duncan K., Johnson K., Harnack L., Haapala J., Kharoud H., Gallagher T., Kharbanda E.O., Pierce S., Fields D.A., Demerath E.W. // *Breastfeed Med.* 2021. V. 16. P. 978–986. <https://doi.org/10.1089/bfm.2021.0131>
6. Sievers E., Oldigs H.D., Santer R., Schaub J. // *Ann. Nutr. Metab.* 2002. V. 46. P. 243–248. <https://doi.org/10.1159/000066498>
7. Martin C.R., Ling P.R., Blackburn G.L. // *Nutrients*. 2016. V. 8. P. 279. <https://doi.org/10.3390/nu8050279>
8. Caroli M., Vania A., Tomaselli M.A., Scotese I., Tezza G., Verga M.C., Mauro G.D., Antignani A., Miniello A., Bergamini M. // *Nutrients*. 2021. V. 13. P. 3756. <https://doi.org/10.3390/nu13113756>
9. Буданов П.В. // *Евразийский Союз Ученых*. 2019. № 9. С. 20–34. <https://doi.org/10.31618/ESU.2413-9335.2019.3.66.311>
10. Садырина Л.Б., Созонтова Т.И. // *Грудное вскармливание (учеб.-методич. пособие)*. Киров: Центр медицинской профилактики КОГБУЗ “Миац” Кировской области, 2020.
11. Khan S., Hepworth A.R., Prime D.K., Lai C.T., Tren-gove N.J., Hartmann P.E. // *J. Hum. Lact.* 2013. V. 29. P. 81–89. <https://doi.org/10.1177/0890334412448841>
12. Пустотина О.А., Селиверстов А.А. // *Влияние микробиома грудного молока на здоровье матери и но-*

- ворожденного. Медицинский совет. 2019. № 13. С. 36–40.
<https://doi.org/10.21518/2079-701X-2019-13-36-40>
13. Боровик Т.Э., Семенова Н.Н., Лукоянова О.Л., Звонкова Н.Г., Бушуева Т.В., Степанова Т.Н., Скворцова В.А., Мельничук О.С., Копыльцова Е.А., Семикина Е.Л., Захарова И.Н., Рюмина И.И., Нароган М.В., Грошева Е.В., Ханферьян Р.А., Савченко Е.А., Белюсова Т.В., Ёлкина Т.Н., Суровкина Е.А., Татаренко Ю.А. // *Вопр. соврем. педиатрии*. 2017. Т. 16. № 3. С. 226–234.
<https://doi.org/10.15690/vsp.v16i3.1733>
 14. McGrath B.A., Fox P.F., McSweeney P.L.H., Kelly A.L. // *Dairy Sci. Technol.* 2016. V. 96. P. 133–158.
<https://doi.org/10.1007/s13594-015-0258-x>
 15. Marchbank T., Weaver G., Nilsen-Hamilton M., Raymond J. // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2009. V. 296. P. G697–G703.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.90565.2008>
 16. Herrmann K., Carroll K. // *Breastfeed Med.* 2014. V. 9. P. 184–190.
<https://doi.org/10.1089/bfm.2013.0121>
 17. Кузьмин С.В., Скрипачева А.И., Русаков В.Н., Синицына О.О., Майзель С.Г., Алешкин В.А. // *Здравоохранение Российской Федерации*. 2022. Т. 66. № 2. С. 160–167.
<https://doi.org/10.47470/0044-197X-2022-66-2-160-167>
 18. Воронцов И.М. // *Естественное вскармливание детей. Его значение и поддержка: учеб. пособие для студентов и врачей* // Под ред. Воронцова И.М., Фатеевой Е.М. СПб.: Фолиант, 1998. 272 с.
 19. Zhu J., Dingess K.A., Mank M., Stahl B., Heck A.J.R. // *J. Nutr.* 2021. V. 151. P. 826–839.
<https://doi.org/10.1093/jn/nxaa445>
 20. Bhat S.A., Ahmad S.M., Ibeagha-Awemu E.M., Mobashir M., Dar M.A., Mumtaz P.T., Shah R.A., Dar T.A., Shabir N., Bhat H.F., Ganai N.A. // *BMC Genomics*. 2020. V. 21. P. 161.
<https://doi.org/10.1186/s12864-020-6574-4>
 21. Farrell H.M., Jimenez-Flores R., Bleck G.T., Brown E.M., Butler J.E., Creamer L.K., Hicks L.K., Hollar C.M., Ng-Kwai-Hang K.F., Swaisgood H.E. // *J. Dairy Sci.* 2004. V. 87. P. 1641–1674.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73319-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73319-6)
 22. Kent J.C., Mitoulas L.R., Cregan M.D., Ramsay D.T., Doherty D.A., Hartmann P.E. // *Pediatrics*. 2006. V. 117. P. 387–395.
<https://doi.org/10.1542/peds.2005-1417>
 23. Moukartzel S., Bode L. // *Clin. Perinatol.* 2017. V. 44. P. 193–207.
<https://doi.org/10.1016/j.clp.2016.11.014>
 24. Hamosh M. // *Pediatr. Clin. North Am.* 2001. V. 48. P. 69–86.
[https://doi.org/10.1016/S0031-3955\(05\)70286-8](https://doi.org/10.1016/S0031-3955(05)70286-8)
 25. Thurl S., Munzert M., Boehm G., Matthews C., Stahl B. // *Nutr. Rev.* 2017. V. 75. P. 920–933.
<https://doi.org/10.1093/nutrit/nux044>
 26. Коденцова В., Гмошинская М. // *Врач*. 2015. № 1. С. 68–73.
 27. Детское питание: руководство для врачей, 4-е изд., перераб. и доп. // Под ред. Тутельяна В.А., Коня И.Я. Москва: Медицинское информационное агентство, 2017. 784 с.
 28. Воронина О.А., Боголюбова Н.В., Зайцев С.Ю. // *Сельскохозяйственная биология*. 2022. Т. 57. № 4. С. 681–693.
<https://doi.org/10.15389/agrobiology.2022.4.681rus>
 29. Скальный А.В. // *Микроэлементы: бодрость, здоровье, долголетие*. 4-е изд., перераб. и доп. Москва: Перо, 2019.
 30. Zain S.M., Behkami S., Bakirdere S., Koki I.B. // *Food Control*. 2016. V. 66. P. 306–314.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.015>
 31. Грибакин С.Г., Орлова С.В., Подопригора И.В. // *Мед. алфавит*. 2023. № 8. С. 64–68.
<https://doi.org/10.33667/2078-5631-2023-8-64-68>
 32. Montagne P., Cuillière M.L., Molé C., Béné M.C., Faure G. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2001. V. 501. P. 241–247.
https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1371-1_30
 33. Овсянников В.Г., Торопкина Ю.Е., Краскевич В.В., Алексеев В.В., Бойченко А.Е., Алексеева Н.С., Краскевич Д.А. // *Сов. пробл. науки и образования*. 2020. № 3.
<https://doi.org/10.17513/spno.29903>
 34. Чепурная Т.В. // *Гормональный состав молока здоровых женщин в динамике лактации: автореф. дис. ... канд. биол. наук*. Киев, 1992.
 35. Волкова В.В. // *Мат. регион. межвуз. студенч. научно-практич. конфер.* (Орел, 18 июня 2021 г.). Москва: Картуш, 2021. С. 82–88.
 36. Amarant T., Fridkin M., Koch Y. // *Eur. J. Biochem.* 1982. V. 127. P. 647–650.
 37. Vass R.A., Kiss G., Bell E.F., Roghair R.D., Miseta A., Bódis J., Funke S., Ertl T. // *Nutrients*. 2021. V. 13. P. 424.
<https://doi.org/10.3390/nu13020424>
 38. Karimova S.F., Turakulov Y.Kh., Salakhova N.S., Gulamova F.Y. // *Endocrinol. Exp.* 1983. V. 17. P. 237–242.
 39. Turakulov Y.Kh., Karimova S.F., Gainutdinov M.Kh. // *Endocrinol. Exp.* 1983. V. 17. P. 255–261.
 40. Turakulov Y.Kh., Rakhimov K.R., Karimova S.F., Kuchkarova L.S. // *14th Int. Congress of Biochemistry*, Prague, 1988. P. 168.11.
 41. Чагарова С.А., Лисова И.М., Анфиногенова О.И. // *Мед. вестник Сев. Кавказа*. 2019. Т. 14. № 1.1.
<https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14068>
 42. Dvorak B. // *J. Pediatr.* 2010. V. 156. P. S31–S35.
<https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.11.018>
 43. Hechler C., Beijers R., Riksen-Walraven J.M., de Weerth C. // *Dev. Psychobiol.* 2018. V. 60. P. 639–650.
<https://doi.org/10.1002/dev.21761>
 44. Fujii K. // *Horumon To Rinsho*. 1969. V. 17. P. 558–564.
 45. Shehadeh N., Shamir R., Berant M., Etzioni A. // *Pediatr. Diabetes*. 2001. V. 2. P. 175–177.
<https://doi.org/10.1034/j.1399-5448.2001.20406.x>
 46. Fields D., Demerath E. // *Pediatr. Obes.* 2012. V. 7. P. 304–312.
<https://doi.org/10.1111/j.2047-6310.2012.00059.x>

47. Бараниченко В.В. // Мат. регион. межвуз. студенч. научно-практич. конфер. (Орел, 18 июня 2021 г.). Москва: Картуш, 2021. С. 39–45.
48. Semba R.D., Juul S.E. // J. Hum. Lact. 2002. V. 18. P. 252–261.
<https://doi.org/10.1177/089033440201800307>
49. Koldovsky O., Britton J., Grimes J., Schaudies P. // Endocr. Regul. 1991. V. 25. P. 58–62.
50. Doneray H., Tavlas G., Ozden A., Ozturk N. // Pediatr. Res. 2023.
<https://doi.org/10.1038/s41390-023-02617-y>
51. Шпаковская К.С., Леонькова Т.И., Штыкова О.Н., Шилина Н.М. // Вестник Смоленской гос. мед. академии. 2022. Т. 21. № 4. С. 158–164.
52. Savino F., Liguor S.A., Fissore M.F., Oggero R. // Int. J. Pediatr. Endocrinol. 2009. V. 2009. P. 327505.
<https://doi.org/10.1155/2009/327505>
53. Bronsky J., Karpisek M., Bronska E. // Clin. Chem. 2006. V. 52. P. 1763–1770.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.063032>
54. Лебедева Е.Н., Афонина С.Н., Мачнева И.В., Карнаухова И.В. // Совр. проблемы науки и образования. 2019. № 4.
<https://doi.org/10.17513/spno.29089>
55. Aydin S., Ozkan Y., Erman F. // Nutrition. 2008. V. 24. P. 689–693.
<https://doi.org/10.1016/j.nut.2008.03.020>
56. Zhang J.V., Ren P.-G., Avsian-Kretchmer O. // Science. 2005. V. 310. P. 996–999.
<https://doi.org/10.1126/science.1117255>
57. Eyzaguirre F., Mericq V. // Horm. Res. 2009. V. 71. P. 65–74.
<https://doi.org/10.1159/000183894>
58. Ilcol Y.O., Hizli Z.B., Eroz E. // Clin. Chem. Lab. Med. 2008. V. 46. P. 118–124.
<https://doi.org/10.1515/CCLM.2008.019>
59. Конь И.Я., Шилина Н.М., Гмошинская М.В., Иванушкина Т.А. // Вопр. питания. 2011. Т. 80. № 4. С. 73–79.
60. Fomon S.J. // Nutrition of Normal Infants. St. Louis: Mosby, 1993.
61. Химический состав пищевых продуктов // Под ред. Скурихина И.М. и Волгарева М.Н. Москва: Агропромиздат, 1987.
62. Характеристика основных частей молока // Информационный портал “Пишевик”, 2021.
<https://mppnik.ru/publ/1080-harakteristika-osnovnyh-chastey-moloka.html>

Chemical Composition of Human and Mammals Milk

Sh. F. Karimova*, # and G. O. Ismailova*

*Phone: +9 (9897) 727-71-84; e-mail: kshf53@mail.ru

*Tashkent Pediatric Medical Institute, ul. Bogishamol 223, Tashkent, 100140 Uzbekistan

The review describes the chemical composition and properties of milk, its importance for the development of the child and the formation of its individual organs and systems. The composition of colostrum and mature milk is considered in detail; presents detailed data on the individual components of milk: proteins, fats, carbohydrates, minerals, vitamins, enzymes; a comparison was made of the composition of human milk and individual mammals; the characteristics of such biologically active compounds as hormones and protective factors of milk are given. While human milk contains a large number of different components (>400), the ratio of which varies depending on the needs of each individual breastfed child, the composition of milk formulas of the most advanced developments includes only 40–50 of these components.

Keywords: lactation, proteins, carbohydrates, fats, mineral salts, vitamins, milk enzymes, protective factors, hormones



ТБ-ИЗАТЕСТ: СПОСОБ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ *Mycobacterium tuberculosis* МЕТОДОМ LAMP

© 2023 г. Ф. В. Ширшиков*, **, #, Ю. А. Беспярых*, **

*ФГБУ “Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина”
ФМБА России, Россия, 119435 Москва, ул. Малая Пироговская, 1А

**ФГБОУ ВО “Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева”,
Россия, 125047 Москва, Миусская пл., 9

Поступила в редакцию 21.02.2023 г.

После доработки 10.03.2023 г.

Принята к публикации 11.03.2023 г.

Чихотка, белая чума, туберкулез... Лишь относительно недавно это заболевание перестало быть абсолютно смертельным приговором для инфицированных людей, однако проблемы распространения и диагностики этого заболевания по-прежнему актуальны. В данной работе представлены результаты разработки новой тест-системы ТБ-ИЗАТЕСТ для дифференциальной диагностики вида *Mycobacterium tuberculosis* от нетуберкулезных микобактерий по видоспецифичному гену *rv2341* с использованием метода петлевой изотермической амплификации (LAMP). Тест-система применима для количественного анализа целевой геномной ДНК и позволяет выявлять десятикратные различия в концентрации. Впервые приводятся результаты оптимизации амплификации с помощью двухстадийного протокола на основе метода ортогональных матриц Тагути. Предложена теоретическая интерпретация высоких значений эффективности амплификации, наблюдаемых в реакции LAMP. Предел детекции разработанной тест-системы составляет 40 геном-эквивалентов на реакцию, а стадия амплификации требует 15 мин. По совокупности характеристик тест-система ТБ-ИЗАТЕСТ превосходит все известные способы идентификации *M. tuberculosis* методом LAMP.

Ключевые слова: изотермическая амплификация, микобактерии, туберкулез, *rv2341*

DOI: 10.31857/S0132342323060131, **EDN:** EYSSZB

ВВЕДЕНИЕ

Туберкулез (ТБ) – опасное инфекционное заболевание человека, поэтому создание новых инструментов для его эпидемиологического контроля по-прежнему не теряет своей актуальности [1, 2]. В последние годы ТБ представляет особую опасность для пациентов, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) и коронавирусом SARS-CoV-2, что обуславливает необходимость быстрых и адаптированных к массовому скринингу способов идентификации вариантов *Mycobacterium tuberculosis* (МТБ), представляющих опасность для человека. В отчете Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) за 2021 г. представлены данные об увеличении смертности от ТБ в связи с пандемией COVID-19

до показателей 2017 г. [3]. ТБ стал причиной смерти 1.6 млн человек в 2021 г., включая 187 тыс. ВИЧ-инфицированных пациентов [4]. Дальнейшее распространение ТБ зависит от эффективности мер, направленных на повышение качества и доступности его диагностики.

Бактерии вида *M. tuberculosis* – яркий пример генетически мономорфных патогенов с высоким уровнем консервативности генома [5], что делает их удобным объектом при разработке новых способов диагностики. Необходимо отметить, что только к 2018 г. Международным комитетом по систематике прокариот было принято решение о таксономическом статусе микобактерий, вызывающих ТБ [6]. Многие разновидности микобактерий, известные ранее в качестве отдельных видов и объединяемые термином “комплекс *M. tuberculosis*”, теперь предлагается рассматривать как различные варианты внутри единого типового вида *M. tuberculosis*. Обновление таксономических данных [7, 8] значительно облегчает проведение исследований МТБ и нетуберкулезных микобактерий (НТМ) [9], что особенно актуально в

Сокращения: LAMP – петлевая изотермическая амплификация; МГЭ – мобильный генетический элемент; МТБ – патогенные для человека варианты вида *Mycobacterium tuberculosis*; НТМ – нетуберкулезные микобактерии; ТБ – туберкулез; ТБ-ИЗАТЕСТ – тест на основе изотермической амплификации для диагностики ТБ.

Автор для связи: (тел.: +7 (906) 114-70-00; эл. почта: shrshkv@ya.ru).

сравнительной геномике микобактерий при поиске уникальных мишеней для диагностики [10–12].

На идентификацию микобактерий с использованием культуральных методов требуется несколько недель, поэтому в клинической практике часто востребованы молекулярно-генетические подходы, позволяющие гораздо быстрее выявлять возбудителя и определять спектр его лекарственной устойчивости. Современные ускоренные способы диагностики МТБ реализованы с помощью различных модификаций метода ПЦР. Широко внедрены тест-системы Xpert MTB/RIF и Xpert MTB/RIF Ultra (Cepheid, США), одобренные ВОЗ наряду с тест-системами других производителей [13, 14]. В России широкое практическое применение получили тест-системы ТБ-ТЕСТ и СПОЛИГО-БИОЧИП (Биочип-ИМБ, Россия) на основе агарозных микрочипов [15].

Перспективной платформой для создания быстрых способов диагностики микобактериальной инфекции стал метод петлевой изотермической амплификации (от англ. loop-mediated isothermal amplification, LAMP) [16, 17]. Механизм реакции LAMP предполагает проведение амплификации ДНК при постоянной температуре ~65°C с помощью ДНК-полимеразы, обладающей цепь-вытесняющей активностью [18, 19], а также “кóровых” (внутренних и внешних) и петлевых праймеров для ускорения реакции [20]. На основе метода LAMP его авторами разработана новая автоматизированная система “Simpnova” для быстрой пробоподготовки и мультиплексной детекции патогенов [21], позволяющая проводить стадию амплификации за 15–20 мин в микрочипах особой архитектуры. Другие особенности метода LAMP подробно рассмотрены в обзорах [22, 23].

Первые способы идентификации *M. tuberculosis* методом LAMP были разработаны вскоре после появления самого метода [24, 25]. Имеются сведения [26], что именно эти ранние работы легли в основу тест-системы Loopamp MTBC Detection Kit (Eiken Chemical, Япония), ставшей единственным набором реагентов для качественного определения МТБ методом LAMP, рассматриваемым ВОЗ в качестве альтернативы диагностике легочной формы ТБ по микроскопии мазка мокроты [27]. В данной тест-системе используются праймеры для выявления гена *gyrB* (*rv0005*) и мобильного элемента *IS6110*, а на стадию амплификации требуется 40 мин [28]. При этом некоторые эксперты ВОЗ по проблемам ТБ заявляли о необходимости проведения анализа менее чем за 20 мин [29].

Большинство существующих тест-систем для идентификации *M. tuberculosis* методом LAMP основано на амплификации фрагментов генов домашнего хозяйства и/или последовательности мобильного генетического элемента (МГЭ)

IS6110 [30–34]. Тем не менее уже ~20 лет назад на территории стран с высоким бременем ТБ, таких как Вьетнам, Индия, Ирак и Либерия, стали обнаруживаться штаммы *M. tuberculosis*, не имеющие ни одной копии *IS6110* [35]. Долгое время именно последовательность *IS6110* считалась наиболее подходящей мишенью для дифференциальной диагностики МТБ и применяется до сих пор [36, 37]. Это связано с тем, что в геноме микобактерий последовательности *IS1081* и *IS6110* могут присутствовать в нескольких копиях, поэтому их используют для увеличения аналитической и клинической чувствительности тест-систем [38]. На свойстве многокопийности этих МГЭ основан принцип работы тест-систем, одобренных ВОЗ [14], однако в них МГЭ используются только в качестве дополнительных мишеней.

Результаты полногеномного секвенирования микобактерий различных видов способствовали поиску новых молекулярно-генетических маркеров *M. tuberculosis*, не встречающихся у представителей НТМ [39]. Только к 2020 г. удалось провести широкомасштабное исследование по сравнительной геномике *M. tuberculosis* (>4700 геномов) и множества представителей НТМ (>4200 геномов), благодаря которому было обнаружено 30 перспективных генов-мишеней с высокой консервативностью [40]. Более того, авторами данной работы было впервые показано, что последовательности *IS1081*, *IS6110* и ряд других генов-мишеней характерны для многих представителей НТМ. Таким образом, была показана их непригодность в качестве единственных мишеней для дифференциальной диагностики МТБ. Следует подчеркнуть, что применение МГЭ в качестве основных мишеней, безусловно, имеет свои исторические предпосылки, но в связи с повышением доступности полногеномного секвенирования стремительно теряет актуальность, поскольку неизбежно снижает аналитическую и клиническую специфичность тест-систем.

Цель настоящей работы заключалась в разработке быстрой и чувствительной тест-системы ТБ-ИЗАТЕСТ на основе метода LAMP для количественной диагностики бактерий вида *M. tuberculosis*. В ходе работы проводился скрининг однокопийных мишеней в геноме микобактерий целевого вида, нуклеотидная последовательность и GC-состав которых совместимы с требованиями к дизайну праймеров для изотермической амплификации. Особое внимание уделялось оптимизации условий проведения реакции, подбору концентраций основных компонентов реакционной смеси, а также измерению аналитических характеристик тест-системы.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров из набора TB2341

Праймер	Нуклеотидная последовательность (5' → 3')
FIP	TAGCTGCCGGTCCAGGTCTGGTGGTGC GG G C C A C T G A
BIP	CAACCCAGTCCGGTGGTGTGCTTCGTCGACCGTGAACC
F3	ACCGGACCCCTCGTGT
B3	GATAGACCTGATCGACGCTG
LF	ACCCGTTGCCGTTGATC
LB	GTGGCACCTGCAACTTCC

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор гена-мишени. При поиске мишени в геноме *M. tuberculosis* было решено отказаться от использования МГЭ и провести *in silico* валидацию 30 потенциальных генов-мишеней [40] по критерию видоспецифичности не только внутри рода *Mycobacterium*, но и за его пределами:

1) на первом этапе из исходного перечня были исключены гены ($n = 7$), не удовлетворяющие критерию видоспецифичности за пределами рода *Mycobacterium*: *rv0033*, *rv0034*, *rv0035*, *rv0698*, *rv1046c*, *rv1669* и *rv1725c*;

2) среди оставшихся нуклеотидных последовательностей ($n = 23$) выявлены уникальные гены ($n = 11$), не имеющие абсолютно никаких гомологичных участков в геномах представителей НТМ и/или других видов бактерий: *rv1374c*, *rv2142c*, *rv2269c*, *rv2307a*, *rv2309a*, *rv2336*, *rv2341*, *rv2662*, *rv2929*, *rv2960c* и *rv3566a*;

3) совокупность генов, исключенных на шаге 2, применима в качестве мишеней, если при дизайне праймеров избегать гомологичных участков с помощью программы MorphoCatcher [41], – этот список генов ($n = 12$) включает *rv0112*, *rv0610c*, *rv1049*, *rv1499*, *rv2003c*, *rv2432c*, *rv2491*, *rv2492*, *rv2767c*, *rv3322c*, *rv3472* и *rv3770c*.

Анализ совместной экспрессии уникальных генов-мишеней оказался применим не только при оценке видоспецифичности предложенных ранее мишеней, но и при поиске новых. Так, ген *rv2341* функционально ассоциирован с геном *rv2395b* (*aprB*), от которого зависит его экспрессия [42]. Детальный анализ оперона *aprABC*, играющего ключевую роль на первых стадиях взаимодействия микобактерий с макрофагами, показал, что значительная часть нуклеотидной последовательности гена *rv2395a* (*aprA*) пригодна для дифференциальной диагностики МТБ. Кроме того, в ассоциации с геном *rv2142c*, кодирующим микобактериальный токсин ParE2, обнаружен другой уникальный ген *rv2142a* соответствующего анти-токсина ParD2 [43]. Таким образом, перечень видоспецифичных для *M. tuberculosis* мишеней был проанализирован более детально, уточнен и дополнен тремя новыми генами, важными для физиологии микобактерий.

Ген *rv2341* использовался ранее при создании ПЦР-праймеров [40], но не применялся для тест-систем на основе LAMP, поэтому он был выбран в качестве мишени в данной работе (рис. 1а, 1б). При выборе гена принимали во внимание консервативность его нуклеотидной последовательности среди штаммов *M. tuberculosis* [40]. Важная роль *rv2341* в физиологии микобактерий и его локализация вблизи гена *Asn*-тРНК (*asnT*), предполагающие низкую вероятность делеции такого локуса, а также высокая аналитическая специфичность упомянутых выше ПЦР-праймеров служили дополнительными факторами в пользу выбора этой мишени.

Дизайн праймеров. По результатам *in silico* анализа ген *rv2341* и соответствующий набор праймеров TB2341 (табл. 1) удовлетворяли условиям реакции LAMP. Данные праймеры слабо подвержены образованию нежелательных димеров, имеют однородную температуру отжига (рис. 1в), гибридизуются с участками гена-мишени без стабильных вторичных структур (рис. 2). При этом стартовые гантелеобразные ампликоны в тех же условиях формируют более стабильные одноцепочечные петли, что следует из меньшего значения свободной энергии Гиббса ампликона (рис. 1г) в сравнении с термодинамической стабильностью шпилек в составе гена-мишени.

Оптимизация амплификации. Для подбора условий проведения реакции LAMP применяли двухстадийный протокол оптимизации на основе метода ортогональных матриц Тагути с последующим дисперсионным анализом экспериментальных данных. Ранее метод Тагути уже использовался для оптимизации реакций LAMP [44, 45], однако в представленной версии протокола оценивается влияние лишь трех факторов: температуры инкубации, концентрации ионов магния и дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP). Кроме того, длительность стадии амплификации определялась только после измерения предела детекции. Время выхода на плато сигналов амплификации с наименьшей концентрацией ДНК-матрицы, сохраняющих периодичность появления, считали достаточным для достижения максимальной чувствительности.

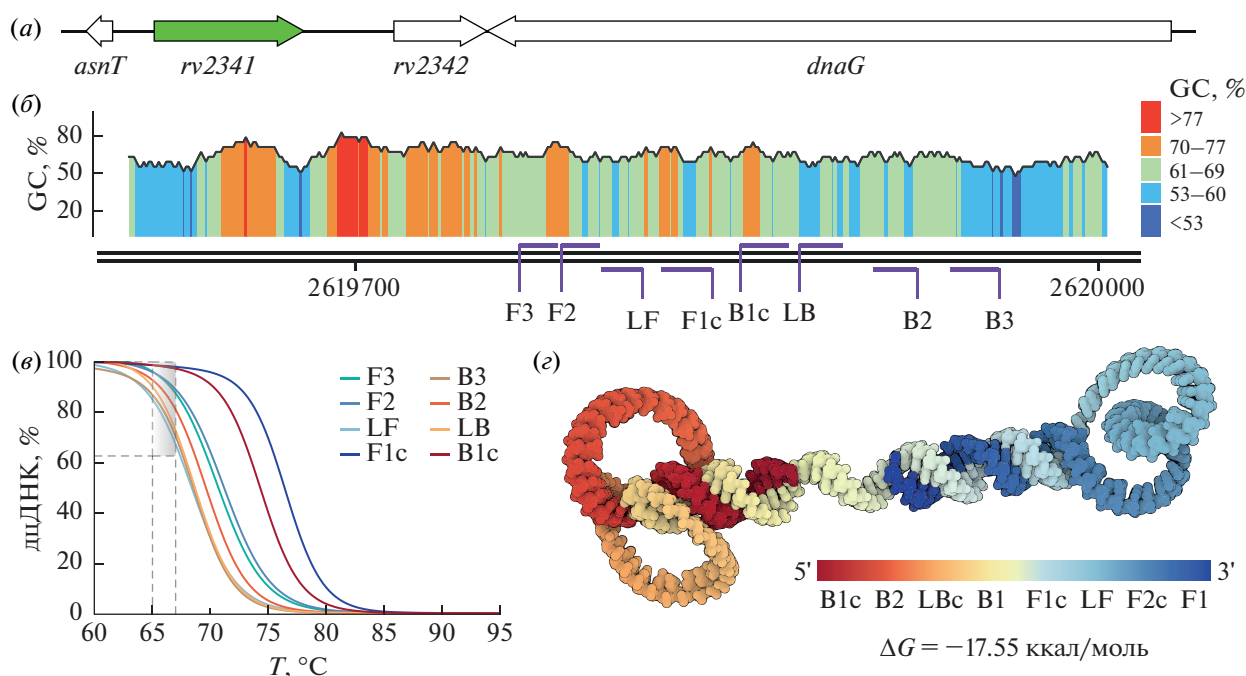


Рис. 1. Характеристика гена-мишени *rv2341* и набора праймеров TB2341. (a) — Карта расположения мишени в геноме типового штамма *M. tuberculosis* H37Rv; (б) — диаграмма распределения GC-состава нуклеотидной последовательности *rv2341*. Схематично показано расположение сайтов отжига праймеров; (в) — моделирование кривых плавления двуцепочечной ДНК (дцДНК) в сайтах отжига праймеров при различных температурах. Пунктиром выделен исследованный температурный диапазон активности *Bst*-ДНК-полимеразы (65–67°C), демонстрирующий динамику и синхронность гибридизации праймеров с геном-мишенью. Сайты отжига F1c/B1c обладают повышенной $T_{пл}$, необходимой для стабильности одноцепочечных петель стартового ампликона; (г) — молекулярная модель стартового ампликона, теоретически существующая при оптимальных условиях реакции LAMP. Одноцепочечные петли позволяют праймерам отжигаться при изотермических условиях без необходимости термической денатурации ДНК. Цветовым градиентом показано расположение различных сайтов отжига и их комплементарных участков. Длина стартового ампликона — 185 нт, GC-состав — 65%.

С точки зрения скорости реакции при различных значениях температуры инкубации оптимальным сочетанием финальных концентраций ионов магния и dNTP стало 7 и 1.4 mM соответственно, а наиболее ранние сигналы амплификации получены при 67°C (рис. 3 и 4). Процентный вклад температуры (Т), ионов магния (М) и dNTP (N) по результатам дисперсионного анализа данных составил 3.8, 47.0 и 40.4% соответственно. Предлагаемый способ оптимизации реакции получил название TMN-протокол. Он может найти применение в разработке мультиплексных способов детекции LAMP, когда для одинаковой температуры инкубации необходимо определить оптимальные значения концентраций компонентов различных реакционных смесей.

Установленные оптимальные значения основных факторов использовали для определения достаточной концентрации каждого из двух петлевых праймеров. Ускорение реакции наблюдалось при различных концентрациях петлевых праймеров (рис. 5a), однако для дальнейших экспериментов была выбрана концентрация 0.8 мкМ. Выраженный синергический эффект при добавле-

нии двух петлевых праймеров сопровождался максимальным ускорением реакции (рис. 5б). Все эксперименты с петлевыми праймерами завершали анализом кривых плавления амплификата и контролем продуктов неспецифической фоновой амплификации, что особенно важно для отрицательных контролей без добавления ДНК-матрицы. При данных условиях амплификации на кривых плавления минорные пики не наблюдались.

По итогам оптимизации для набора праймеров TB2341 было получено относительно высокое значение температуры инкубации реакции LAMP, составившее 67°C. По всей видимости, подобные значения температуры инкубации и температуры плавления ($T_{пл}$) финальных продуктов амплификации (~94°C) — возможное следствие высокого GC-состава фрагмента мишени, фланкируемого внешними праймерами (64%). При этом GC-состав стартового ампликона и всей последовательности *rv2341* составляет 65%, а полного генома штамма *M. tuberculosis* H37Rv — 66%. Интересно, что идентичная температура инкубации используется в тест-системе Loopamp

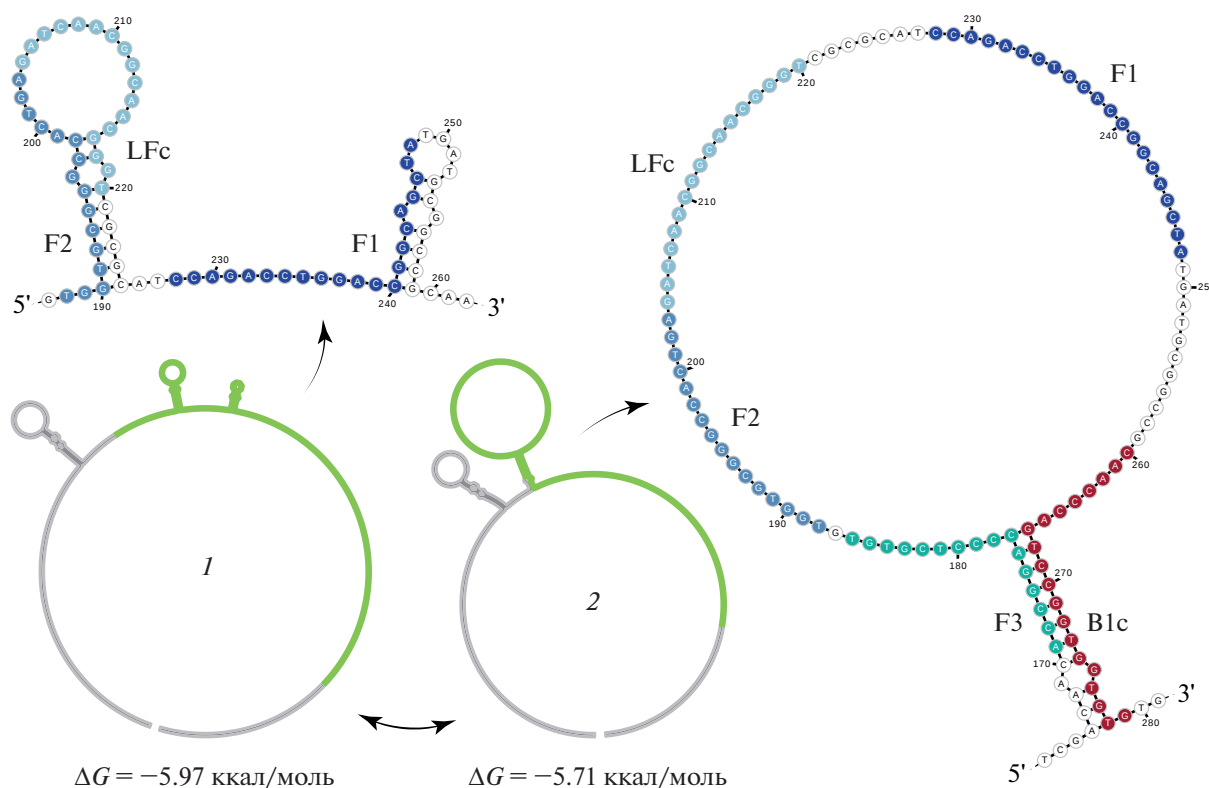


Рис. 2. Вторичная структура и термодинамика шпилек, образуемых нуклеотидной последовательностью гена *rv2341*: 1, 2 — две теоретически предсказанные структуры последовательности мишени, существующие при оптимальных условиях реакции LAMP. Зеленым цветом показан участок гена, фланкированный внешними праймерами. Рассчитанные значения свободной энергии Гиббса указывают на то, что обе структуры равновесны и не должны препятствовать отжигу праймеров. На увеличенных изображениях отмечены все сайты отжига, оказавшиеся в структуре шпилек.

MTBC Detection Kit [28] и более новых способах детекции МТБ на основе системы CRISPR-Cas [46], что удобно для сравнительных испытаний.

Аналитическая чувствительность. При оптимальных условиях реакции с помощью серии последовательных десятикратных разведений геномной ДНК *M. tuberculosis* установлен предел детекции, составивший 40 копий геномной ДНК на реакцию (рис. 6а, 6в). При высоких концентрациях матрицы наблюдалась высокая воспроизводимость сигналов амплификации, которая снизилась только на пределе детекции ($SD = 0.60$; $CV = 5.91\%$). Специфичность реакции LAMP сохранялась на протяжении всего линейного диапазона концентраций геномной ДНК, на что указывает равномерность $T_{пл}$ финального амплификата $\sim 94^\circ\text{C}$ (рис. 6б). Молекулярную массу продуктов амплификации анализировали с помощью капиллярного электрофореза (рис. 6г) и достаточно точно предсказывали существующей математической моделью [47]. Максимальное отличие между экспериментально измеренной массой и рассчитанной составило всего 5 п.н., что указывает на высокую специфичность реакции.

Эффективность амплификации. Для набора праймеров TB2341 эффективность амплификации в оптимальных условиях составила 152.4% ($R^2 = 0.977$) (рис. 6в). На момент подготовки данной работы в научной литературе не был описан допустимый диапазон значений эффективности амплификации LAMP, в отличие от ПЦР, для которой некоторые практические руководства указывают диапазон 90–105% [48]. При интерпретации полученного значения эффективности применялись стандартные для метода ПЦР математические формулы [49]. Поправки были сделаны лишь на способ детекции сигнала амплификации. В частности, в ходе реакции LAMP считывание сигнала флуоресценции происходило в дискретные моменты времени, не привязанные к конкретным этапам механизма реакции, а именно в каждом “цикле детекции” (C_d , по аналогии с терминологией ПЦР) продолжительностью 30 с.

Для набора праймеров TB2341 установлены следующие показатели эффективности реакции: $E = 2.5$ и $s = -2.487$. После поправки на продолжительность C_d в 30 с можно говорить о десятикратном приросте количества ампликонов в данной реакции LAMP примерно за минуту (1.244 мин), что

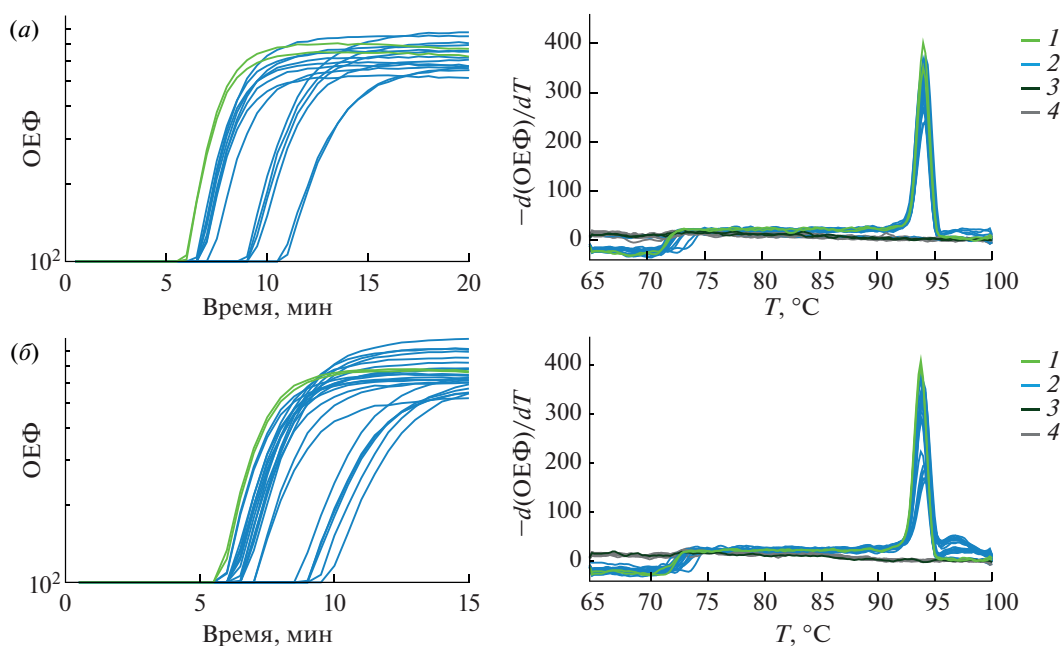


Рис. 3. Кривые амплификации в логарифмическом масштабе и кривые плавления финального ампликата на разных этапах оптимизации амплификации LAMP по методу Тагути на основе праймеров ТВ2341. (а) – Первая стадия оптимизации уровней факторов: температура инкубации (65, 66, 67°C), концентрация ионов магния (6, 7, 8 мМ), концентрация dNTP (1.2, 1.4, 1.6 мМ); (б) – вторая стадия оптимизации: температура инкубации (65, 66, 67°C), концентрация ионов магния (7, 8 мМ), концентрация dNTP (1.2, 1.4 мМ). ОЕФ – относительные единицы флуоресценции; 1 – сигналы реакций с ДНК-матрицей на основе плазмиды рНД2341, получаемые в оптимальных условиях; 2 – сигналы реакций в неоптимальных условиях, которые приводят к снижению скорости и появлению минорных пиков плавления неспецифических продуктов фоновой амплификации; 3 – сигналы отрицательных контролей без добавления ДНК-матрицы (ОК) в оптимальных условиях; 4 – сигналы ОК в неоптимальных условиях. Все реакции ОК вне зависимости от условий амплификации протекали без ложноположительных сигналов.

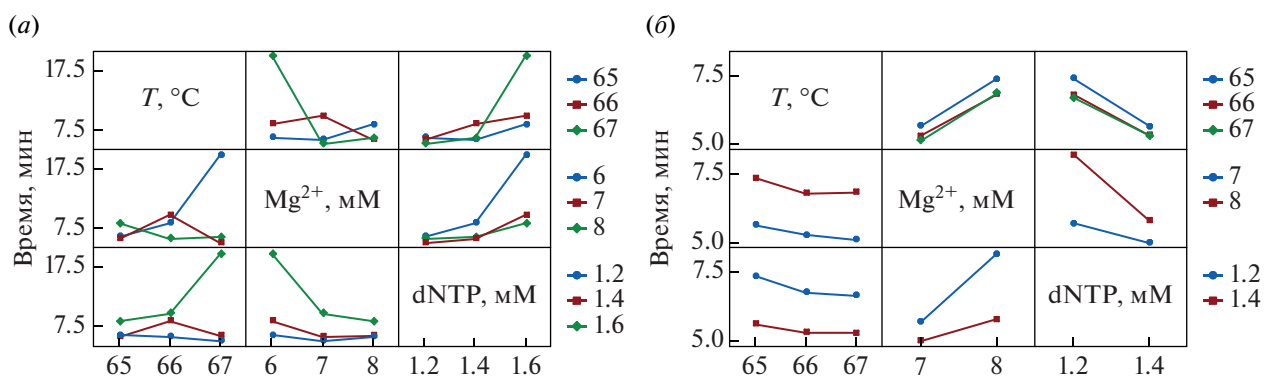


Рис. 4. Результаты дисперсионного анализа экспериментальных данных по оптимизации амплификации LAMP на основе метода Тагути. Представлены графики взаимодействий всех факторов различных уровней на основе средних значений времени появления сигналов амплификации. Уровни факторов, способствовавшие наиболее быстрым и специфичным сигналам амплификации по результатам первой стадии оптимизации (а), использовали для более точного сравнительного анализа на второй стадии (б). Соответствующие симметричные графики были получены и для значений показателя отношения сигнал/шум по модели “чем меньше, тем лучше”. Итоговый результат оптимизации амплификации предписывает проведение реакции LAMP при 67°C, концентрации ионов магния 7 мМ, концентрации dNTP 1.4 мМ.

объясняется неограниченным количеством новых актов отжига праймеров и элонгации цепей ДНК вплоть до наступления фазы плато.

В отличие от ампликонов ПЦР, которые в одноцепочечном состоянии содержат только один

сайт отжига для праймера, ампликоны LAMP содержат минимум два сайта отжига для внутреннего и петлевого праймеров – по одному сайту в каждой петле стартовой структуры [16, 20]. Кроме того, в стартовых ампликонах происходит элон-

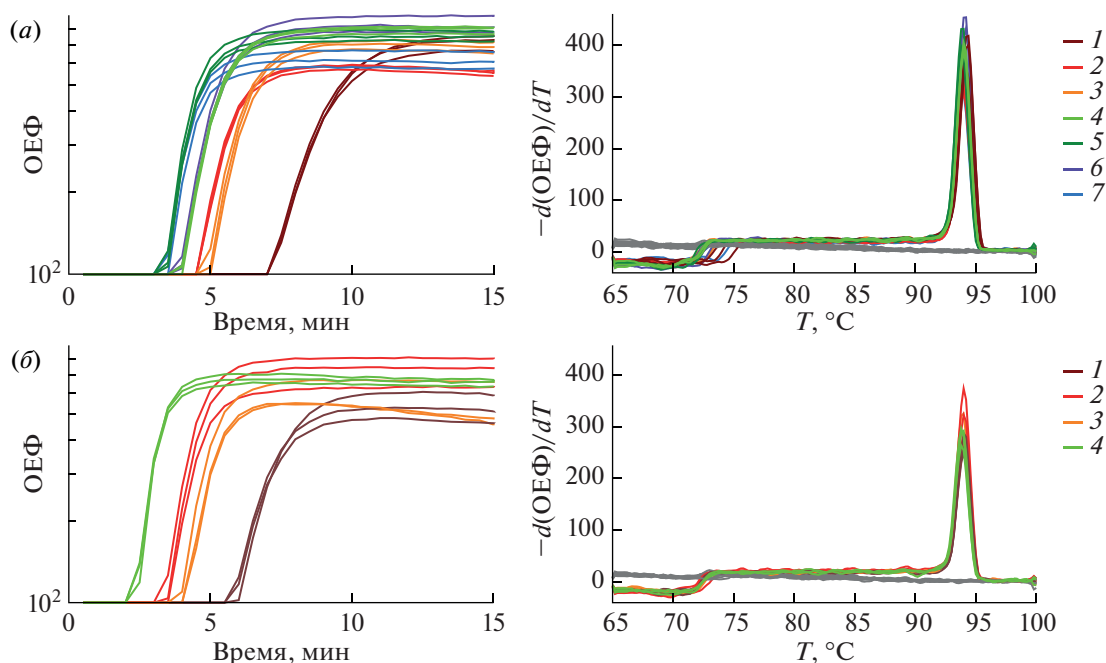


Рис. 5. Влияние петлевых праймеров на скорость и специфичность реакции LAMP. (а) — Кривые амплификации и плавления финального амплификата при добавлении различных концентраций каждого петлевого праймера: 1 — коровые праймеры (СР); 2 — СР с добавлением прямого петлевого праймера (LF) в концентрации 0.4 мкМ; 3 — СР + обратный петлевой праймер (LB) (0.4 мкМ); 4 — СР + LF (0.8 мкМ); 5 — СР + LB (0.8 мкМ); 6 — СР + LF (1.2 мкМ); 7 — СР + LB (1.2 мкМ); (б) — кривые амплификации и плавления финального амплификата при оценке совместного эффекта двух петлевых праймеров (LP): 1 — СР; 2 — СР + LF; 3 — СР + LB; 4 — СР + LP. Концентрация каждого петлевого праймера — 0.8 мкМ. Однородная $T_{пл}$ финального амплификата свидетельствует о сохранении специфичности при увеличении скорости реакции.

гация ДНК-полимеразой гибризованного 3'-конца, что вносит дополнительный вклад в выход реакции. Ампликоны LAMP с возрастанием молекулярной массы помимо терминальной петли приобретают множество сайтов отжига в своих двуцепочечных участках, где гибридизация с внутренними и петлевыми праймерами возможна благодаря эффекту “дыхания” цепей [50].

Аналитическая специфичность. Получив положительные сигналы амплификации на всех имеющихся образцах *M. tuberculosis* ($n = 7$) и не наблюдая реакции при добавлении в качестве ДНК-матрицы остальных образцов нашей коллекции ($n = 16$), видоспецифичность гена *rv2341* была дополнительно уточнена на внутривидовом уровне посредством *in silico* анализа геномов всех вариантов *M. tuberculosis*, доступных в базе NCBI Nucleotide (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>).

Установлено, что ген *rv2341* присутствует в геномах почти всех вариантов вида *M. tuberculosis*, за исключением двух: *M. tuberculosis* var. *munzi* и *M. tuberculosis* var. *pinnipedii*. Данные варианты — специализированные патогены естественных хозяев: мангустов и ластоногих [6]. Имеются факты заражения дрессировщиков тюленей штаммами

M. tuberculosis var. *pinnipedii* [51], но они редкие и скорее не представляют опасности. Случаи заражения людей штаммами *M. tuberculosis* var. *munzi* не описаны [52, 53].

Таким образом, ген *rv2341* по многим критериям является надежной мишенью и вполне мог бы стать новым стандартом в молекулярной диагностике МТБ. Мозаичность его встречаемости, по-видимому, отражает эволюцию предков известных ныне вариантов *M. tuberculosis* [54] и его возможное приобретение более ранними формами микобактерий в результате горизонтального переноса [55], поскольку для современных штаммов целевого вида характерна высокая степень консервативности генома [56].

Для демонстрации применимости гена *rv2341* в качестве мишени для праймеров, совместимых не только с методом ПЦР, но и с LAMP, в рамках настоящего исследования была разработана тест-система ТБ-ИЗАТЕСТ, предназначенная для дифференциальной диагностики вариантов МТБ, представляющих опасность для человека. По совокупности технических и аналитических характеристик тест-система ТБ-ИЗАТЕСТ пре-

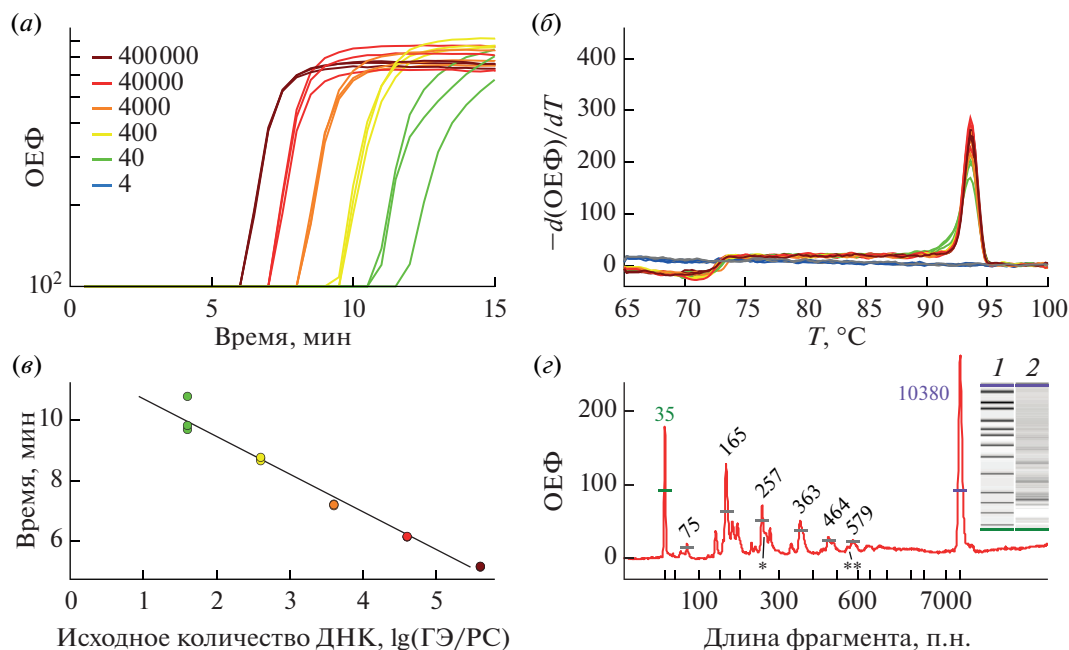


Рис. 6. Характеристики реакции LAMP на основе полного набора праймеров TB2341 при оптимальных условиях амплификации. (а) — Кривые амплификации в логарифмическом масштабе при измерении аналитической чувствительности в диапазоне концентраций 4×10^0 – 4×10^5 геном-эквивалентов *M. tuberculosis*. Предел детекции — 4×10^1 копий геномной ДНК на реакцию; (б) — кривые плавления финального ампликата; (в) — стандартная кривая с визуализацией линейного динамического диапазона. Эффективность амплификации — 152.4% ($R^2 = 0.977$). ГЭ — геном-эквивалент; РС — реакционная смесь; (г) — визуализация продуктов реакции с помощью капиллярного электрофореза: 1 — маркер молекулярных масс ДНК (снизу вверх: 35, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 1000, 2000, 3000, 7000, 10380 п.н.); 2 — продукты амплификации в виде характерной периодичной “лесенки”. Приведены значения молекулярной массы продуктов с наибольшей концентрацией. Рассчитанные молекулярные массы ампликонов имеют следующие значения: 165, 268*, 361, 464, 557** п.н. Звездочками на рисунке обозначены соответствующие минорные пики измеренных масс, обнаруженных в продуктах реакции на капиллярном электрофорезе: * 267 п.н.; ** 552 п.н.

восходит все известные способы выявления геномной ДНК *M. tuberculosis* методом LAMP.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выбор гена-мишени. Для подбора гена-мишени проводили *in silico* скрининг идентифицированных ранее 30 потенциальных генов-мишеней [40] не только среди штаммов МТБ/НТМ, но и вне рода *Mycobacterium*. Для этого использовали веб-сервис NCBI BLAST и алгоритм blastn [57]. Анализ функциональной ассоциации и совместной экспрессии генов проводили с помощью веб-сервиса STRING 11.5 (<https://string-db.org>) [58]. При обнаружении гомологии ДНК вне вида *M. tuberculosis* (порог покрытия нуклеотидной последовательности — 25%) мишень признавали малоприменимой. В качестве мишени для определения *M. tuberculosis* использовали ген *rv2341* (синоним — *lppQ*; идентификатор NCBI Gene: 886275). Нуклеотидную последовательность гена извлекали из полного генома типового штамма *M. tuber-*

culosis H37Rv (идентификатор NCBI Nucleotide: NC_000962.3) [59]. Геномное окружение и GC-состав *rv2341* визуализировали в программе SnapGene Viewer 6.0.5 (Dotmatrix, США).

Олигонуклеотидные праймеры. При подборе праймеров использовали программное обеспечение PrimerExplorer 5.0 (<https://primerexplorer.jp/e>) [17] и веб-сервис LAMP Primer Design Tool 1.0.2 (<https://lamp.neb.com>) [22]. Нуклеотидные последовательности разработанных праймеров приведены в табл. 1. Возможные димеры праймеров оценивали с помощью веб-сервиса PrimerDimer (<http://primer-dimer.com>) [60]. Проводили *in silico* контроль синхронности гибридизации парных сайтов отжига праймеров в оптимальных условиях реакции с помощью веб-сервиса uMelt Quartz 3.6.2 (<https://dna-utah.org/umelt/quartz>) [61]. При необходимости нуклеотидную последовательность праймеров модифицировали вручную.

Химический синтез праймеров проводили фосфорамидитным методом на автоматическом

синтезаторе ABI 3900 (Applied Biosystems, США). Все олигонуклеотиды были обессолены, лиофилизированы производителем (Евроген, Россия) и не проходили дополнительных стадий очистки.

В день эксперимента готовили 25× водные растворы коровых праймеров (FIP, VIP, F3, V3) [19]. В отдельных пробирках готовили 25× растворы петлевых праймеров (LF и LB). Готовили аликвоты всех растворов и хранили их при –20°C, допуская только один цикл заморозки-оттаивания.

Тестирование праймеров проводили на геномной ДНК по протоколу производителя ДНК-полимеразы *Bst* 2.0 WarmStart (New England Biolabs (NEB), США).

Молекулярное моделирование. Моделирование вторичной структуры цепей ДНК и термодинамические расчеты проводили в программе mFold 4.7 (<http://www.unafold.org>) [62] при оптимальных условиях LAMP. Шпильки ДНК визуализировали в приложении forna (<http://rna.tbi.univie.ac.at/forna>) [63]. С помощью веб-сервиса RNAComposer (<http://rnacomposer.ibch.poznan.pl>) [64], а также программ Discovery Studio Visualizer 21.1 (3DS, Франция) и PyMOL 2.5 (Schrödinger, США) проводили моделирование третичной структуры сахарофосфатного остова и оснований. Визуализацию стартового ампликона проводили с помощью веб-сервиса Mol* Viewer (<https://molstar.org>) [65].

Коллекция геномной ДНК. Коллекция включала в себя образцы геномной ДНК, выделенной из штаммов целевого вида *M. tuberculosis* ($n = 7$) [66]; близкородственных видов НТМ: *M. avium* ($n = 2$), *M. goodii* ($n = 1$) и *M. scrofulaceum* ($n = 1$); близкородственных бактерий других видов: *Mycobacterium fortuitum* ($n = 1$), *M. phlei* ($n = 1$) и *M. smegmatis* ($n = 1$); бактерий других таксонов: *Acinetobacter baumannii* ($n = 1$), *Aeromonas hydrophila* ($n = 1$), *Escherichia coli* ($n = 1$), *Klebsiella pneumoniae* ($n = 1$), *Proteus mirabilis* ($n = 1$), *Pseudomonas aeruginosa* ($n = 1$), *Salmonella enterica* ($n = 1$) и *Staphylococcus aureus* ($n = 1$).

Концентрация всех образцов ДНК составляла 2 нг/мкл. Концентрацию нуклеиновых кислот измеряли с помощью флуориметра Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, США). Принадлежность образцов ДНК таксону *M. tuberculosis* дополнительно подтверждали с помощью ПЦР и тест-системы ПОЛИТУБ (Литех, Россия).

Молекулярное клонирование. Для создания плазмидной ДНК с сайтами отжига праймеров проводили ПЦР-амплификацию фрагмента гена *rv2341*, фланкированного внешними праймерами (F3 и V3). Молекулярная масса клонируемого фрагмента –194 п.н., GC-состав – 64%. Для ам-

плификации использовали набор реагентов Tersus Plus PCR Kit (Евроген, Россия). Реакционную смесь готовили согласно инструкции производителя, используя 0.4 мкМ каждого внешнего праймера. В качестве ДНК-матрицы использовали 2 мкл образца геномной ДНК *M. tuberculosis* в концентрации 2 нг/мкл. ПЦР-амплификацию проводили в термоциклере CFX96 Touch (Bio-Rad, США) по следующему протоколу: 95°C – 3 мин; 35 циклов: 95°C – 10 с, 55°C – 30 с, 72°C – 15 с.

Целевой фрагмент гена *rv2341* после очистки в агарозном геле использовали для быстрого лигирования в линейаризованный плазмидный вектор pAL2-T с помощью набора реагентов Quick-TA Kit (Евроген, Россия). Полученной лигазной смесью проводили химическую трансформацию компетентных клеток штамма *E. coli* TOP10. После культивирования клеток *E. coli* при 37°C в чашках Петри на плотной питательной среде LB с ампициллином (100 мкг/мл), скрининга клонов и секвенирования вставки по Сэнгеру, культивировали успешный клон для накопления биомассы продуцента плазмиды. Далее выделяли плазмидную ДНК набором реагентов Plasmid Midi Kit (Qiagen, Германия). Плазмиду pHD2341 использовали в качестве ДНК-матрицы при оптимизации амплификации.

Оптимизация амплификации. Для определения оптимального соотношения концентраций компонентов буфера готовили реакционную смесь объемом 10 мкл, содержащую 1× Isothermal Amplification Buffer (NEB, США), 0.5× EvaGreen (Biotium, США), 1.6 мкМ каждого внутреннего праймера (FIP и VIP), 0.2 мкМ каждого внешнего праймера (F3 и V3), 3.2 ед. акт. ДНК-полимеразы *Bst* 2.0 WarmStart (NEB, США) и стерильную деионизированную воду без нуклеаз (Евроген, Россия). В качестве ДНК-матрицы использовали 2 мкл плазмиды pHD2341 в концентрации 5 нг/мкл.

Регистрацию флуоресценции интеркалирующего красителя EvaGreen при накоплении продуктов реакции LAMP проводили в канале детекции FAM/SYBR каждые 30 с. Длительность амплификации в протоколе двухстадийной оптимизации по методу ортогональных матриц Тагути составляла 20 мин (стадия I) и 15 мин (стадия II).

После термической инактивации ДНК-полимеразы (95°C – 2 мин) проводили анализ вероятных продуктов неспецифической амплификации с помощью анализа кривых плавления в диапазоне температур 65–100°C с шагом 0.2°C. Оптимальными признавали уровни факторов, способствующие максимальной скорости амплификации и однородности получаемых значений $T_{пл}$.

финального амплификата без дополнительных минорных пиков неспецифичных продуктов.

Исследовали влияние на скорость реакции градиента температуры инкубации (65–67°C с шагом 1°C) и компонентов реакционной смеси в концентрациях: 6–8 мМ MgSO₄ (NEB, США) с шагом 1 мМ; 1.2–1.6 мМ dNTP (Биосан, Россия) с шагом 0.2 мМ. Каждый фактор оптимизации тестировали в двух технических повторах ($n = 2$), исследуя три уровня переменных значений фактора ($n = 3$). Далее определяли достаточную концентрацию каждого петлевого праймера (LF и LB) в градиенте 0.4–1.2 мкМ с шагом 0.4 мкМ.

Все эксперименты проводили на термоциклере CFX96 Touch (Bio-Rad, США).

Аналитическая чувствительность. Для измерения предела детекции использовали серию последовательных десятикратных разведений стандартных образцов на основе очищенной геномной ДНК *M. tuberculosis*. Аналитическую чувствительность измеряли при оптимальных условиях в трех технических повторах ($n = 3$) для каждой исследуемой концентрации в диапазоне значений 4×10^0 – 4×10^5 геном-эквивалентов на реакцию, завершая анализом кривых плавления.

Эффективность амплификации. Анализ эффективности реакции проводили с помощью линейного уравнения стандартной кривой и полученного значения коэффициента детерминации (R^2) [49]. Эффективность амплификации (E) рассчитывали по коэффициенту наклона стандартной кривой (s , от англ. slope) по следующей формуле:

$$E = 10^{-1/s}.$$

Капиллярный электрофорез. Для визуализации продуктов реакции LAMP использовали систему капиллярного электрофореза на микрофлюидном чипе Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, США) с набором реагентов High Sensitivity DNA Reagents (Agilent Technologies, Литва). Концентрация ДНК в реакционной смеси после амплификации составляла 20 нг/мкл, поэтому перед измерением готовили десятикратное разведение амплификата деионизированной водой без нуклеаз. Значения экспериментально полученных молекулярных масс сравнивали с таковыми согласно математической модели [47].

Статистический анализ. Экспериментальные данные анализировали с помощью программы CFX Manager 3.1 (Bio-Rad, США). Построение ортогональных матриц Тагути и дисперсионный анализ проводили в программе Minitab 19 (Minitab, США).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пандемия коронавирусной инфекции наглядно продемонстрировала последствия низкой пропускной способности диагностических лабораторий, ограниченных рамками существующих методических рекомендаций и тест-систем на основе ПЦР. К сожалению, многие диагностические центры оказались неадаптированными к массовому скринингу. Более того, большой ущерб был нанесен диагностике других инфекционных заболеваний, среди которых оказался и ТБ. Один из способов решения этой проблемы заключается в более широком внедрении быстрых тестов на основе метода LAMP, применение которых возможно не только в крупных городах, но и в регионах.

В настоящей работе впервые для метода LAMP был применен комплексный подход к подбору гена-мишени, дизайну праймеров и анализу их физико-химических свойств, а также к выбору стратегии оптимизации концентраций компонентов реакционной смеси и условий амплификации, основанной на методе ортогональных матриц Тагути, с последующим дисперсионным анализом полученных экспериментальных данных.

Важное преимущество метода LAMP заключается в возможности сокращения длительности стадии амплификации, которая обычно составляет 30–60 мин. Поэтому большое внимание было уделено оценке ландшафта оптимальных значений таких факторов, как температура инкубации, а также концентрация ионов магния и dNTP. Двухстадийный TMN-протокол оптимизации и комплексный статистический анализ данных позволили небольшим количеством экспериментов добиться максимальных показателей эффективности амплификации. Так, важным результатом оптимизации стало сокращение длительности стадии амплификации до 15 мин, достаточных для обнаружения 40 копий геномной ДНК *M. tuberculosis*.

Разработанная тест-система ТБ-ИЗАТЕСТ может найти применение в различных областях исследований возбудителя ТБ. Наиболее вдохновляющим возможным примером применения разработанной тест-системы представляется ее использование для быстрой оценки эффективности схемы антибактериальной химиотерапии, назначаемой пациенту с ТБ. Высокая скорость амплификации в сочетании с количественным анализом геномной ДНК *M. tuberculosis* позволяют повысить регулярность контроля эффекта принимаемых препаратов, что недоступно при методе культивирования. При использовании однокопийной мишени *rv2341* выявляемое количество геном-эквивалентов будет соответствовать коли-

честву клеток микобактерий. Проблема дифференциации геномной ДНК живых и мертвых клеток при этом характерна для всех методов амплификации и, следовательно, не будет недостатком предлагаемой тест-системы.

В заключение необходимо отметить, что представленные результаты в значительной степени пионерские. В частности, в совокупности с результатами более ранних работ [23] можно утверждать, что диапазон значений эффективности амплификации LAMP для оптимизированных тест-систем лежит в пределах 99–152%, что существенно превосходит метод ПЦР. Многие аспекты экспериментов с LAMP раскрыты в соответствии с руководящими принципами MIQE [67], разработанными для стандартизации результатов количественной ПЦР.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны П.А. Бобровскому за помощь в молекулярном клонировании и В.А. Веселовскому за анализ амплификата на установке для капиллярного электрофореза.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-75-10144).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Нуклеотидные последовательности праймеров набора TB2341 стали основой патентной заявки на изобретение в Федеральную службу по интеллектуальной собственности (Роспатент): рег. № 2022133809 от 22.12.2022 (авторы: Ш.Ф.В., Б.Ю.А.).

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция исследования — Ш.Ф.В., Б.Ю.А.; дизайн экспериментов, методология, экспериментальная работа, анализ данных, визуализация, написание рукописи — Ш.Ф.В.; получение финансирования, редактирование рукописи, научное руководство — Б.Ю.А. Все авторы ознакомлены с финальной версией рукописи статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Pai M., Behr M.A., Dowdy D., Dheda K., Divangahi M., Boehme C.C., Ginsberg A., Swaminathan S., Spigelman M., Getahun H., Menzies D., Raviglione M.* // *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2016. V. 2. P. 16076. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.76>
2. *Bhat Z.S., Rather M.A., Maqbool M., Ahmad Z.* // *Biomed. Pharmacother.* 2018. V. 103. P. 1733–1747. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.176>
3. *Chakaya J., Petersen E., Nantanda R., Mungai B.N., Migliori G.B., Amanullah F., Lungu P., Ntoumi F., Kumarasamy N., Maeurer M., Zumla A.* // *Int. J. Infect. Dis.* 2022. V. 124. P. S26–S29. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.03.011>
4. *Bagechi S.* // *The Lancet Microbe.* 2023. V. 4. P. e20. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(22\)00359-7](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(22)00359-7)
5. *Achtman M.* // *Annu. Rev. Microbiol.* 2008. V. 62. P. 53–70. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162832>
6. *Riojas M.A., McGough K.J., Rider-Riojas C.J., Rastogi N., Hazbón M.H.* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2018. V. 68. P. 324–332. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002507>
7. *Gupta R.S., Lo B., Son J.* // *Front Microbiol.* 2018. V. 9. P. 67. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00067>
8. *Meenan C.J., Barco R.A., Loh Y.E., Cogneau S., Rigouts L.* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2021. V. 71. P. 004922. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004922>
9. *Johansen M.D., Herrmann J.-L., Kremer L.* // *Nat. Rev. Microbiol.* 2020. V. 18. P. 392–407. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0331-1>
10. *Galagan J.E.* // *Nat. Rev. Genet.* 2014. V. 15. P. 307–320. <https://doi.org/10.1038/nrg3664>
11. *Gagneux S.* // *Nat. Rev. Microbiol.* 2018. V. 16. P. 202–213. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.8>
12. *Merker M., Rasigade J.-P., Barbier M., Cox H., Feuerriegel S., Kohl T.A., Shitikov E., Klaos K., Gaudin C., Antoine R., Diel R., Borrell S., Gagneux S., Nikolaevskyy V., Andres S., Crudu V., Supply P., Niemann S., Wirth T.* // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. P. 5105. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32455-1>
13. *Chakravorty S., Simmons A.M., Rowneki M., Parmar H., Cao Y., Ryan J., Banada P.P., Deshpande S., Shenai S., Gall A., Glass J., Krieswirth B., Schumacher S.G., Nabeta P., Tukvadze N., Rodrigues C., Skrahina A., Tagliani E., Cirillo D.M., Davidow A., Denking C.M., Persing D., Kwiakowski R., Jones M., Alland D.* // *mBio.* 2017. V. 8. P. e00812-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00812-17>
14. World Health Organization, 2021. WHO Consolidated Guidelines on Tuberculosis. Module 3: Diagnosis. Rapid Diagnostics for Tuberculosis Detection, 2021 Update. Geneva: World Health Organization, 2021. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240029415>

15. Gryadunov D.A., Shaskolskiy B.L., Nasedkina T.V., Rubina A.Y., Zasedatelev A.S. // *Acta Naturae*. 2018. V. 10. P. 4–18.
<https://doi.org/10.32607/20758251-2018-10-4-4-18>
16. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. P. e63.
<https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
17. Tomita N., Mori Y., Kanda H., Notomi T. // *Nat. Protoc.* 2008. V. 3. P. 877–882.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2008.57>
18. Kaboev O.K., Luchkina L.A., Akhmedov A.T., Bekker M.L. // *J. Bacteriol.* 1981. V. 145. P. 21–26.
<https://doi.org/10.1128/jb.145.1.21-26.1981>
19. Tanner N.A., Evans T.C. // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2014. V. 105. P. 15.14.1–15.14.14.
<https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1514s105>
20. Nagamine K., Hase T., Notomi T. // *Mol. Cell. Probes.* 2002. V. 16. P. 223–229.
<https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415>
21. Yonekawa T., Watanabe H., Hosaka N., Semba S., Shoji A., Sato M., Hamasaki M., Yuki S., Sano S., Segawa Y., Notomi T. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. P. 5409.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-62109-5>
22. Moore K.J.M., Cahill J., Aidelberg G., Aronoff R., Bektaş A., Bezdan D., Butler D.J., Chittur S.V., Codyre M., Federici F., Tanner N.A., Tighe S.W., True R., Ware S.B., Wyllie A.L., Afshin E.E., Bendesky A., Chang C.B., Dela Rosa R., Elhaik E., Erickson D., Goldsborough A.S., Grills G., Hadasch K., Hayden A., Her S.Y., Karl J.A., Kim C.H., Krieger A.J., Kunstman T., Landau Z., Land K., Langhorst B.W., Lindner A.B., Mayer B.E., McLaughlin L.A., McLaughlin M.T., Molloy J., Mozsary C., Nadler J.L., D'Silva M., Ng D., O'Connor D.H., Ongerth J.E., Osuolale O., Pinharanda A., Plenker D., Ranjan R., Rosbash M., Rotem A., Segarra J., Schürer S., Sherrill-Mix S., Solo-Gabriele H., To S., Vogt M.C., Yu A.D., Mason C.E., The gLAMP Consortium // *J. Biomol. Tech.* 2021. V. 32. P. 228–275.
<https://doi.org/10.7171/jbt.21-3203-017>
23. Shirshikov F.V., Bespyatykh J.A. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2022. V. 48. P. 1159–1174.
<https://doi.org/10.1134/S106816202206022X>
24. Iwamoto T., Sonobe T., Hayashi K. // *J. Clin. Microbiol.* 2003. V. 41. P. 2616–2622.
<https://doi.org/10.1128/JCM.41.6.2616-2622.2003>
25. Boehme C.C., Nabeta P., Henostroza G., Raqib R., Rahim Z., Gerhardt M., Sanga E., Hoelscher M., Notomi T., Hase T., Perkins M.D. // *J. Clin. Microbiol.* 2007. V. 45. P. 1936–1940.
<https://doi.org/10.1128/JCM.02352-06>
26. Rakotosamimanana N., Lapierre S.G., Raharimanga V., Raherison M.S., Knoblauch A.M., Raherinandrasana A.H., Rakotoson A., Rakotonirina J., Rasolofo V. // *BMC Infect. Dis.* 2019. V. 19. P. 542.
<https://doi.org/10.1186/s12879-019-4198-6>
27. World Health Organization, 2016. The Use of Loop-Mediated Isothermal Amplification (TB-LAMP) for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis. Geneva: World Health Organization, 2016.
<https://apps.who.int/iris/handle/10665/249154>
28. Gray C.M., Katamba A., Narang P., Giraldo J., Zamudio C., Joloba M., Narang R., Paramasivan C.N., Hillemann D., Nabeta P., Amisano D., Alland D., Cobelens F., Boehme C.C. // *J. Clin. Microbiol.* 2016. V. 54. P. 1984–1991.
<https://doi.org/10.1128/JCM.03036-15>
29. García-Basteiro A.L., DiNardo A., Saavedra B., Silva D.R., Palmero D., Gegia M., Migliori G.B., Duarte R., Mambugue E., Centis R., Cuevas L.E., Izco S., Theron G. // *Pulmonology*. 2018. V. 24. P. 73–85.
<https://doi.org/10.1016/j.rppnen.2017.12.002>
30. Neonakis I.K., Spandidos D.A., Petinaki E. // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2011. V. 30. P. 937–942.
<https://doi.org/10.1007/s10096-011-1195-0>
31. Yuan L., Li Y., Wang M., Ke Z., Xu W. // *J. Infect. Chemother.* 2014. V. 20. P. 86–92.
<https://doi.org/10.1016/j.jiac.2013.07.003>
32. Nagai K., Horita N., Yamamoto M., Tsukahara T., Nagakura H., Tashiro K., Shibata Y., Watanabe H., Nakashima K., Ushio R., Ikeda M., Narita A., Kanai A., Sato T., Kaneko T. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 39090.
<https://doi.org/10.1038/srep39090>
33. Nliwasa M., MacPherson P., Chisala P., Kamdolozi M., Khundi M., Kaswaswa K., Mwapasa M., Msefula C., Sohn H., Flach C., Corbett E.L. // *PLoS One*. 2016. V. 11. P. e0155101.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155101>
34. Yu G., Shen Y., Zhong F., Ye B., Yang J., Chen G. // *PLoS One*. 2018. V. 13. P. e0199290.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199290>
35. Lok K.H., Benjamin W.H., Kimerling M.E., Pruitt V., Lathan M., Razeq J., Hooper N., Cronin W., Dunlap N.E. // *Emerg. Infect. Dis.* 2002. V. 8. P. 1310–1313.
<https://doi.org/10.3201/eid0811.020291>
36. Thierry D., Brisson-Noël A., Vincent-Lévy-Frébault V., Nguyen S., Guesdon J.L., Gicquel B. // *J. Clin. Microbiol.* 1990. V. 28. P. 2668–2673.
<https://doi.org/10.1128/jcm.28.12.2668-2673.1990>
37. Kechin A., Ostorbin I., Cherednichenko A., Khrapov E., Schwartz Y., Stavitskaya N., Filipenko M. // *Arch. Microbiol.* 2023. V. 205. P. 71.
<https://doi.org/10.1007/s00203-023-03410-5>
38. Alonso H., Samper S., Martín C., Otal I. // *BMC Genomics*. 2013. V. 14. P. 422.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-422>
39. Zhou L., Ma C., Xiao T., Li M., Liu H., Zhao X., Wan K., Wang R. // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. P. 1–10.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01887>
40. Goig G.A., Torres-Puente M., Mariner-Llicer C., Villamayor L.M., Chiner-Oms Á., Gil-Brusola A., Borrás R., Comas Espadas I. // *Bioinformatics*. 2019. V. 36. P. 985–989.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz729>

41. Shirshikov F. V., Pekov Y.A., Miroshnikov K.A. // PeerJ. 2019. V. 7. P. e6801.
<https://doi.org/10.7717/peerj.6801>
42. Abramovitch R.B., Rohde K.H., Hsu F.-F., Russell D.G. // Mol. Microbiol. 2011. V. 80. P. 678–694.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07601.x>
43. Gupta A. // FEMS Microbiol. Lett. 2009. V. 290. P. 45–53.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01400.x>
44. Morero M., Ramirez M.R., Oyhenart J. // Vet. Parasitol. 2021. V. 295. P. 109462.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109462>
45. Shoushtari M., Salehi-Vaziri M., Roohvand F., Arashkia A., Jalali T., Azadmanesh K. // Biotechnol. Lett. 2021. V. 43. P. 2149–2160.
<https://doi.org/10.1007/s10529-021-03175-1>
46. Wang Y., Li J., Li S., Zhu X., Wang X., Huang J., Yang X., Tai J. // Microchim. Acta. 2021. V. 188. P. 347.
<https://doi.org/10.1007/s00604-021-04985-w>
47. Schneider L., Blakely H., Tripathi A. // Electrophoresis. 2019. V. 40. P. 2706–2717.
<https://doi.org/10.1002/elps.201900167>
48. Bio-Rad Laboratories Inc., 2006. Real-Time PCR Applications Guide. Bulletin 5279. P. 4–6.
https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf
49. Ruijter J.M., Barnewell R.J., Marsh I.B., Szentirmay A.N., Quinn J.C., van Houdt R., Gunst Q.D., van den Hoff M.J.B. // Clin. Chem. 2021. V. 67. P. 829–842.
<https://doi.org/10.1093/clinchem/hvab052>
50. von Hippel P.H., Johnson N.P., Marcus A.H. // Biopolymers. 2013. V. 99. P. 923–954.
<https://doi.org/10.1002/bip.22347>
51. Cousins D.V., Bastida R., Cataldi A., Quse V., Redrobe S., Dow S., Duignan P., Murray A., Dupont C., Ahmed N., Collins D.M., Butler W.R., Dawson D., Rodríguez D., Loureiro J., Romano M.I., Alito A., Zumarraga M., Bernardelli A. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2003. V. 53. P. 1305–1314.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.02401-0>
52. Alexander K.A., Laver P.N., Michel A.L., Williams M., van Helden P.D., Warren R.M., Gey van Pittius N.C. // Emerg. Infect. Dis. 2010. V. 16. P. 1296–1299.
<https://doi.org/10.3201/eid1608.100314>
53. Esteban J., Muñoz-Egea M.C. // Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections / Ed. David Schlossberg. Washington, DC: ASM Press, 2017. P. 754.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TNMI7-0021-2016>
54. Ngabonziza J.C.S., Loiseau C., Marceau M., Jouet A., Menardo F., Tzfadia O., Antoine R., Niyigenga E.B., Mulders W., Fissette K., Diels M., Gaudin C., Duthoy S., Ssengooba W., André E., Kaswa M.K., Habimana Y.M., Brites D., Affolabi D., Mazarati J.B., de Jong B.C., Rigouts L., Gagneux S., Meehan C.J., Supply P. // Nat. Commun. 2020. V. 11. P. 2917.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-16626-6>
55. Panda A., Drancourt M., Tuller T., Pontarotti P. // Sci. Rep. 2018. V. 8. P. 14817.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-33261-w>
56. Eldholm V., Balloux F. // Trends Microbiol. 2016. V. 24. P. 637–648.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.007>
57. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. // J. Mol. Biol. 1990. V. 215. P. 403–410.
[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
58. Szklarczyk D., Gable A.L., Lyon D., Junge A., Wyder S., Huerta-Cepas J., Simonovic M., Doncheva N.T., Morris J.H., Bork P., Jensen L.J., von Mering C. // Nucleic Acids Res. 2019. V. 47. P. D607–D613.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>
59. Chitale P., Lemenze A.D., Fogarty E.C., Shah A., Grady C., Odom-Mabey A.R., Johnson W.E., Yang J.H., Eren A.M., Brosch R., Kumar P., Alland D. // Nat. Commun. 2022. V. 13. P. 7068.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-34853-x>
60. Lu J., Johnston A., Berichon P., Ru K., Korbie D., Trau M. // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 41328.
<https://doi.org/10.1038/srep41328>
61. Dwight Z., Palais R., Wittwer C.T. // Bioinformatics. 2011. V. 27. P. 1019–1020.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr065>
62. Zuker M. // Nucleic Acids Res. 2003. V. 31. P. 3406–3415.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>
63. Kerpedjiev P., Hammer S., Hofacker I.L. // Bioinformatics. 2015. V. 31. P. 3377–3379.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv372>
64. Popena M., Szachniuk M., Antczak M., Purzycka K.J., Lukasiak P., Bartol N., Blazewicz J., Adamiak R.W. // Nucleic Acids Res. 2012. V. 40. P. e112.
<https://doi.org/10.1093/nar/gks339>
65. Sehnal D., Bittrich S., Deshpande M., Svobodová R., Berka K., Bazgier V., Velankar S., Burley S.K., Koča J., Rose A.S. // Nucleic Acids Res. 2021. V. 49. P. W431–W437.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkab314>
66. Shitikov E.A., Bespyatykh J.A., Ischenko D.S., Alexeev D.G., Karpova I.Y., Kostyukova E.S., Isaeva Y.D., Nosova E.Y., Mokrousov I.V., Vyazovaya A.A., Narvskaya O.V., Vishnevsky B.I., Otten T.F., Zhuravlev V.I., Yablonsky P.K., Ilina E.N., Govorun V.M. // PLoS One. 2014. V. 9. P. e84971.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084971>
67. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. // Clin. Chem. 2009. V. 55. P. 611–622.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>

TB-ISATEST: a Diagnostic LAMP Assay for Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis*

F. V. Shirshikov*, **, # and J. A. Bespyatykh*, **

Phone: +7 (906) 114-70-00; e-mail: shrshkv@ya.ru

*Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, ul. Malaya Pirogovskaya 1A, Moscow, 119435 Russia

**Mendeleev University of Chemical Technology, Miusskaya pl. 9, Moscow, 125047 Russia

Consumption, white plague, tuberculosis... Only relatively recently, this disease has ceased to be an absolutely death sentence for infected people, but problems of the spread and diagnosis of the disease are still relevant. This paper presents results of the development of a new loop isothermal amplification (LAMP) assay, named TB-ISATEST, which targeting the species-specific gene *rv2341* for the differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* from non-tuberculosis mycobacteria. The assay is applicable for quantitative analysis of genomic DNA and allows detecting tenfold difference in concentration. The results of amplification optimization using a unique two-stage protocol based on the method of orthogonal Taguchi matrices are presented for the first time. A theoretical interpretation of the high amplification efficiency values observed in the LAMP reaction is proposed. Limit of detection of the developed assay is 40 copies of genomic DNA per reaction and amplification requires 15 min. In terms of the combination of characteristics, the TB-ISATEST assay surpasses all the known ways for identifying *M. tuberculosis* by the LAMP method.

Keywords: isothermal amplification, mycobacteria, tuberculosis, *rv2341*



УДК 577.2:577.113.4

БИОЧИП С ЯЧЕЙКАМИ ИЗ ЩЕТОЧНЫХ ПОЛИМЕРОВ С РЕАКТИВНЫМИ КАРБОКСИЛЬНЫМИ ГРУППАМИ ДЛЯ АНАЛИЗА ДНК

© 2023 г. Р. А. Мифтахов*, А. Ю. Иконникова*, В. А. Василисков*, С. А. Лапа*,
А. И. Левашова*, В. Е. Кузнецова*, В. Е. Шершов*, А. С. Заседателев*,
Т. В. Наседкина*, А. В. Чудинов*.*

*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 32

Поступила в редакцию 09.12.2022 г.

После доработки 14.12.2022 г.

Принята к публикации 15.12.2022 г.

Разработан способ изготовления биочипов методом фотолитографии с гидрогелевыми ячейками из щеточных сополимеров на основе акриловой кислоты и акриламида, закрепленными одним концом на поверхности полимерной подложки. Гидрогелевые ячейки с реактивными карбоксильными группами использовали для ковалентной иммобилизации олигонуклеотидных зондов. Особенности ячеек из щеточных полимеров — высокая емкость ковалентной иммобилизации олигонуклеотидных зондов и быстрая кинетика гибридизации с комплементарными ДНК-мишенями. Эффективность биочипов продемонстрирована в гибридизационном анализе с ДНК-мишенями различной длины, представляющими собой участок последовательности 7-го экзона гена *ABO* человека.

Ключевые слова: биочипы, щеточные полимеры, иммобилизация олигонуклеотидов, гибридизационный анализ ДНК

DOI: 10.31857/S0132342323050044, EDN: ARRVXQ

ВВЕДЕНИЕ

При анализе микроколичеств биологически активных веществ широко используют подход, в котором один из компонентов — зонд — ковалентно иммобилизован на твердом носителе. В методе биочипов набор ДНК-зондов иммобилизован в ячейках чипа по заранее заданным координатам, что позволяет проводить одновременно анализ проб ДНК по связыванию с иммобилизованными ДНК-зондами [1, 2]. Метод биочипов, как многопараметрический анализ микроколичеств ДНК, стал мощным инструментом в биомедицинских исследованиях [3, 4].

Чувствительность и специфичность анализа зависят от концентрации зондов, иммобилизованных в ячейках чипа, сохранности их свойств и пространственной доступности для взаимодействия с анализируемой ДНК. Достижение эффективных параметров иммобилизации зондов — ключевая задача анализа методом биочипов [5].

При непосредственной ковалентной иммобилизации молекулярных зондов на поверхности носителя твердая поверхность затрудняет взаимодействие молекулярной мишени с зондом. Ранее для иммобилизации олигонуклеотидных зондов на поверхности носителя мы предложили использовать терморасщепляемые линкеры [6].

Для создания расстояния между зондами и поверхностью используют различные линкеры [7, 8]. Получаемые планарные (двумерные) ячейки имеют ограниченную концентрацию зондов, приходящуюся на единицу поверхности подложки, что ограничивает чувствительность метода. Иммобилизация зондов в трехмерной сетке гидрогелей позволяет увеличить их концентрацию в ячейке в ~100 раз. Но трехмерная сетка — сильное кинетическое препятствие в сравнении с планарной иммобилизацией. Для достижения равновесия в связывании анализируемой пробы и иммобилизованного зонда для трехмерных гидрогелевых чипов требуется больше времени, чем для планарных чипов [9].

Альтернативой гидрогелевым ячейкам с трехмерной перекрестно-сшитой сеткой выступают гидрогелевые полимерные ячейки со щеточными полимерами. У щеточных полимеров полимерные цепи закреплены на подложке одним концом и не связаны между собой. Один из способов по-

Сокращения: EDC — этилдиметиламиноэтилкарбодиимид; MES — 2-(*N*-морфолино)этансульфоновая кислота; ПЭТ — полиэтилентерефталат; сульфо-NHS — сульфооксисукцинимид; ЦОС — циклоолефиновый сополимер.

* Автор для связи (тел.: + 7 (499) 135-98-00; эл. почта: chud@eimb.ru).

норборненовые группы находятся на твердой поверхности и удерживаются на ней, то полимеризация идет от поверхности. Фотоиндуцированная полимеризация от поверхности происходит только в зоне УФ-облучения и регулируется химическими и физическими факторами, поэтому она используется для прививки функциональных полимеров по определенной схеме, задаваемой шаблоном фотомаски, что нами и демонстрируется в этой работе на примере получения олигонуклеотидных биочипов с ячейками из щеточных полимеров и их апробации в гибридизационном анализе продуктов ПЦР различной длины.

Для получения фотоактивного полимерного покрытия на поверхности ПЭТ-подложки использовали растворы поли(этилен-со-пропилен-со-5-метил-2-норборнена) в *n*-пара-ксилоле. На поверхность ПЭТ-пленки размером 25 × 75 мм, закрепленной на роторе центрифуги, наносили раствор полимера, затем включали центрифугу. При вращении лишний раствор сбрасывался, на поверхности оставался тонкий слой раствора полимера (spin coating). Варьируя концентрацию полимера, скорость и время вращения, можно регулировать толщину раствора, остающегося на поверхности пленки. Концентрированные вязкие растворы полимера затрудняют получение равномерного покрытия. Низкокипящие растворители быстро высыхают, что также затрудняет получение равномерного покрытия. Равномерная сушка при комнатной температуре с последующим прогревом приводит к прочной адгезии полимерного покрытия на поверхности ПЭТ-пленки. Покрытие не стирается пальцами, не растворяется и не отслаивается в ацетоне и в кипящей воде.

Для получения ячеек методом фотолитографии использовали изготовленный держатель, который позиционирует шаблон ячеек фотомаски по определенным координатам подложки. Ячейки на подложке, в свою очередь, позиционированы к полю зрения портативного флуоресцентного анализатора, который используется для регистрации флуоресцентных сигналов в ячейках биочипа. На поверхность ПЭТ-подложки при вращении наносили тонкий слой раствора фотоинициатора бензофенона в метилэтилкетоне и высушивали. Наличие фотоинициатора на поверхности подложки увеличивает эффективность фотоиндуцированной радикальной полимеризации от поверхности. Фотоинициатор, находящийся в растворе мономеров, способствует разветвлению полимеров, связанных с поверхностью, и образованию полимеров, не связанных с поверхностью, что приводит к запутыванию полимерных цепей. Полимеры, образующиеся в значительном количестве в слое раствора между подложкой и фотомаской, экранируют УФ-облучение поверхности, усложняют отмывку полимеров, связанных с поверхностью, от полимеров, не связанных с поверхностью. Мы использова-

ли слой раствора мономеров толщиной 12 мкм. С увеличением толщины слоя раствора мономеров над подложкой эффективность получения ячеек снижается. Методом фотоиндуцированной радикальной полимеризации обычно получают слои щеточных полимеров толщиной 20–100 мкм. Полимерные цепи регулярного строения, полученные из мономеров одного типа, акриловой кислоты, склонны к межцепочечному взаимодействию типа “конденсации”, что затрудняет иммобилизацию молекулярных зондов и препятствует диффузии молекулярных компонентов анализируемых проб. Полимерные цепи, получаемые из смеси мономеров, имеют нерегулярное строение и менее склонны к межцепочечному взаимодействию.

Для получения щеточных полимеров использовали смесь мономеров — акриловой кислоты и акриламида. Мы исследовали влияние различных концентраций акриловой кислоты и акриламида, чтобы обеспечить функциональность, гидрофильность и высокую емкость для иммобилизации ДНК-зондов (табл. 1). Звенья акриловой кислоты (АА) использовали для ковалентной иммобилизации олигонуклеотидных зондов по карбоксильным группам, тогда как звенья акриламида (ААм) вводили для отдаления доступных сайтов иммобилизации друг от друга и увеличения специфичности узнавания ДНК-зондами ДНК-мишеней. Олигонуклеотиды с С6-аминомодификацией на 5'-конце связывали амидной связью с карбоксильными группами, находящимися на щеточных полимерных цепях. Карбоксильные группы предварительно активировали реакцией с EDC/сульфо-NHS (рис. 2).

Доступность иммобилизованных ДНК-зондов первоначально оценивали по гибридизации с синтетической ДНК-мишенью длиной 19 нт, маркированной флуоресцентной меткой Су5 (табл. 1). Подбор концентрации и соотношения мономеров акриловой кислоты и акриламида позволил получить гибридизационные сигналы в диапазоне 3000–12000 у.е. с сигналами фона 1200 у.е. и дискриминационным отношением 1.2–5.9 для зондов с однонуклеотидной заменой (табл. 1). Гибридизационные сигналы на канале Су5 были выше для зондов без красителя Су3 (данные не представлены). Наличие флуоресцентной метки на зонде отражается на конфигурационной подвижности иммобилизованного ДНК-зонда и снижает эффективность гибридизации с синтетической мишенью. Максимальные значения дискриминационного отношения при выявлении однонуклеотидной замены на ДНК-зондах наблюдались у ячеек с полимерными щетками, полученными из смеси акрилатов с суммарной концентрацией 0.6 М и соотношением концентраций акриловой кислоты к акриламиду, равным 1 : 5.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности ДНК-зондов, иммобилизованных в щеточных ячейках биочипа, и синтетической ДНК-мишени

№	Нуклеотидные последовательности	
	ДНК-зондов	синтетической ДНК-мишени
270	5'-NH ₂ -CTGACTCCGCTGTTCG-Cy3-3'	5'-CGAACAGCGGAGTCAGGAT-Cy5-3'
271	5'-NH ₂ -CTGACTCCACTGTTCGG-Cy3-3'	
53	5'-NH ₂ -CTGACTCCGCTGTTCG-3'	
54	5'-NH ₂ -CTGACTCCACTGTTCGG-3'	
824	5'-NH ₂ -Sp-CTGACTCCGCTGTTCG-Cy3-3'	
825	5'-NH ₂ -Sp-CTGACTCCACTGTTCGG-Cy3-3'	
264	5'-NH ₂ -Sp-CTGACTCCGCTGTTCG-3'	
265	5'-NH ₂ -Sp-CTGACTCCACTGTTCGG-3'	

Примечание: подчеркнуты переменные нуклеотиды.

Оценка концентрации ДНК-зондов в ячейках чипа, доступных для взаимодействия с ДНК-мишенями. Оценивали концентрацию ДНК-зондов в щеточных ячейках биочипа, доступных для взаимодействия с ДНК-мишенью. На ячейки чипа с активированными карбоксильными группами наносили растворы зонда № 53 (табл. 1) с концентрацией 0.125, 0.25, 0.5, 1 и 2 нмоль/мкл. Затем проводили гибридизацию с раствором синтетической ДНК-мишени, маркированной красителем Cy5, с предельно высокой концентрацией 5 пмоль/мкл, достаточной для исчерпывающей гибридизации

зондов с мишенью. После инкубации и отмывки регистрировали сигналы на канале Cy5 на выдержке 100 мс. Гибридизационная картина представлена на рис. 2. По интенсивности сигналов на канале Cy5 вычислили концентрации связавшейся ДНК-мишени с зондами в ячейках. Значительное увеличение интенсивности сигналов наблюдали для ячеек, в которые наносили раствор зондов с концентрациями до 1 нмоль/мкл, далее интенсивность сигналов увеличивалась незначительно.

По концентрации связавшихся ДНК-зондов вычислили концентрации ДНК-зондов в ячейках чипа, доступных для взаимодействия с ДНК-мишенями. Она составила 14.23 пмоль/см².

Оценка кинетики гибридизации иммобилизованных ДНК-зондов с комплементарными ДНК-мишенями. Оценивали кинетику гибридизации иммобилизованных ДНК-зондов с комплементарными ДНК-мишенями различной длины. ДНК-мишени соответствовали участку последовательности 7-го экзона гена *ABO* человека (GenBank: NM_020469.3). На чипах с ДНК-зондами (табл. 1), иммобилизованными в ячейках со щеточными полимерами, проводили гибридизацию с синтетической ДНК-мишенью длиной 19 нт (табл. 1) и с мишенями длиной 124, 295 и 576 нт, которые получали методом асимметричной ПЦР с праймерами, представленными в табл. 2, и геномной ДНК человека. С увеличением длины ДНК-мишеней до 576 нт время, необходимое для комплементарной гибридизации, увеличивается незначительно (данные не приведены). На рис. 3 представлены флуоресцентные картины чипов, полученные для продуктов ПЦР длиной 576 нт при разных временах гибридизации. Из данных, приведенных на рис. 3, следует, что значимые гибридизационные сигналы на канале Cy5 наблюдали уже через 30 мин гибридизации, при этом можно выявлять однонуклеотидные замены в зондах.

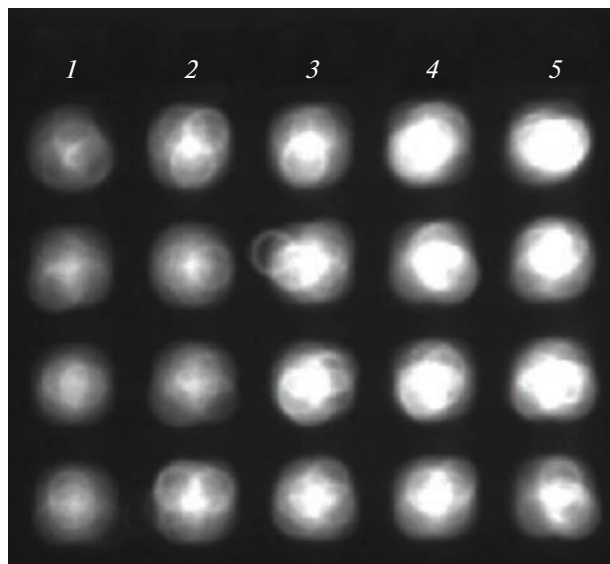
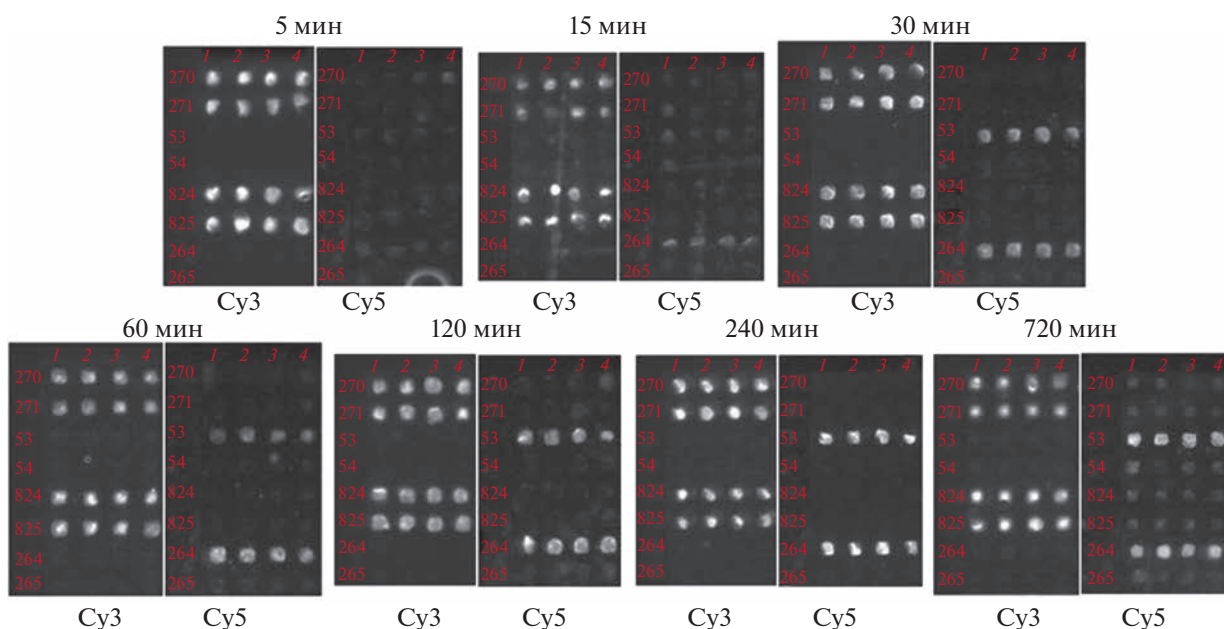


Рис. 2. Флуоресцентная картина чипа на канале Cy5, полученная после гибридизации синтетической ДНК-мишени длиной 19 нт, маркированной красителем Cy5, с ячейками, в которые наносили раствор зонда № 53 с концентрацией 0.125 нмоль/мкл (1), 0.25 нмоль/мкл (2), 0.5 нмоль/мкл (3), 1 нмоль/мкл (4) и 2 нмоль/мкл (5) при выдержке 100 мс.

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности праймеров

Нуклеотидные последовательности		Длина продукта ПЦР, нт
прямых праймеров	обратных праймеров	
5'-CCGGCGCTCGTAGGTGAA-3'	5'-GTGCGTGGACGTGGACATG-3'	124
	5'-Cy5-NH ₂ -GTGCGTGGACGTGGACATG-3'	
5'-GTAGTAGAAATCGCCCTCGTCCT-3'	5'-TCGGCAGCTGTCAGTGCTG-3'	295
	5'-Cy5-NH ₂ -TCGGCAGCTGTCAGTGCTG-3'	
5'-AGAGCACCTTGGTGGGTTTGT-3'	5'-CTTTCCTGAAGCTGTTCTTGAGAGA-3'	576
	5'-Cy5-NH ₂ -CTTTCCTGAAGCTGTTCTTGAGAGA-3'	
5'-GAGTTTACCCGTTCTGCTAAAACCAAG-3'	5'-AGGACTCGCTCAGGACAGG-3	922


 Рис. 3. Флуоресцентные картины чипов, полученные для продуктов ПЦР длиной 576 нт (участок последовательности 7-го экзона гена *ABO* человека), на каналах Cy3 и Cy5 при разных временах гибридизации и выдержке 100 мс.

Распределение флуоресцентных сигналов по площади микроячеек. В настоящее время не удалось добиться равномерного распределения сигналов по площади ячеек. Возможные причины могут заключаться в гетерогенном распределении фотоинициатора бензофенона на поверхности ПЭТ-подложки с полимерным покрытием. Проводятся дальнейшие исследования для решения данной проблемы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Подготовка поверхности ПЭТ-подложки. Использовали подложки из пленочного полиэтилентерфталата (ПЭТ) толщиной 125 мкм (ГОСТ 24234-80, плотность 1.39 г/см³, молекулярная масса 20–40 кДа) и размером 25 × 75 мм. Для удаления возможных загрязнений с поверх-

ности подложки промывали 2%-ным раствором моющего средства (Roth Ultrasonol 7 Neutral, Art. No. 5356.1) в дистиллированной воде в ультразвуковой бане (Elmasonic S 30, Elma, Германия) в течение 10 мин, промывали струей деионизированной воды, далее обрабатывали ацетоном в ультразвуковой бане в течение 30 мин и высушивали при 60°C в течение 1 ч на открытом воздухе.

Фотохимическая модификация поверхности ПЭТ-подложки. Подложки покрывали 1%-ным раствором поли(этилен-со-пропилен-со-5-метил-2-норборненом) (Aldrich, США) в *пара*-ксилоле при вращении 2400 об/мин в течение 2 мин (spin coating), сушили на открытом воздухе в течение 16 ч, закрепляли полимерное покрытие прогревом при 100°C в сушильном шкафу (СНОЛ-3, ТермИКС, Россия) в течение 1 ч. Для покрытия

поверхности подложки раствором полимера при вращении использовали установку на основе мини-центрифуги FV-2400 (BioSan, Латвия) с изготовленным дисковым ротором, снабженным зажимами для подложек, который вращается в закрытом кожухе. Слой ЦОС прочно держится на поверхности ПЭТ, не отслаивается в условиях термоциклической ПЦР. Затем подложки покрывали 0.1 М раствором бензофенона в метилэтилкетоне при вращении 2400 об/мин в течение 2 мин, сушили на открытом воздухе в течение 1 ч.

Подложки закрепляли в держателе, наносили раствор акриловой кислоты и акриламида известной концентрации в деионизированной воде, покрывали фотомаской из кварцевого стекла с ячейками 100×100 мкм с шагом 300 мкм. Высоту слоя раствора мономеров устанавливали спейсерами толщиной 12 мкм, проложенными между подложкой и фотомаской. Держатель изготовлен из алюминия, он позволяет фиксировать и закреплять фотомаску относительно ПЭТ-подложки. Облучали УФ-светом с помощью осветителя люминесцентного ОИ-18А с кварцевой ртутной лампой сверхвысокого давления ДРК-120 в течение 5 мин. Расстояние от осветителя до фотомаски составляло 2 см. После окончания реакции подложки промывали ацетоном, затем прогревали с деионизированной водой при 95°C в течение 12 ч при встряхивании для удаления мономеров и полимеров, не связанных с подложкой. Под микроскопом ($10\text{--}300\times$, Levenhuk Discovery Artisan 32, Россия) в отраженном свете на гидрофобной поверхности подложки видны гидрофильные ячейки, соответствующие шаблону фотомаски. Поверхность подложки вне шаблона фотомаски остается неизменной. Отмытые подложки с ячейками из щеточных полимеров сушили в вакуум-эксикаторе (Медлабстекло, Россия) над P_2O_5 в течение 16 ч при 25°C .

Активация карбоксильных групп в щеточных ячейках. Над ячейками на подложке формировали разборную камеру объемом 30 мкл. В камеру вносили 30 мкл 0.02 М раствора этилдиметиламиноэтилкарбодиимида (EDC) и 0.01 М раствора сульфоксисукцинимиды (сульфо-NHS) в 0.01 М буферном растворе (2-(*N*-морфолино)этансульфоновая кислота (MES), pH 5.0) при 4°C , затем инкубировали при комнатной температуре в течение 6 ч. После окончания реакции подложки промывали MES-буфером (pH 5.0), капли жидкости с поверхности удаляли струей воздуха, затем подложки сушили в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 в течение 16 ч при 25°C .

ДНК-зонды. ДНК-зонды (табл. 1), синтетическую ДНК-мишень (табл. 1) и праймеры (табл. 2) синтезировали по стандартной фосфитамидной технологии с последующей очисткой ВЭЖХ. Зонды № 824, 825, 264, 265 содержали на 5'-конце

дополнительный гексаэтиленгликолевый спейсер C-18 (Sp) (Glen Research, США).

Иммобилизация ДНК-зондов в щеточных ячейках. Растворы ДНК-зондов с C6-аминомодификатором на 5'-конце с концентрацией 1 нмоль/мкл в 0.1 М карбонатном буфере (pH 9.0), содержащем 10% формамида, наносили иглой робота-манипулятора (QArray, Genetix, Великобритания) диаметром 100 мкм в щеточные ячейки по заданной раскладке чипа. Затем подложки инкубировали в герметичной камере с повышенной влажностью в течение 12 ч при 4°C и дополнительно 4 ч при 25°C . После окончания реакции подложки многократно промывали 50%-ным ацетонитрилом в 0.05 М триэтиламмонийгидрокарбонатном (TEANC) буфере (pH 8.0) и деионизированной водой. Затем подложки выдерживали в 0.1 М растворе этаноламина в течение 1 ч при комнатной температуре для блокирования остаточных активных карбоксильных групп, многократно промывали деионизированной водой, капли жидкости с поверхности удаляли струей воздуха, сушили при комнатной температуре в течение 4 ч. Хранили в закрытых полимерных контейнерах при 4°C .

ДНК-мишени. Геномную ДНК выделяли из образцов венозной крови, собранной в пробирки с ЭДТА с помощью набора LumiPure Genomic DNA Blood and Buccal Kit (Lumiprobe RUS Ltd., Россия), концентрацию образцов оценивали с помощью спектрофотометра Nanodrop ND-1000 и флуориметра Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, США).

Анализируемые модельные фрагменты ДНК соответствуют участку последовательности 7-го экзона гена *ABO* человека (GenBank: NM_020469.3), который детерминирует серологический фенотип группы крови АВО. Последовательность синтетической ДНК-мишени приведена в табл. 1. Продукты ПЦР получали асимметричной гнездовой ПЦР с праймерами, приведенными в табл. 2. На первом этапе в симметричной ПЦР с геномной ДНК нарабатывали продукты длиной 295 и 922 нт, далее их использовали в качестве матрицы для второго этапа ПЦР: 295 нт — для амплификации продуктов 124 и 295 нт, 922 нт — для амплификации продуктов 576 нт. Во втором раунде использовали обратные праймеры с флуоресцентной меткой на 5'-конце (Cy5) в соотношении 1 : 10 с прямыми праймерами для наработки преимущественно одноцепочечного продукта (табл. 2).

Реакцию ПЦР проводили на ДНК-амплификаторе T-100 (Bio-Rad, США) с использованием Hot Start Taq ДНК-полимеразы (СибЭнзим, Россия), состав реакционной смеси (25 мкл): $1 \times$ ПЦР-буфер (СибЭнзим, Россия), 2 мкл 50 мМ MgCl_2 , dNTP в концентрации 200 мкМ каждого, праймеры (5—50 пмоль), 2.5 ед. полимеразы и геномная ДНК

человека в количестве 10 нг в качестве матрицы. Программа ПЦР: 94°C — 4 мин (начальная денатурация); (94°C — 30 с, 62°C — 30 с, 72°C — 60 с) × 35 циклов; далее 72°C — 5 мин (завершающая инкубация).

Гибридизация ДНК-мишени в щеточных ячейках. Над ячейками на подложке формировали разборную камеру объемом 30 мкл. В камеру вносили 30 мкл раствора, содержащего 1.5 пмоль синтетической ДНК-мишени или 15 мкл продуктов ПЦР, 5 мкл 6× SSPE-буфера, 7.5 мкл формамида. Инкубировали в закрытой камере чипа в термостате при 37°C в течение 12 ч. После завершения реакции камеру промывали 6× SSPE-буфером (6 × 30 мкл). Подачу и удаление рабочих растворов производили через отверстия в крышке разборной камеры. Затем камеру разбирали, капли жидкости с поверхности удаляли струей воздуха. Чипы хранили в закрытых полимерных контейнерах при 4°C.

Измерение флуоресцентных сигналов. Для измерения флуоресцентных сигналов использовали метод цифровой флуоресцентной микроскопии с регистрацией интенсивности флуоресценции (I_f) в свете флуоресценции красителя [15]. Флуоресцентные сигналы ячеек чипа регистрировали на портативном анализаторе (ООО “БИОЧИП-ИМБ”, Россия) с лазерным возбуждением при 650 нм и запирающим фильтром 716 ± 22 нм (Semrock, США; канал Су5), лазерным возбуждением при 532 нм и запирающим фильтром 580 ± 27 нм (Semrock, США; канал Су3), с цифровой ПЗС-камерой. Изображение анализировали с помощью программы ImaGeWare (ООО “БИОЧИП-ИМБ”, Россия) [16]. В спектральном диапазоне флуоресценции красителя Су5 полимерная подложка из ПЭТ-пленки практически не флуоресцирует и не влияет на регистрируемые сигналы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании были разработаны следующие методы:

1) метод изготовления биочипов для анализа последовательностей нуклеиновых кислот с высокой емкостью иммобилизации ДНК-зондов в ячейках чипа и быстрой кинетикой гибридизации длинных фрагментов ДНК;

2) метод ориентированной ковалентной иммобилизации олигонуклеотидных зондов в гидрогелевых ячейках из щеточных полимеров на поверхности полимерной подложки из пленочного полиэтилентерефталата;

3) метод получения гидрогелевых ячеек с реактивными карбоксильными группами из акриловых мономеров методом фотоиндуцированной радикальной полимеризации от поверхности

способом фотолитографии при УФ-облучении через фотомаску.

Продемонстрирована высокая эффективность определения однонуклеотидных полиморфизмов на чипах с ячейками из щеточных полимеров в гибридизационном анализе продуктов асимметричной ПЦР длиной до 576 нт, представляющих собой участок последовательности 7-го экзона гена *ABO* человека.

Разработанные методы могут быть использованы при разработке технологии параллельного множественного экспресс-микроанализа нуклеиновых кислот “лаборатория на чипе” для выявления соматических и инфекционных заболеваний человека.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-14-00287).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rubina A.Y., Pan'kov S.V., Dementieva E.I., Pen'kov D.N., Butygin A.V., Vasiliskov V.A., Chudinov A.V., Mikheikin A.L., Mikhailovich V.M., Mirzabekov A.D. // *Anal. Biochem.* 2004. V. 325. P. 92–106. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.10.010>
2. Gryadunov D., Dementieva E., Mikhailovich V., Nasedkina T., Rubina A., Savvateeva E., Fesenko E., Chudinov A., Zimenkov D., Kolchinsky A., Zasedatelev A. // *Exp. Rev. Mol. Diagn.* 2011. V. 11. P. 839–853. <https://doi.org/10.1586/ERM.11.73>
3. Naidu C.K., Suneetha Y. // *Trop. J. Pharm. Res.* 2012. V. 11. P. 153–164. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v11i1.20>
4. Beaudet A.L., Belmont J.W. // *Annu. Rev. Med.* 2008. V. 59. P. 113–129. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.59.012907.101800>
5. Brittain W.J., Brandstetter T., Prucker O., Rühle J. // *ACS Appl. Mat. Int.* 2019. V. 11. P. 39397–39409. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b06838>
6. Золотов А.М., Мифтахов Р.А., Иконникова А.Ю., Лапа С.А., Кузнецова В.Е., Василисков В.А., Шершов В.Е., Заседателев А.С., Наседкина Т.В., Чудинов А.В. // *Биоорг. химия.* 2022. Т. 48. С. 599–605. [Zolotov A.M., Miftakhov R.A., Ikonnikova A.Y., Lapa S.A., Kuznetsova V.E., Vasiliskov V.A., Shershov V.E., Zasedatelev A.S., Nasedkina T.V., Chudinov A.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2022. V. 48. P. 858–

- 863.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162022040203>
7. *Shchepinov M.S., Case-Green S.C., Southern E.M.* // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 1155–1161.
<https://doi.org/10.1093/nar/25.6.1155>
 8. *Halperin A., Buhot A., Zhulina E.B.* // *Langmuir.* 2006. V. 22. P. 11290–11304.
<https://doi.org/10.1021/la0616606>
 9. *Zubtsov D.A., Savvateeva E.N., Rubina A.Yu., Pan'kov S.V., Kononova E.V., Moiseeva O.V., Chechetkin V.R., Zasedatelev A.S.* // *Anal. Biochem.* 2007. V. 368. P. 205–213.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.04.040>
 10. *Rohr T., Ogletree D.F., Svec F., Fréchet L.M.J.* // *Adv. Funct. Mat.* 2003. V. 13. P. 264–270.
<https://doi.org/10.1002/adfm.200304229>
 11. *Ma H., Davis R.H., Bowman C.N.* // *Macromolecules.* 2000. V. 33. P. 331–335.
<https://doi.org/10.1021/ma990821s>
 12. *Barbey R., Lavanant L., Paripovic D., Schüwer N., Sugnaux C., Tugulu S., Klok H.-A.* // *Chem. Rev.* 2009. V. 109. P. 5437–5527.
<https://doi.org/10.1021/cr900045a>
 13. *Miftakhov R.A., Lapa S.A., Shershov V.E., Zasedateleva O.A., Guseinov T.O., Spitsyn M.A., Kuznetsova V.E., Mamaev D.D., Lysov Yu.P., Barsky V.E., Timofeev E.N., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V.* // *Biophysics.* 2018. V. 63. P. 512–518.
<https://doi.org/10.1134/S0006350918040127>
 14. *Jena R.K., Yue C.Y.* // *Biomicrofluidics.* 2012. V. 6. P. 012822.
<https://doi.org/10.1063/1.3682098>
 15. *Barsky V., Perov A., Tokalov S., Chudinov A., Kreindlin E., Sharonov A., Kotova E., Mirzabekov A.* // *J. Biomol. Screen.* 2002. V. 7. P. 247–257.
<https://doi.org/10.1177/108705710200700308>
 16. *Lysov Y., Barsky V., Urasov D., Urasov R., Cherepanov A., Mamaev D., Yegorov Y., Chudinov A., Surzhikov S., Rubina A., Smoldovskaya O., Zasedatelev A.* // *Biomed. Optics Express.* 2017. V. 8. P. 4798–4810.
<https://doi.org/10.1364/BOE.8.004798>

Biochip with Cells of Brush Polymers Carrying Carboxyl Groups for DNA Analysis

R. A. Miftakhov*, A. Yu. Ikonnikova*, V. A. Vasiliskov*, S. A. Lapa*, A. I. Levashova*, V. E. Kuznetsova*, V. E. Shershov*, A. S. Zasedatelev*, T. V. Nasedkina*, and A. V. Chudinov*, #

*Phone: +7 (499) 135-98-00; e-mail: chud@eimb.ru

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
 ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

A method for manufacturing biochips by photolithography with hydrogel cells made of brush copolymers based on acrylic acid and acrylamide, fixed at one end on the surface of a polymer substrate has been developed. Hydrogel cells with reactive carboxyl groups were used for covalent immobilization of oligonucleotide probes. The effectiveness of the method was demonstrated in the hybridization analysis of DNA by targets of different lengths of the sequence site 7 of the exon of the human *ABO* gene.

Keywords: *biochips, brush polymers, immobilization of oligonucleotides, DNA hybridization analysis*



УДК 577.151.35:577.113.4:577.2.08

СИНТЕЗ ФЛУОРЕСЦЕНТНО-МЕЧЕНЫХ НУКЛЕОТИДОВ ДЛЯ МАРКИРОВАНИЯ ПРОДУКТОВ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ

© 2023 г. В. Е. Шершов*, #, С. А. Лапа*, А. И. Левашова*, И. Ю. Шишкин*, Г. Ф. Штылев*,
Е. Ю. Шекалова*, В. А. Василисков*, А. С. Заседателев*, В. Е. Кузнецова*, А. В. Чудинов*

*ФГБУН “Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта” РАН,
Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 32

Поступила в редакцию 09.12.2022 г.

После доработки 13.12.2022 г.

Принята к публикации 15.12.2022 г.

Осуществлен синтез флуоресцентно-меченых нуклеотидов, содержащих цвиттерионный индоди-карбоцианиновый краситель, присоединенный через *транс*-алкеновый спейсер в положении С5 пиримидинового основания, и проверена их субстратная эффективность в условиях рекомбиназной полимеразной амплификации (RPA). В результате RPA образовались полноразмерные целевые продукты фрагмента гена *ebpS* возбудителя бактериальной пневмонии (*Staphylococcus aureus*) с высокой плотностью встраивания флуоресцентной метки.

Ключевые слова: флуоресцентно-меченые нуклеотиды, индодикарбоцианиновые красители, изотермическая амплификация, рекомбиназная полимеразная амплификация

DOI: 10.31857/S0132342323050056, EDN: BAKVTC

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы в практике клинических лабораторных исследований инфекционных заболеваний все больше внимания уделяется молекулярно-генетическим методам анализа [1–3]. Важным этапом развития микроанализа нуклеиновых кислот стала разработка систем, включающих все этапы проведения анализа в одном устройстве (“лаборатория на чипе”): выделение анализируемого генетического материала из образца и его амплификация методом ПЦР с одновременным флуоресцентным маркированием, гибридизационный анализ и цифровая регистрация полученных результатов, автоматически, без контакта с окружающей средой [4–6]. Развитие технологии “лаборатория на чипе” привело к появлению новых методов анализа, основанных на изотермической амплификации нуклеиновых кислот [7, 8]. Амплификация нуклеиновых кислот при одной оптимальной температуре значительно упрощает реализацию методов амплификации в медицин-

ских диагностических приборах и аналитическом оборудовании. При оптимально подобранных условиях изотермическая амплификация обеспечивает сопоставимую или даже более высокую чувствительность и специфичность по сравнению с традиционной ПЦР [9].

В настоящее время разработан ряд методов изотермической амплификации: метод катящегося кольца (RCA), петлевая изотермическая амплификация (LAMP), рекомбиназная полимеразная амплификация (RPA) и некоторые другие [10]. Во всех случаях такие системы используют комплекс ферментов либо определенные модификации, позволяющие обходиться без стадии плавления ДНК. Так же, как и в традиционной ПЦР, для маркирования фрагментов ДНК применяются флуоресцентно-меченые нуклеотиды.

Цель данной работы – синтез субстратов для ферментов изотермической амплификации в виде флуоресцентно-меченых пиримидиновых нуклеотидов, содержащих *транс*-алкеновый спейсер в положении С5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эффективность встраивания модифицированных нуклеотидов в условиях изотермической амплификации исследована на примере идентификации возбудителя бактериальной пневмонии

Сокращения: dATP – 2'-дезоксиаденозинтрифосфат; dCTP – 2'-дезокситидинтрифосфат; dGTP – 2'-дезоксигуанозинтрифосфат; dTTP – 2'-дезокситимидинтрифосфат; dUTP – 2'-дезоксйридинтрифосфат; fluor-dUTP – флуоресцентно-меченый 2'-дезоксйридин-5'-трифосфат; RPA – рекомбиназная полимеразная амплификация.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 135-98-00; эл. почта: shershov@list.ru).

(*Staphylococcus aureus*). В качестве субстратов синтезированы флуоресцентно-меченные dCTP и dUTP, маркированные электронейтральным цвиттерным индодикарбоцианиновым красителем [11], характеризующимся флуоресценцией в длинноволновой области спектра, повышенной растворимостью в воде, высокими значениями квантового выхода флуоресценции и молярного коэффициента экстинкции, повышенной фотостабильностью и хемотройкостью. C5-положение пиримидинового цикла наиболее оптимально подходит для модификации нуклеотидов, поскольку не ингибирует взаимодействие оснований А–Т [12]. Структура пиримидинового основания и строение присоединенного к нему маркера влияют на эффективность встраивания флуог-dNTP в зависимости от вида ДНК-полимеразы.

Флуоресцентно-меченный dCTP (VI) получали многостадийным синтезом из 5-иод-2'-дезоксцитидина (I), включающим в себя пять принципиальных стадий (схема 1). По литературным данным [13] известно, что N4-аминогруппа цитидина ингибирует реакцию Хека. В качестве защиты использовали диметилформамидиновую группу, которую вводили при помощи диметилацетата диметилформамида. Далее проводили реакцию конденсации цитидина (I) с *N*-аллил-2,2,2-трифторацетамидом (II), предварительно полученного реакцией трифторуксусного ангидрида с аллиламином, в присутствии трис(дибензилиденацетон)дипалладия(0) и тетрабутиламмонийхлорида в DMF. Важный этап, повышающий выход продукта (III), – удаление кислорода из реакционной массы. Диметилформамидиновую защитную группу селективно удаляли в кислых условиях, не затрагивая трифторацетильную группу.

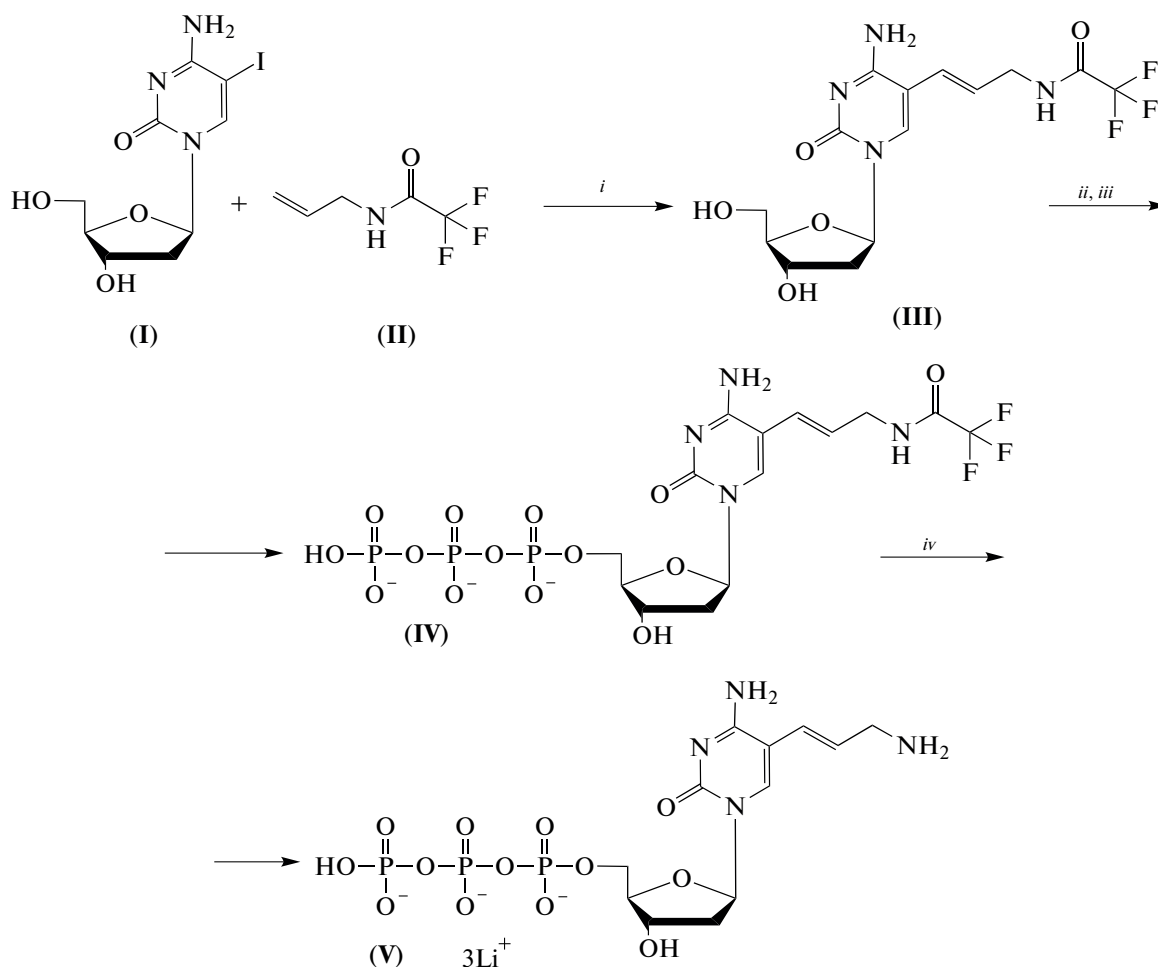


Схема 1. Синтез 5-аминоаллил-2'-дезоксцитидин-5'-трифосфата (V). Условия: *i* – DMF-DMA, Bu₄NCl, LiCl, LiOAc(H₂O)₂, AATFA, Pd₂(dba)₃, DMF, 55°C, 3 ч; *ii* – POCl₃, TMP, 4°C, 1 ч 40 мин; *iii* – пирофосфат трибутиламмония, DMF, Bu₃N, 20°C, 40 мин; *iv* – NH₃·H₂O (30%), 20°C, 1 ч.

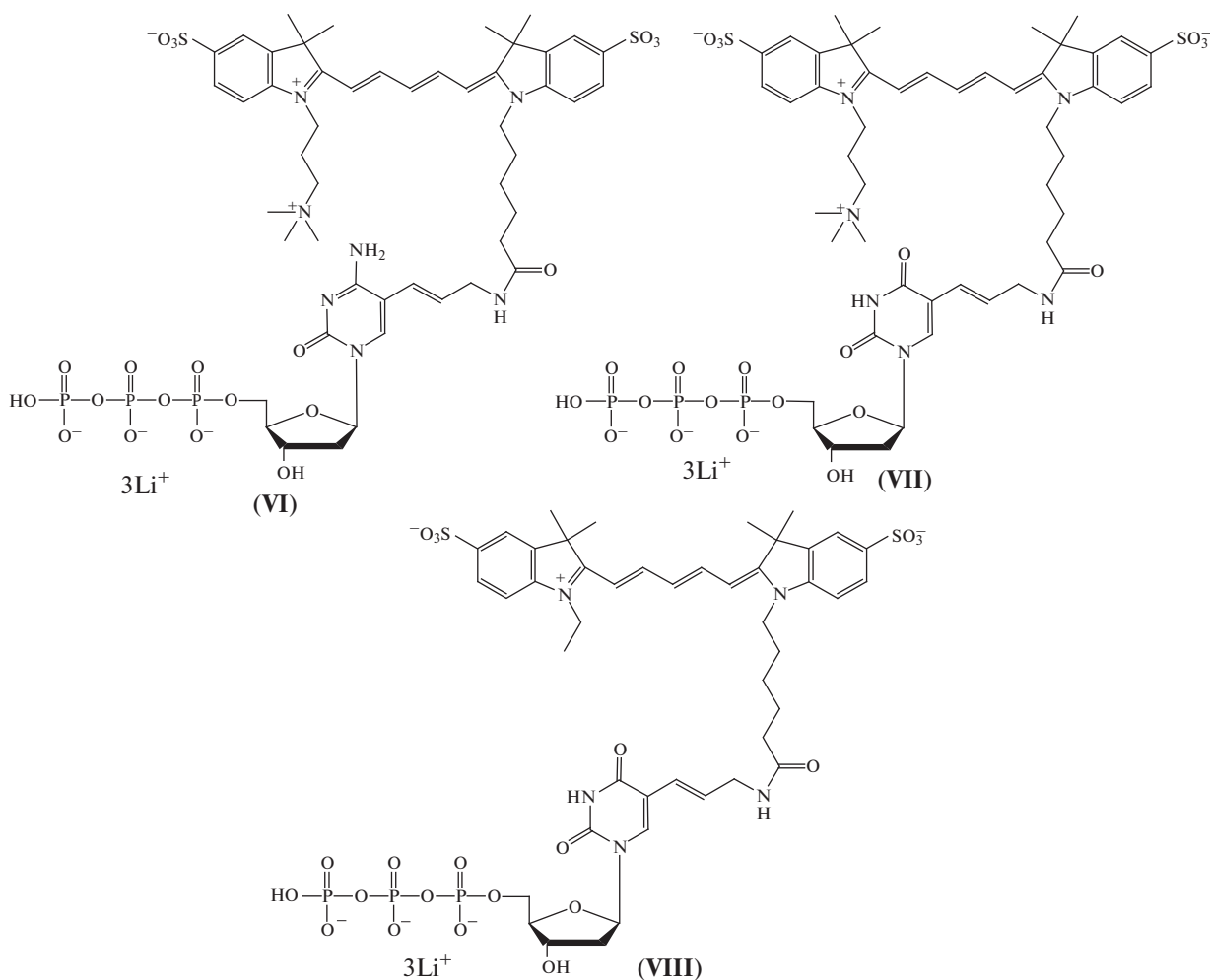


Рис. 1. Строение флуоресцентно-меченых пиримидиновых нуклеотидов (VI–VIII).

Трифосфат (IV) получали в две стадии. На первом этапе действием хлорокиси фосфора на нуклеозид (III) получали промежуточный хлорангидрид при использовании триметилфосфата в качестве растворителя. Согласно литературным данным [14], 5'-селективное фосфорилирование нуклеозидов при действии хлорокиси фосфора в триалкилфосфате проходит через образование комплекса нуклеозид–триалкилфосфат (триалкилфосфат взаимодействует с 5'-гидроксильной группой и с самым нуклеофильным атомом азота гетероциклического основания), что повышает региоселективность реакции. Далее образовавшийся хлорангидрид без выделения вводили в реакцию с тетрабутиламмонийпирофосфатом в DMF в присутствии трибутиламина с последующим снятием трифторацетильной защитной группы раствором аммиака.

Флуоресцентное маркирование AAdCTP (V) проводили при помощи предварительно полу-

ченного активированного производного индоди-карбоцианинового красителя [15]. Реакцией аминогруппы нуклеотида с *p*-нитрофениловым эфиром красителя в смеси в 0.1 M NaHCO_3 : Na_2CO_3 (pH 8.5) : DMF получали флуоресцентно-меченый цитидинтрифосфат (VI) с выходом ~65% (рис. 1).

Для проверки субстратной эффективности нуклеотидов (VI) и (VII), отличающихся строением пиримидинового основания, проводили изотермическую амплификацию в режиме реального времени, а также электрофоретический контроль продуктов реакции. Для оценки степени встраивания модифицированных нуклеотидов был выбран fluor-dUTP (VIII), показавший хорошие результаты для ферментативного маркирования ДНК в ходе ПЦР по сравнению с коммерчески доступным продуктом (Cy5-dUTP, PA55022; Amersham, США).

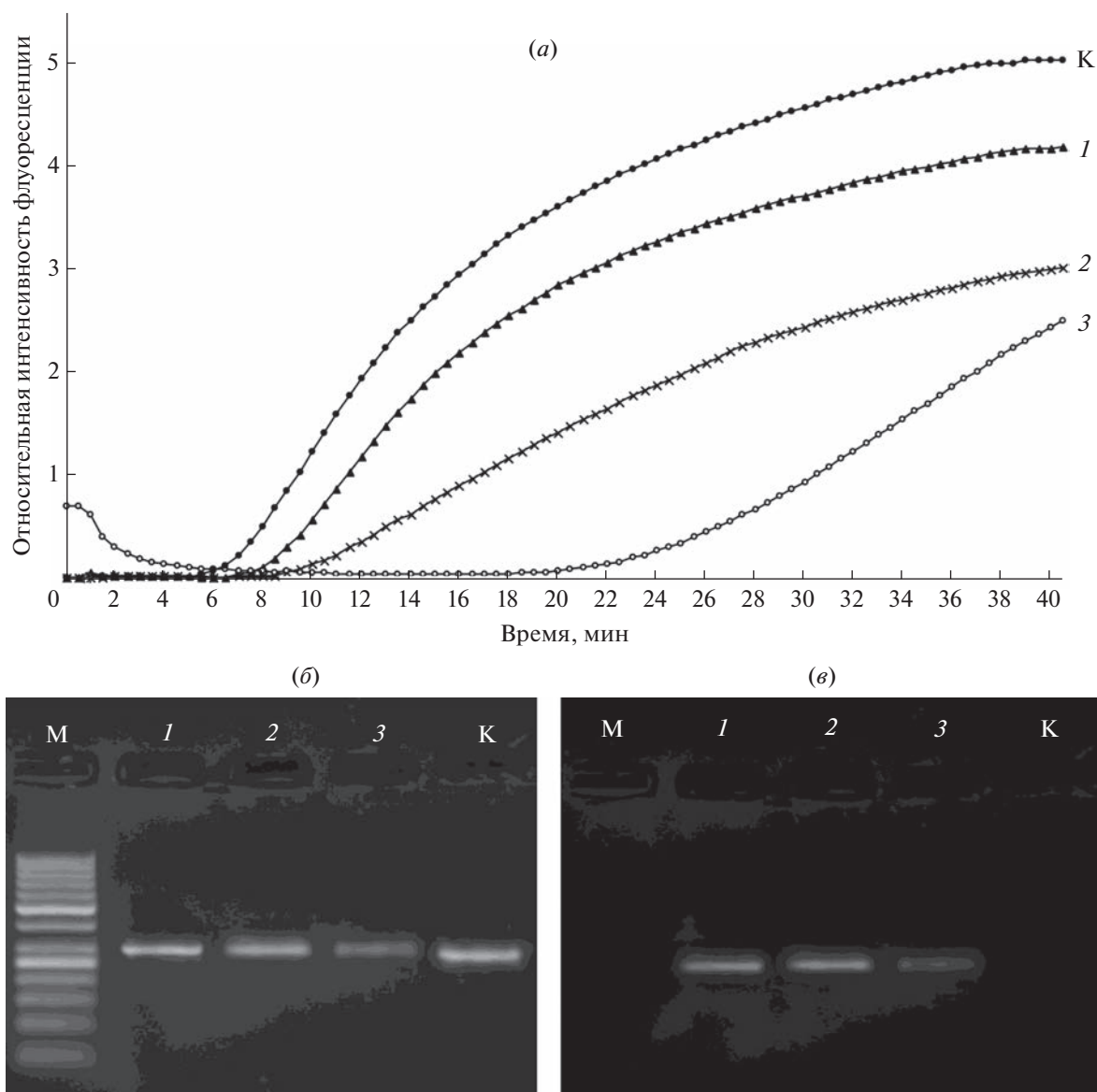


Рис. 2. Проверка субстратной эффективности флуоресцентно-меченых нуклеотидов (VI–VIII). (а) – RPA в режиме реального времени при концентрации fluor-dNTP, равной 8 мкМ; (б, е) – электрофореграммы, полученные в цифровом формате RAW с сохранением данных попиксельной интенсивности сигнала для измерения выхода полноразмерного продукта, 4%-ный агарозный гель, окрашивание с детекцией на длине волны SYBR Green (б) и Cy5 (е). Обозначения: М – маркер длин двухцепочечных ДНК GeneRuler 50 bp (Thermo Scientific, США), 1 – нуклеотид (VII), 2 – нуклеотид (VI), 3 – нуклеотид (VIII), К – природные dNTP.

Результаты RPA показали, что модифицированные нуклеотиды (VI) и (VII), содержащие цвиттерный краситель, характеризуются быстрой кинетикой ($\Delta t = 8$) по сравнению с fluor-dUTP (VIII) ($\Delta t = 22$), но обладают небольшим ингибирующим эффектом (сравнение с контрольным образцом, содержащим только природные dNTP) (рис. 2). Анализ электрофореграмм показал образование полноразмерных целевых продуктов (*Stafilococcus aureus*, фрагмент гена *ebpS*) и высокую плотность встраивания флуоресцентной метки (VI) и (VII) по сравнению с fluor-dUTP (VIII).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реагенты и растворители марок о.с.ч., х.ч. или ч.д.а. фирм Sigma-Aldrich (США), Thermo Fisher (США) и Химмед (Россия). Все реагенты, в том числе растворители, были свежеперегнанными и свежеприготовленными либо только что приобретенным новым товаром.

1 М триэтиламмоний-гидрокарбонатный буферный раствор (TEAB) готовили следующим образом: через смесь деионизированной воды (600 мл) и триэтиламина (139 мл, 1 моль) при охлаждении

на льду и интенсивном перемешивании пропускали углекислый газ до получения нужного значения pH 7.5–8.0.

Индивидуальность полученных соединений и ход реакции контролировали методом ТСХ на пластинках RP-18 (Merck, Германия). Колоночную хроматографию проводили на колонках с сорбентом LiChroprep RP-18 с размером частиц 0.025–0.040 мкм (Merck, Германия) и DE52 (Whatman, Великобритания). Подачу элюента на колонку при хроматографической очистке образцов осуществляли при помощи программируемого перистальтического насоса Econo Gradient Pump (Bio-Rad, США). Сигналы образцов регистрировали с использованием УФ-детектора Econo UV Monitor (Bio-Rad, США).

Микроколичества веществ взвешивали на аналитических весах CP225D (Sartorius, Германия). Интенсивное перемешивание реакционных масс при термостатировании в микропробирках проводили на термошейкере TS-100C (BioSan, Латвия). Обнаружение веществ на хроматограммах осуществляли в УФ-свете при длинах волн 254, 302 и 365 нм (модель UVLMS-38, Upland, США). Упаривание растворов проводили при пониженном давлении при температуре 35°C при помощи роторного испарителя Laborota 4000-Efficient (Heidolph, Германия). Для создания глубокого вакуума использовали вакуумный насос Welch ILMVAC 8917 (Applied Vacuum Technology, США).

Масс-спектры регистрировали на масс-спектрометре 4800 Plus MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems/MDS Sciex, США), реализующем технологию MALDI-TOF (временнóй пролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией).

^1H -, ^{19}F - и ^{31}P -ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре AMX-400 (400 МГц; Bruker, Германия) в растворах D_2O и $\text{DMSO}-d_6$. Химические сдвиги δ выражали в ppm (м.д.), константы спин-спинового взаимодействия (J) — в Гц. Мультиплетность сигналов: с — синглет, д — дублет, т — триплет, кв — квадруплет, м — мультиплет.

В работе использовали природные dNTP (СибЭнзим, Россия), набор TwistAmp (Cambridge TwistDx, Великобритания). Синтез олигонуклеотидов осуществлен компанией ООО “Люмипроб РУС”, Россия.

В работе использовали бокс антибактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами для проведения ПЦР-диагностики БАВ-ПЦР-“Ламинар-С” (ЗАО “Ламинарные системы”, Россия), полуавтоматические пипетки (Sartorius, Франция), амплификатор LabNet TC9610 (Labnet International Inc., США), центрифугу-вортекс Микроспин FV-2400 (Biosan, Латвия), высокоскоростную центрифугу для микропробирок Eppendorf 5420 (Eppendorf, Германия), ДНК-ампли-

фикатор IQ5 (Bio-Rad, США), циркуляционный жидкостной термостат с насосом MLW U8 (Венгрия), камеру для горизонтального электрофореза (Helicon, Россия), источник питания Эльф-8 (ДНК-Технология, Россия), трансиллюминатор TCP-26.LMX V1 365/312 нм (Vilber Lourmat, Франция), цифровой фотоаппарат D5100 (Nikon, Япония) с оптическим фильтром SYBR Photographic Filter S7569 (Molecular Probes, США). Определение концентрации олигонуклеотидов проводили с помощью спектрофотометра для микрообъемов Nano Drop 1000 (Thermo Scientific, США).

Индодикарбоцианиновый краситель и его активированное производное, флуоресцентно-меченый dUTP (VIII), (IX), синтезированы согласно опубликованным нами методикам [11, 16].

Пирофосфат трибутиламмония. Декагидрат пирофосфата натрия 2.2 г (5 ммоль) растворяли в минимальном количестве воды и наносили на колонку, заполненную ионообменной смолой DOWEX-50 в H^+ -форме, элюировали водой, собирали ~30 мл раствора пирофосфорной кислоты. В раствор кислоты добавляли $n\text{-Bu}_3\text{N}$ (10 ммоль, 1.5 мл) и перемешивали до однородного состояния. Раствор пирофосфата три- n -бутиламмония концентрировали упариванием в вакууме досуха. Добавляли расчетное количество DMF. Получали раствор с концентрацией 1.146 ммоль/г.

***N*-Аллил-2,2,2-трифторацетамид (II).** К аллиламину (60 мл, 800 ммоль), охлажденному до -5°C , при перемешивании добавляли по каплям трифторуксусный ангидрид (56 мл, 397 ммоль). Смесь дополнительно перемешивали в течение 1.5 ч при -5°C , а затем выдерживали при комнатной температуре 12 ч. Затем к смеси добавляли этилацетат (500 мл) и 0.1 М раствор бикарбоната натрия (500 мл). Органический слой промывали раствором 0.1 М бикарбоната натрия (2×500 мл) и водой (2×500 мл). Раствор фильтровали, концентрировали упариванием, а затем перегоняли в вакууме. Выход *N*-аллил-2,2,2-трифторацетамида составил 34 г (29%). ^1H -ЯМР (CDCl_3): 6.58 (с, 1H, NH), 5.86 (м, 1H, CH), 5.3 (м, 2H, CH_2), 4.0 (т, 2H, CH_2N). Найдено: m/z 153.04 $[M]^+$. $\text{C}_5\text{H}_6\text{F}_2\text{NO}$. Вычислено: $M = 153.23$. ^{19}F -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): -74.58 (с, F).

5-(3)-Трифторацетилаллиламин-2'-дезокситидин (III) [17]. 5-Иод-2'-дезокситидин (I) (400 мг, 1.13 ммоль), диметилфосфатдиметил-ацеталь (225 мкл, 1.7 ммоль), тетрабутиламоний-хлорид (315 мг, 1.13 ммоль), литий хлорид (48 мг, 1.13 ммоль), литий ацетат (217 мг, 2.83 ммоль) и *N*-аллил-2,2,2-трифторацетамид (II) (520 мг, 3.4 ммоль) растворяли в DMF (16 мл), дегазировали в вакууме, нагревали 1 ч при 55°C в атмосфере азота и добавляли растворенный в DMF (200 мкл) трис(дибензилиденацетон)дипалладий(0) (52 мг,

0.057 ммоль). Реакционную массу дополнительно перемешивали 1 ч при 55°C, затем приливали 1 М раствор соляной кислоты (6 мл) и далее нагревали еще 1 ч. По окончании нагревания к охлажденной до комнатной температуры реакционной смеси при перемешивании добавляли гидрокарбонат натрия (0.5 г, 6 ммоль) в воде (7 мл) и перемешивали 10 мин при комнатной температуре. Полученную суспензию фильтровали на фильтре Бюхнера со стекловолоконной мембраной (Whatman, GF/B, Великобритания). Осветленный раствор дополнительно фильтровали через активированный целит. Продукт реакции выделяли обращенно-фазовой хроматографией на колонке RP-18, используя для детекции вещества UV-детектор (280 нм), подключенный к самописцу. Элюировали в 0.05 М ТЕАВ с линейным градиентом концентрации CH_3CN от 0 до 50%. Растворитель удаляли в вакууме, остаток высушивали в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 . Получили 270 мг (62%) продукта (III). ^1H -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): 9.53 (с, 1H, NH), 8.09 (с, 1H, C(6)H), 7.16 (уш.с., 2H, NH_2), 6.41 (д, 1H, C(3')OH), 6.15 (т, 1H, C(1')H), 5.90 (м, 1H, C(2)H), 5.18 (д, 1H, C(1)H), 5.04 (т, 1H, C(5')OH), 4.22 (м, 1H, C(3')H), 3.91 (д, 2H, C(3)H₂), 3.81 (м, 1H, C(4')H), 3.60 (м, 2H, C(5')H₂), 2.04 (м, 2H, C(2')H₂). ^{19}F -ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$): -74.22 (с, P). Найдено: m/z 378.31 $[M]^+$. $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_5$. Вычислено: $M = 377.23$.

5-Аллиламин-2'-дезокситидин-5'-трифосфат (V). К охлажденному до 0°C раствору 5-(3)-трифторацетилалиламин-2'-дезокситидина (III) (41 мг, 0.1 ммоль) в триметилфосфате (1.1 мл) при перемешивании добавляли предварительно охлажденный до 5°C раствор POCl_3 (100 мкл, 1 ммоль) в триметилфосфате (170 мкл). Реакционную массу перемешивали 1 ч 40 мин при 4°C, затем охлаждали до -10°C, добавляли раствор пиррофосфата трибутиламония в DMF (1.2 мл, 0.7 ммоль, 0.65 М), Bu_3N (200 мкл) и дополнительно перемешивали при комнатной температуре 40 мин. Продукт реакции осаждали 2%-ным раствором LiClO_4 в ацетоне. Полученный осадок промывали ацетоном и высушивали в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 . Полученный осадок разбавляли в 50 мл воды и очищали методом колоночной адсорбционной обращенно-фазовой хроматографии на колонке с сорбентом RP-18 в 0.05 М ТЕАВ с линейным градиентом концентрации CH_3CN от 0 до 30%, с УФ-контролем на длине волны 254 нм. После очистки растворитель удаляли в вакууме.

К высушенному 5-аминоаллилтрифторацетил-2'-дезокситидин-5'-трифосфату (IV) добавляли $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (30%, 1 мл) и перемешивали 1 ч при комнатной температуре, затем растворитель удаляли в вакууме. Полученный осадок растворяли в воде и очищали ионообменной хрома-

тографией на колонке с DEAE-целлюлозой в 30%-ном CH_3CN с линейным градиентом концентрации ТЕАВ от 0 до 0.5 М с УФ-контролем при длине волны 254 нм. Фракцию целевого соединения концентрировали в вакууме до твердого состояния, твердый остаток высушивали в вакууме до постоянного веса, затем растворяли в минимальном количестве деионизированной воды и осаждали 2%-ным раствором перхлората лития в ацетоне. Выход 5-аминоаллил-2'-дезокситидин-5'-трифосфата (V) составил 11 мг (20%). $\lambda_{\text{abs}}(\text{H}_2\text{O}) = 290$ нм. ^1H -ЯМР (D_2O): 8.26 (с, 1H, C(6)H), 6.60 (д, J 16.0, 1H, C(1)H), 6.47 (м, 1H, C(2)H), 6.30 (т, J 6.4, 1H, C(1')H), 4.61 (м, 1H, C(4')H), 4.2 (м, 3H, C(3')H, C(5')H₂), 3.73 (д, J 6.4, 2H, C(3)H₂), 2.39 (м, 2H, C(2')H₂). ^{31}P -ЯМР (D_2O): -21.97 (βP , т), -10.57 (αP , д), -8.63 (γP , д). Найдено: m/z 490.04 $[M]^+$ $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_{11}\text{P}_3$. Вычислено: $M = 488.99$.

Трилитиевая соль 5-[4-аза-5-оксо-10-(1'-(3-триметиламмоний)пропил)-3,3,3',3'-тетраметил-5,5'-дисульфоиндодикарбоцианин-1-ил]-дек-1-ен-1-ил]-2'-дезокситидин-5'-трифосфата (VI). К замороженному раствору AAdCTP (V) (8 мг, 0.014 ммоль), DMAP (1.8 мг, 0.014 ммоль) и DIPEA (2.5 мкл, 0.014 ммоль) в 0.1 М $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ (800 мкл) добавляли охлажденный до -18°C раствор *n*-нитрофенилового эфира *N*-(5-карбоксипентил)-3,3,3',3'-тетраметил-*N'*-(3-триметиламмонийпропил)-5,5'-дисульфоиндодикарбоцианинового красителя (42 мг, 0.06 ммоль) в DMSO (1.2 мл) и перемешивали 8 ч при 10°C. По окончании перемешивания в реакционную массу добавляли 2%-ный раствор LiClO_4 в ацетоне (3 мл). Смесь центрифугировали, осадок промывали ацетоном, растворяли в 0.1 М ТЕАВ (3 мл) и очищали в три этапа.

На первом этапе проводили очистку методом колоночной адсорбционной обращенно-фазовой хроматографии на колонке с сорбентом RP-18 в 0.02 М ТЕАВ с линейным градиентом концентрации CH_3CN от 5 до 30%, затем ионообменной хроматографией на колонке с DEAE-целлюлозой в 30%-ном CH_3CN с линейным градиентом концентрации ТЕАВ от 0.05 до 0.5 М. На третьем этапе на колонке с сорбентом RP-18 последовательно элюировали 0.1 М EDTA, затем 0.1 М LiClO_4 , H_2O и $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (1 : 9).

Фракцию целевого вещества концентрировали в вакууме до твердого состояния, твердый остаток высушивали в вакууме до постоянного веса, затем растворяли в минимальном количестве деионизированной воды и осаждали 2%-ным раствором перхлората лития в ацетоне. Выход 9.4 мг (51%). ^1H -ЯМР (D_2O): 7.65 (м, 2H, краситель β, β' -CH), 7.42, 7.03, 6.86 (м, д, д, 7H, C(6)H, краситель ArH), 6.24 (т, 1H, краситель γ -CH, J 12.0), 6.05 (д, J 16.0, 1H, краситель

C(1)H), 5.80 (м, 3H, краситель C(2)H, C(1')H, краситель α -CH), 5.63 (м, 1H, краситель α' -CH), 4.25 (м, 1H, C(4')H), 3.80 (уш.м., 7H, C(3')H, C(5')H₂, CH₂CH₂CH₂N(CH₃)₃, краситель C(6)H₂), 3.42 (м, 2H, краситель C(3)H₂), 3.11 (м, 2H, CH₂CH₂CH₂N(CH₃)₃), 2.73 (с, 9H, CH₂CH₂CH₂N(CH₃)₃), 1.88 (м, 8H, C(2')H₂, CH₂CH₂CH₂N(CH₃)₃, краситель C(7)H₂, C(10)H₂), 1.65 (с, 12H, краситель CH₃(3,3), CH₃(3,3')), 1.47, 0.98 (2м, 4H, краситель C(8)H₂, C(9)H₂). ³¹P-ЯМР (D₂O): -21.08 (т, ^βP), -11.70 (д, ^αP), -5.53 (д, ^γP). Найдено: *m/z* 1231.5 [*M*]⁻. C₄₉H₆₄N₇O₂₀P₃S₂⁴⁻. Вычислено: *M* = 1228.12.

Определение эффективности амплификации с помощью RPA в режиме реального времени. Для определения кинетики амплификации по накоплению флуоресцентного сигнала EvaGreen для каждого флуоресцентно-меченого нуклеозидтрифосфата проводили RPA в режиме реального времени на приборе iQ5 (Bio-Rad, США). В качестве матрицы использовали очищенную геномную ДНК штамма *Staphylococcus aureus* MW2 (ATCC BAA-1707, MRSA). Праймеры к фрагменту гена *ebpS* *S. aureus*: прямой *ebpS*-f1-35 5'-CCAAATATC-GCTAATGCACCGATAATTAGTACAGC-3' и обратный *ebpS*-r1-35 5'-ACTCGACTGAGGATA-AAGCGTCTCAAGATAAGTCT-3'. Для проведения RPA использовали набор TwistAmp (Cambridge TwistDx, Великобритания) согласно рекомендациям производителя. Реакционная смесь содержала 200 мкМ каждого из природных dNTP, а также один из флуоресцентно-меченых нуклеозидтрифосфатов (VI–VIII) в концентрации 8 мкМ для определения кинетики и выхода продукта амплификации. Суммарную концентрацию каждого нуклеозидтрифосфата (VI–VIII) и природного dNTP доводили до 200 мкМ с помощью 2 мМ раствора соответствующего природного dNTP. RPA проводили в течение 40 мин при 40°C.

Полученные ПЦР-продукты разделяли в 4%-ном агарозном геле, выход реакции оценивали по оптической плотности полос в дорожках геля, соответствующих полноразмерному продукту. Визуализацию проводили с помощью системы геледокументации ChemiScope 6200 Touch (Clinx Science Instruments Co., КНР).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированы флуоресцентно-меченые нуклеотиды, содержащие цвиттерионный индодикарбоцианиновый краситель, присоединенный через *транс*-алкеновый линкер в положении C5 пиримидинового основания. Изучена их субстратная эффективность в условиях рекомбинантной полимеразной амплификации, в результате проведения которой образовались полноразмерные целевые продукты фрагмента гена *ebpS*

возбудителя бактериальной пневмонии (*Staphylococcus aureus*) с высокой плотностью встраивания флуоресцентной метки. Использование флуоресцентно-меченого цитидинтрифосфата может позволить эффективно проводить ферментативное ДНК-маркирование последовательностей, содержащих GC-богатые участки.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00257).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Donatin E., Drancourt M. // Med. Mal. Infect. 2012. V. 42. P. 453–459. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2012.07.017>
2. Erdmann V.A., Jurga S., Barciszewski J. // RNA DNA Diagnostics. 2015. P. 259–280. https://doi.org/10.1007/978-3-319-17305-4_13
3. Huang H.-J., Campana R., Akinfenwa O., Curin M., Sarzsinszky E., Karsonova A., Riabova K., Karaulov A., Niespodziana K., Elisyutina O., Fedenko E., Litovkina A., Smolnikov E., Khaitov M., Vrtala S., Schleder T., Valenta R. // Front. Immunol. V. 11. P. 594978. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.594978>
4. Erickson D., O'Dell D., Jiang L., Oncescu V., Gumus A., Lee S., Mancuso M., Mehta S. // Lab. Chip. 2014. V. 14. P. 3159–3164. <https://doi.org/10.1039/C4LC00142G>
5. Temiz Y., Lovchik R.D., Kaigala G.V., Delamarche E. // Microelectronic Engineering. 2015. V. 132. P. 156–175. <https://doi.org/10.1016/j.mee.2014.10.013>
6. Allert R.D., Bruckmaier F., Neuling N.R., Freire-Moschovitis F.A., Liu K.S., Schrepel C., Schätzle P., Knittel P., Hermans M., Bucher D.B. // Lab. Chip. 2022. V. 22. P. 4831–4840. <https://doi.org/10.1039/D2LC00874B>
7. Zhao Y., Chen F., Li Q., Wang L., Fan C. // Chem. Rev. 2015. V. 115. P. 12491–12545. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00428>
8. Oliveira B.B., Veigas B., Baptista P.V. // Front. Sens. 2021. V. 2. P. 752600. <https://doi.org/10.3389/fsens.2021.752600>
9. Li J., Macdonald J. // Biosens. Bioelectron. 2015. V. 64. P. 196–211. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.08.069>
10. Deng H., Gao Z. // Anal. Chim. Acta. 2015. V. 853. P. 30–45. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.09.037>

11. Spitsyn M.A., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Emelyanova M.A., Guseinov T.O., Lapa S.A., Nasedkina T.V., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. // *Dyes Pigments*. 2017. V. 147. P. 199–210.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.07.052>
12. Tesler J.K., Cruickshank A.L., Morrison E., Netzel T.L. // *J. Am. Chem. Soc.* 1989. V. 111. P. 6966–6976.
<https://doi.org/10.1021/ja00200a011>
13. Gandhi V.V., Samuels D.C. // *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids*. 2011. V. 30. P. 317–339.
<https://doi.org/10.1080/15257770.2011.586955>
14. Ikemoto T., Haze A., Hatano H., Kitamoto Y., Ishida M., Nara K. // *Chem. Pharm. Bull.* 1995. V. 43 P. 210–215.
<https://doi.org/10.1248/cpb.43.210>
15. Спицын М.А., Кузнецова В.Е., Шершов В.Е., Лапа С.А., Гусейнов Т.О., Заседателев А.С., Чудинов А.В. // *Биоорг. химия*. 2017. Т. 43. С. 444–448. [Spitsyn M.A., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Lapa S.A., Guseinov T.O., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2017. V. 43. P. 471–475.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162017040136>
16. Zasedateleva O.A., Vasiliskov V.A., Surzhikov S.A., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Guseinov T.O., Smirnov I.P., Yurasov R.A., Spitsyn M.A., Chudinov A.V. // *Nucleic Acids Res.* 2018. V. 46. P. e73.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky247>
17. Reddington M.V., Cunningham-Bryant D. // *Tetrahedron Lett.* 2011. V. 52. P. 181–183.
<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2010.10.137>

Synthesis of Fluorescent-Labeled Nucleotides for Labeling of Isothermal Amplification Products

V. E. Shershov^{*,#}, S. A. Lapa^{*}, A. I. Levashova^{*}, I. Yu. Shishkin^{*}, G. F. Shtylev^{*}, E. Yu. Shekalova^{*},
V. A. Vasiliskov^{*}, A. S. Zasedatelev^{*}, V. E. Kuznetsova^{*}, and A. V. Chudinov^{*}

[#]Phone: +7 (495) 135-98-00; e-mail: shershov@list.ru

^{*}Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

The synthesis of fluorescently labeled nucleotides containing a zwitterionic indodicarbocyanine dye attached via a *trans*-alkene spacer at the C5 position of the pyrimidine base was carried out, and their substrate efficiency was tested under conditions of recombinase polymerase amplification (RPA). As a result of RPA, the formation of full-sized target products of the *ebpS* gene fragment of the causative agent of bacterial pneumonia (*Staphylococcus aureus*) and a high density of fluorescent label embedding occurred.

Keywords: fluorescently labeled nucleotides, indodicarbocyanine dyes, isothermal amplification, recombinase polymerase reaction



УДК 577.113.3

СИНТЕЗ И ОЦЕНКА ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ 5-ГАЛОГЕН-2'-АЗИДОПРОИЗВОДНЫХ ЦИТИДИНА И N-ГИДРОКСИЦИТИДИНА НА ПАНЕЛИ РНК-ВИРУСОВ, ВКЛЮЧАЯ SARS-CoV-2¹

© 2023 г. П. Н. Камзеева*, Е. С. Колпакова**, Е. В. Карпова**, М. О. Бородулина**, ***,
Е. В. Яковчук**, ***, В. А. Алферова*, А. А. Чистов*, Е. С. Беляев****,
Л. И. Козловская**, ***, А. В. Аралов*, #

*ФГБУН "Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова" РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

**Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН
(Институт полиомиелита), Россия, 108819 Москва, поселение Московский,
поселок Института полиомиелита, домовл. 8, корп. 1

***Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский университет), Россия, 119991 Москва, ул. Большая Пироговская, 2/4

****Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН,
Россия, 119071 Москва, ул. Ленинский просп., 31/4

Поступила в редакцию 20.02.2023 г.

После доработки 27.02.2023 г.

Принята к публикации 28.02.2023 г.

Коронавирусная инфекция 2019 г. (COVID-19) — новая глобальная пандемия с высокими заболеваемостью и смертностью, вызванная распространением коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2). Производные N-гидроксицитидина выглядят перспективными для борьбы с COVID-19 и другими вирусными заболеваниями, в частности молниеподобный недавно был одобрен для экстренной профилактики на ранних стадиях после инфицирования SARS-CoV-2. В работе предложена схема синтеза 5-галоген-2'-азидоамещенных производных цитидина и N-гидроксицитидина. Синтезированные соединения протестированы на панели из шести РНК-содержащих вирусов, включая SARS-CoV-2, энтеровирусы, CHIKV и ВИЧ-1. Ряд соединений способен ингибировать размножение вирусов SARS-CoV-2 и CHIKV в микромолярном диапазоне без заметной цитотоксичности для клеток. Структуры лидерных соединений могут быть использованы в качестве отправной точки для дальнейшего дизайна противовирусных агентов.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, противовирусные агенты, нуклеозидные аналоги, N-гидроксицитидин

DOI: 10.31857/S0132342323060064, **EDN:** PMYJGZ

ВВЕДЕНИЕ

Коронавирусная пандемия создала угрозу для здоровья и жизни людей, а также экономики по всему миру. Коронавирусная инфекция COVID-19, впервые выявленная в конце 2019 г. в Ухане (провинция Хубэй, Китай), привела к продолжающейся пандемии 2019–2023 гг. COVID-19 вызывает

вирус SARS-CoV-2. Общие симптомы заболевания включают лихорадку, сухой кашель, потерю обоняния и одышку, а также ряд осложнений, таких как пневмония, бронхит, вирусный сепсис, диарея и острый респираторный дистресс-синдром [1, 2]. SARS-CoV-2 — седьмой коронавирус человека после 229E, NL63, OC43, HKU1, MERS-CoV и

¹ Дополнительные материалы к этой статье доступны по doi 10.31857/S0132342323060064 для авторизованных пользователей.

Сокращения: CAN — нитрат аммония-церия(IV); CC₅₀ — цитотоксическая концентрация, необходимая для снижения флуоресцентного сигнала на 50%; CCID₅₀ — разведение вируса, вызывающее ЦПЭ в 50% клеток; CHIKV — вирус Чикунгунья; COVID — коронавирусная инфекция 2019 г.; EC₅₀ — эффективная концентрация, необходимая для снижения образования признаков вирус-индуцированной гибели клеток на 50%; EV — энтеровирус; EV-A71 — энтеровирус A71; E30 — экховирус 30; FDA — Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств; PV1 — полиовирус 1-го типа; RdRp — РНК-зависимая РНК-полимераза; SARS-CoV-2 — коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2; ВИЧ-1 — вирус иммунодефицита человека 1.

Автор для связи: (тел.: +7 (926) 606-29-10; эл. почта: Baruh238@mail.ru).

SARS-CoV. Как и все коронавирусы, SARS-CoV-2 представляет собой оболочечный одноцепочечный РНК-содержащий вирус с положительной цепью длиной ~30000 оснований. Основываясь на организации генома SARS-CoV-2, четыре фермента рассматриваются в качестве привлекательных терапевтических мишеней, включая протеазы PLpro (nsp3) и 3CLpro (nsp5), РНК-зависимую РНК-полимеразу RdRp (nsp12) и РНК-хеликазу (nsp13) [3]. RdRp катализирует синтез вирусной РНК и, таким образом, играет центральную роль в цикле репликации и транскрипции вируса.

Ремдесивир, монофосфорамидатное пролекарство С-аденозинового нуклеозидного аналога GS-441524 [4], был первым ингибитором RdRp, одобренным FDA для лечения пациентов, инфицированных SARS-CoV-2. Однако его влияние на частоту госпитализаций и смертность незначительно [5], а неудовлетворительные фармакокинетические свойства (в настоящее время одобрен для внутривенного введения) делают монотерапию ремдесивиром неэффективным вариантом для лечения людей, инфицированных SARS-CoV-2. Молнупиравир (EIDD-2801, пролекарственная форма — 5'-изобутириловый эфир *N*-гидроксицитидина) [4] был разрешен FDA для экстренного использования при лечении COVID-19 у некоторых взрослых, но, несмотря на его значительную активность *in vitro*, он проявляет заметную токсичность в некоторых клеточных системах, включая индукцию мутагенеза в клетках млекопитающих [6]. Кроме того, применение молнупиравира имеет множество ограничений, включая запрет на использование пациентами младше 18 лет (из-за его влияния на рост костей и хрящей) и беременными женщинами (из-за потенциального вреда для плода) [7].

Предполагается, что *N*-гидроксицитидин проявляет активность по отношению к РНК-содержащим вирусам по механизму летального мутагенеза с внесением транзиции С → U [8–10], но также обладает мутационной активностью по отношению к геному клеток млекопитающих из-за восстановления рибонуклеотидредуктазой 2'-гидроксильной группы рибозного кольца до атома водорода [6]. Для предотвращения подобного восстановления и, следовательно, снижения мутагенного потенциала *N*-гидроксицитидина для реципиента мы решили синтезировать производные *N*-гидроксицитидина, содержащие вместо 2'-гидроксильной группы изостерную ей азидную группу [11, 12], и оценить их противовирусную активность. Введение азидной группы в состав нуклеозидов позволяет инактивировать, например, рибонуклеотидифосфатредуктазу из *E. coli* [13]. С другой стороны, 5-хлор-2'-дезоксидитидин (5CldC) обладает мутагенными свойствами *in vitro* и *in vivo* и вызывает транзицию С → Т с частотами в диапазоне 3–9%

[14]. Поскольку от рибонуклеотидного аналога 5CldC можно ожидать транзицию С → U в РНК-контексте, аналогичную вызываемой *N*-гидроксицитидином, представляет интерес комбинация заместителей цитозина по положениям 5- (хлор и другие атомы галогена) и 4- (гидроксигруппа), которая может усилить мутагенный потенциал *N*-гидроксицитидина. С целью проверки данной гипотезы в настоящей работе предложена схема синтеза 5-галоген-2'-азидозамещенных производных цитидина и *N*-гидроксицитидина, проведена оценка цитотоксичности и противовирусной активности полученных соединений на панели РНК-содержащих вирусов, включая SARS-CoV-2, энтеровирусы (EV-A71, E30, PV1), CHIKV и ВИЧ-1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

2'-Азидо-2'-дезоксидитидин (I) и 3',5'-ди-*O*-ацетил-2'-азидо-2'-дезоксидитидин (II) были синтезированы по ранее описанному методу [15] (рис. 1). Галогенирование урацильного кольца по 5-му положению проводили согласно разработанным ранее методикам [16] кипячением в CH₃CN смеси соединения (II) и нитрата аммония-церия(IV) (CAN) в присутствии LiCl, LiBr или I₂ в качестве источника атома галогена, получили производные (III), (IV) и (V) соответственно. Следуя описанному ранее методу, проводили превращение соединения (II) в триазолильное производное с последующим одновременным формированием цитозинового кольца и удалением ацильных защитных групп обработкой водным аммиаком в 1,4-диоксане, получили соединение (VI) [17]. Используя аналогичную методику, впервые были получены производные (VII), (VIII) и (IX), замещенные по 5-му положению цитозинового кольца атомом хлора, брома или иода соответственно. Соединение (X) было ранее синтезировано замещением 2,4,6-триизопропилбензолсульфонильной группы гидросиламином [18]. Мы использовали недавно предложенный оптимизированный подход, основанный на прямом замещении аминогруппы цитозинового кольца остатком гидросиламина [19]. Так, водный раствор соединения (VI) обрабатывали сульфатом гидросиламина при 70°C в течение 1.5 ч с последующим выделением продукта препаративной ВЭЖХ. Аналогично были получены новые производные (XI), (XII) и (XIII). Описанные и новые соединения были охарактеризованы ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектрами (полученные спектры представлены в дополнительных материалах).

Для синтезированных соединений (III–XIII) была проведена оценка противовирусной активности *in vitro* относительно патогенных для человека РНК-содержащих вирусов с геномом положительной полярности: энтеровирусов разных видов, коронавируса, ассоциированного с тяже-

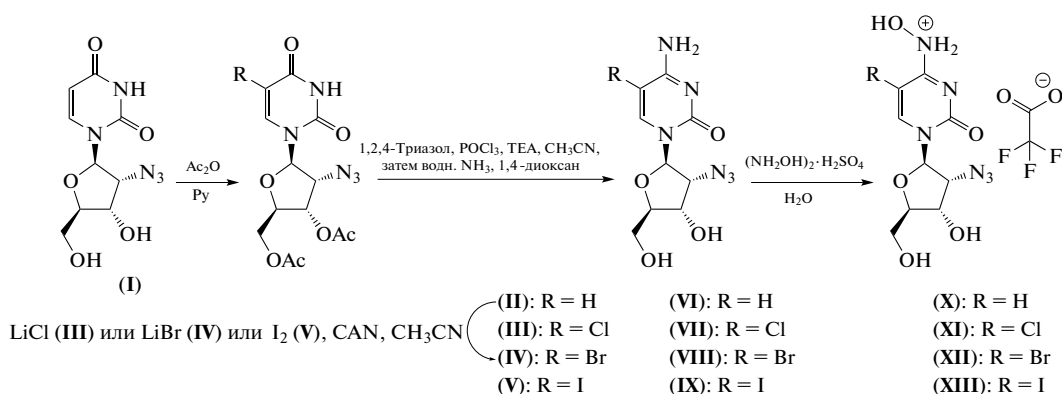


Рис. 1. Схема синтеза 5-галоген-2'-азидо-замещенных производных цитидина (VI–IX) и *N*-гидроксидитидина (X–XIII).

лым острым респираторным синдромом (SARS-CoV-2), вируса Чикунгунья (CHIKV) и вируса иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1) (табл. 1). Все соединения не проявляли заметной цитотоксичности на клетках Vero, RD и MT-4. Соединения не ингибировали репродукцию безоболочечных энтеровирусов и ВИЧ-1, но 5-бром-замещенное производное уридина (IV), производные (VII) и (VIII) из цитидиновой группы, а также производное (XIII) из *N*-гидроксидитидиновой группы показали активность против оболочечных вирусов SARS-CoV-2 и CHIKV в микромолярном диапазоне (85 ± 21 мкМ).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все реагенты получали от компаний Sigma-Aldrich (США) и Acros Organics (Бельгия) и использовали без дополнительной очистки. Безводные ацетонитрил и пиридин получали перегонкой над гидридом кальция.

ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре Avance III 600 (Bruker, Германия; 600 и 150 МГц для ¹H- и ¹³C-спектров соответственно) в DMSO-*d*₆ или CDCl₃. Для тонкослойной хроматографии (ТСХ) использовали пластинки TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия) с визуализацией пятен с помощью УФ-лампы при 254 нм. Для колоноч-

Таблица 1. Противовирусная активность и цитотоксичность синтезированных производных цитидина и *N*-гидроксидитидина

Соединение	Противовирусная активность, EC ₅₀ , мкМ				Цитотоксичность, CC ₅₀ , мкМ		
	энтеровирусы (EV-A71, E30, PV1)	SARS-CoV-2	CHIKV	ВИЧ-1	Vero	RD	MT-4
(III)	>100	>100	100	>50	>100	>100	>50
(IV)	>100	>100	85 ± 21	>50	>100	>100	>50
(V)	>100	>100	100	>50	>100	>100	>50
(VI)	>100	>100	>100	>50	>100	>100	>50
(VII)	>100	85 ± 21	85 ± 21	>50	>100	>100	>50
(VIII)	>100	>100	85 ± 21	>50	>100	>100	>50
(IX)	>100	>100	>100	>50	>100	>100	>50
(X)	>100	>100	>100	>50	>100	>100	>50
(XI)	>100	>100	>100	>50	>100	>100	>50
(XII)	>100	>100	>100	>50	>100	>100	>50
(XIII)	>100	>100	85 ± 21	>50	>100	>100	>50
Контроль	35–70*	5.3 ± 1.3*	9.8 ± 2.8*	0.0442**	>100	>100	>50

* *N*-гидроксидитидин [20].

** 3'-Азидо-3'-дезокситимидин [21, 22].

ной хроматографии применяли Silica gel 60 (0.040–0.063 мм; Merck, Германия).

Очистку соединений (X–XIII) проводили на препаративном хроматографе Puriflash 4250 (Intertechim, Франция) с использованием колонки VDSpher 100 C18-E 250 × 20 мм, 10 мкм (VDC optilab, Германия), элюенты – CH₃CN (с 0.1%-ной трифторуксусной кислотой) и 0.1%-ный водный раствор трифторуксусной кислоты.

Детектирование в УФ-видимой области проводили при 205 и 260 нм. Использовали линейный градиент от 5 до 60% органического растворителя в течение 15 мин, затем 95% CH₃CN в течение 4 мин при скорости потока 20 мл/мин.

Фракции, содержащие целевой продукт, собирали, растворитель удаляли в вакууме, остаток сушили при высоком вакууме, получая целевой продукт в виде белого твердого остатка.

2'-Азидо-2'-дезоксигуанидин (I). Соединение (I) было получено по описанной ранее методике [15]. ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆), δ, м.д., J, Гц: 11.41 (уш.с., 1H), 7.86 (д, J 8.1, 1H), 5.96 (д, J 5.5, 1H), 5.88 (д, J 5.5, 1H), 5.67 (дд, J 8.1, J 2.0, 1H), 5.18 (т, J 4.5, 1H), 4.34–4.26 (м, 1H), 4.07–4.01 (м, 1H), 3.92–3.86 (м, 1H), 3.70–3.61 (м, 1H), 3.61–3.52 (м, 1H). ¹³C-ЯМР (DMSO-*d*₆): 163.0, 150.4, 140.0, 102.0, 85.5, 85.2, 70.4, 64.5, 60.1.

3',5'-Ди-О-ацетил-2'-азидо-2'-дезоксигуанидин (II). Соединение (II) синтезировали согласно опубликованному способу [15]. ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆), δ, м.д., J, Гц: 9.15 (уш.с., 1H), 7.45 (д, J 8.1, 1H), 5.88 (д, J 4.6, 1H), 5.79 (д, J 8.1, 1H), 5.23–5.17 (м, 1H), 4.38–4.31 (м, 3H), 4.28 (дд, J 5.0, J 5.6, 1H), 2.19 (с, 3H), 2.13 (с, 3H). ¹³C-ЯМР (DMSO-*d*₆): 170.1, 170.0, 162.7, 149.9, 138.9, 103.1, 88.6, 79.7, 71.2, 63.8, 62.5, 20.7, 20.4.

5-Хлор-3',5'-ди-О-ацетил-2'-азидо-2'-дезоксигуанидин (III). Смесь (II) (706 мг, 2.0 ммоль), LiCl (100 мг, 2.4 ммоль) и CAN (2192 мг, 4.0 ммоль) в смеси CH₃CN/AcOH (1 : 1, 60 мл) перемешивали при 80°C в течение 6 ч. После упаривания растворителя остаток распределяли между EtOAc (100 мл) и водой (40 мл). Водный слой экстрагировали EtOAc (40 мл × 2). Объединенный органический слой сушили (MgSO₄) и упаривали до грязно-белой пены. Продукты очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0 → 1% CH₃OH в CH₂Cl₂). Выход 71%. ¹H-ЯМР (CDCl₃), δ, м.д., J, Гц: 9.29 (уш.с., 1H), 7.82 (с, 1H), 5.92 (д, J 3.9, 1H), 5.16 (т, J 5.7, 1H), 4.43–4.35 (м, 3H), 4.30 (дд, J 5.6, J 4.0, 1H), 2.20 (с, 6H). ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 170.0, 170.0, 158.4, 149.0, 135.5, 109.7, 88.3, 79.8, 70.5, 64.2, 61.9, 20.8, 20.3.

5-Бром-3',5'-ди-О-ацетил-2'-азидо-2'-дезоксигуанидин (IV). Смесь соединения (II) (706 мг, 2.0 ммоль), LiBr (208 мг, 2.4 ммоль) и CAN (2192 мг,

4.0 ммоль) в CH₃CN (60 мл) перемешивали при 80°C в течение 2 ч. Растворитель упаривали, полученный остаток распределяли между EtOAc (100 мл) и водой (40 мл). Водный слой экстрагировали EtOAc (40 мл × 2). Объединенный органический слой сушили (MgSO₄) и упаривали до желтоватой пены. Продукты очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0 → 1% CH₃OH в CH₂Cl₂). Выход 82%. ¹H-ЯМР (CDCl₃), δ, м.д., J, Гц: 8.92 (уш.с., 1H), 7.90 (с, 1H), 5.92 (д, J 4.0, 1H), 5.16 (т, J 5.7, 1H), 4.43–4.36 (м, 3H), 4.28 (дд, J 5.7, J 4.0, 1H), 2.21 (с, 3H), 2.20 (с, 3H). ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 170.0, 169.9, 158.3, 149.1, 138.0, 97.6, 88.4, 79.9, 70.6, 64.2, 62.0, 20.9, 20.3.

5-Иод-3',5'-ди-О-ацетил-2'-азидо-2'-дезоксигуанидин (V). Смесь соединения (II) (706 мг, 1.0 ммоль), иода (304 мг, 1.2 ммоль) и CAN (548 мг, 1.0 ммоль) в CH₃CN (60 мл) перемешивали при 80°C в течение 1 ч. Затем растворитель упаривали, остаток распределяли между EtOAc (100 мл) и 5%-ным водным раствором NaHSO₃ (50 мл). Водный слой экстрагировали EtOAc (40 мл × 2). Объединенный органический слой сушили (MgSO₄) и упаривали до желтоватой пены. Продукты очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0 → 1% CH₃OH в CH₂Cl₂). Выход 89%. ¹H-ЯМР (CDCl₃), δ, м.д., J, Гц: 8.98 (уш.с., 1H), 7.93 (с, 1H), 5.92 (д, J 4.3 Гц, 1H), 5.21–5.15 (м, 1H), 4.42–4.34 (м, 3H), 4.26 (дд, J 5.7, J 4.4, 1H), 2.24 (с, 3H), 2.20 (с, 3H). ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 170.1, 170.0, 159.4, 149.5, 143.2, 88.2, 79.9, 70.8, 69.3, 64.1, 62.1, 21.2, 20.4.

Общий метод получения 2'-азидо-2'-дезоксигуанидиновых производных (VI–IX). К суспензии 1,2,4-триазола (621 г, 9.0 ммоль, 9.0 экв.), высушенного упариванием с сухим CH₃CN, в сухом CH₃CN (20 мл) при 0°C последовательно добавляли POCl₃ (187 мкл, 2.0 ммоль, 2.0 экв.) и триэтиламин (2100 мкл, 15 ммоль, 15 экв.), смесь перемешивали в течение 30 мин при 0°C. Затем добавляли по каплям раствор соединения (II), (III), (IV) или (V) (1.0 ммоль, 1.0 экв.) в сухом CH₃CN (10 мл). Смесь нагревали до комнатной температуры, перемешивали в течение 4 ч и концентрировали при пониженном давлении. Полученный оранжевый твердый остаток распределяли между CH₂Cl₂ (40 мл) и насыщенным водным раствором NaHCO₃ (40 мл). Органический слой промывали водой (2 × 10 мл), сушили над MgSO₄ и концентрировали при пониженном давлении, получая промежуточное триазилил-замещенное производное в виде оранжевой пены. Остаток растворяли в 1,4-диоксане (20 мл), к полученному раствору добавляли 25%-ный водный раствор аммиака (10 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 24 ч при комнатной температуре, упаривали досуха и сушили упариванием с безводным

CH₃CN. Продукты очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0 → 20% CH₃OH в CH₂Cl₂).

2'-Азидо-2'-дезоксцитидин (VI). Выход 69%. ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆), δ, м.д., *J*, Гц: 7.87 (д, *J* 7.5, 1H), 7.50 (уш.с., 1H), 7.33 (уш.с., 1H), 5.90–5.85 (м, 2H), 5.78 (д, *J* 7.5, 1H), 5.13 (т, *J* 4.7, 1H), 4.29–4.24 (м, 1H), 3.94–3.90 (м, 1H), 3.88–3.85 (м, 1H), 3.69–3.65 (м, 1H), 3.59–3.55 (м, 1H). ¹³C-ЯМР (DMSO-*d*₆): 164.8, 154.0, 140.9, 94.1, 86.3, 84.6, 70.0, 65.1, 59.9.

5-Хлор-2'-азидо-2'-дезоксцитидин (VII). Выход 63%. ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆), δ, м.д., *J*, Гц: 8.56 (с, 1H), 8.42 (уш.с., 1H), 8.01 (уш.с., 1H), 5.75 (д, *J* 3.3, 1H), 4.31 (т, *J* 5.8, 1H), 4.11–4.05 (м, 1H), 3.92–3.86 (м, 1H), 3.75 (дд, *J* 12.2, *J* 1.9, 1H), 3.60 (дд, *J* 12.2, *J* 1.9, 1H). ¹³C-ЯМР (DMSO-*d*₆): 160.0, 151.2, 139.8, 99.2, 87.1, 84.4, 69.0, 65.6, 59.0.

5-Бром-2'-азидо-2'-дезоксцитидин (VIII). Выход 70%. ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆), δ, м.д., *J*, Гц: 8.34 (с, 1H), 7.96 (уш.с., 1H), 7.09 (уш.с., 1H), 5.89 (д, *J* 5.5, 1H), 5.78 (д, *J* 4.0, 1H), 5.33 (т, *J* 4.7, 1H), 4.33–4.25 (м, 1H), 4.04–3.99 (м, 1H), 3.90–3.84 (м, 1H), 3.77–3.68 (м, 1H), 3.62–3.53 (м, 1H). ¹³C-ЯМР (DMSO-*d*₆): 161.9, 153.5, 141.5, 86.8, 86.6, 84.4, 69.3, 65.6, 59.3.

5-Иод-2'-азидо-2'-дезоксцитидин (IX). Выход 59%. ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆), δ, м.д., *J*, Гц: 8.35 (с, 1H), 7.88 (уш.с., 1H), 6.66 (уш.с., 1H), 5.84 (д, *J* 5.5, 1H), 5.79 (д, *J* 4.2, 1H), 5.27 (т, *J* 4.8, 1H), 4.30–4.26 (м, 1H), 4.00 (дд, *J* 4.2, *J* 5.2, 1H), 3.88–3.85 (м, 1H), 3.74–3.69 (м, 1H), 3.60–3.55 (м, 1H). ¹³C-ЯМР (DMSO-*d*₆): 163.7, 153.7, 146.8, 86.6, 84.3, 69.4, 65.5, 59.3, 56.9.

Общий метод получения трифторуксусных солей 4-оксим-2'-азидо-2'-дезоксцитидиновых производных (X–XIII). К суспензии цитидинового производного (VI), (VII), (VIII) или (IX) (0.5 ммоль, 1.0 экв.) в воде (250 мкл) добавляли сульфат гидроксиламина (123 мг, 0.75 ммоль, 1.5 экв.), смесь перемешивали при 70°C в течение 8 ч. Затем реакционную смесь упаривали досуха, продукт очищали препаративной ВЭЖХ.

Трифторуксусная соль 4-оксим-2'-азидо-2'-дезоксцитидина (X). Выход 81%. ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆), δ, м.д., *J*, Гц: 10.13 (уш.с., 1H), 9.83 (уш.с., 1H), 7.08 (д, *J* 8.2, 1H), 5.91 (д, *J* 6.9, 1H), 5.63 (д, *J* 8.2, 1H), 4.28–4.21 (м, 1H), 3.95–3.81 (м, 2H), 3.60 (дд, *J* 12.0, *J* 3.4, 1H), 3.52 (дд, *J* 12.0, *J* 3.2, 1H).

Трифторуксусная соль 4-оксим-5-хлор-2'-азидо-2'-дезоксцитидина (XI). Выход 80%. ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆), δ, м.д., *J*, Гц: 10.61 (уш.с., 1H), 10.09 (уш.с., 1H), 7.50 (уш.с., 1H), 5.86 (д, *J* 6.3, 1H), 4.27 (дд, *J* 5.2, *J* 4.0, 1H), 3.98 (т, *J* 5.9, 1H), 3.88–3.85 (м, 1H), 3.63 (дд, *J* 12.0, *J* 3.2, 1H), 3.56 (дд, *J* 12.0, *J* 3.0, 1H). ¹³C-ЯМР (DMSO-*d*₆): 148.1, 140.1, 127.7, 103.6, 85.1, 84.8, 70.6, 63.6, 60.3.

Трифторуксусная соль 4-оксим-5-бром-2'-азидо-2'-дезоксцитидина (XII). Выход 80%. ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆), δ, м.д., *J*, Гц: 10.61 (уш.с., 1H), 10.02 (уш.с., 1H), 7.57 (уш.с., 1H), 5.86 (д, *J* 6.3, 1H), 4.27 (дд, *J* 5.1, *J* 4.1, 1H), 3.99 (т, *J* 5.8, 1H), 3.88–3.85 (м, 1H), 3.63 (дд, *J* 12.0, *J* 3.1, 1H), 3.56 (дд, *J* 12.0, *J* 3.0, 1H). ¹³C-ЯМР (DMSO-*d*₆): 148.3, 140.3, 130.1, 91.0, 85.1, 84.8, 70.6, 63.7, 60.3.

Трифторуксусная соль 4-оксим-5-иод-2'-азидо-2'-дезоксцитидина (XIII). Выход 69%. ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆), δ, м.д., *J*, Гц: 10.57 (уш.с., 1H), 9.82 (уш.с., 1H), 7.57 (уш.с., 1H), 5.85 (д, *J* 6.4, 1H), 4.27 (дд, *J* 5.3, *J* 3.9, 1H), 3.97 (т, *J* 5.9, 1H), 3.87–3.85 (м, 1H), 3.63 (дд, *J* 12.0, *J* 3.2, 1H), 3.55 (дд, *J* 12.0, *J* 3.1, 1H). ¹³C-ЯМР (DMSO-*d*₆): 148.5, 141.1, 135.1, 85.1, 84.6, 70.6, 63.6, 62.3, 60.3.

Клетки и вирусы. Культура клеток почки зеленой мартышки Vero была получена от WHO Biologicals (Швейцария), культура клеток рабдомиосаркомы человека RD — из коллекции клеток NIBSC (Великобритания, ID 081003). Культуру клеток Т-клеточного лейкоза МТ-4 получали в рамках программы исследований NIH AIDS (ARP-120).

Штамм ПИК35 SARS-CoV-2 (GISAID EPI_ISL_428852), штамм Nic CHIKV (GenBank ID MN271691-2), штамм 46973 энтеровируса A71 (EV-A71) энтеровирусов вида А (GenBank ID KJ645808), штамм 48461 эховируса 30 (E30) энтеровирусов вида В (GenBank ID MK704489) и вакцинный штамм Sabin1 полиовируса типа 1 (PV1) энтеровирусов вида С (GenBank ID AY184219) хранили в виде суспензии зараженных клеток при –70°C. Штамм NL4-3 ВИЧ-1 был получен путем трансфекции клеток МТ-4 плазмидой pNL4-3 (ARP2006, NIBSC, Великобритания).

Анализ жизнеспособности клеток. Двукратные разведения стоковых растворов соединений (5 mM в DMSO) и DMSO в качестве отрицательного контроля готовили на соответствующей среде для культивирования клеток (ФГАНУ “ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова” РАН, Россия). Разведения соединений добавляли к монослоям клеток Vero и RD или суспензии клеток МТ-4 в двух повторах. Конечная серия концентраций из восьми разведений начиналась с 1 : 50 для клеток Vero, RD и 1 : 100 для клеток МТ-4. После инкубации при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 5 сут (клетки Vero и RD) и 10 сут (клетки МТ-4) культуральную среду заменяли раствором резазурина (0.15 мг/мл; Sigma, США). Клетки инкубировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 4 ч. Затем добавляли 20 мкл 10%-ного SDS для прекращения реакции. Интенсивность флуоресценции измеряли с помощью прибора Fluoroskan (ThermoFisher Scientific, США) при λ_{ex} = 544 нм и λ_{em} = 590 нм. Используя кривые флуоресценции, рассчитывали CC₅₀.

Тест на ингибирование вирус-индуцированного цитопатического эффекта (SARS-CoV-2, CHIKV). Методика была описана ранее [23]. Вкратце, восемь двукратных разведений стоковых растворов соединений (5 мМ или 100 мкМ в DMSO) готовили в среде DMEM (ФГАНУ “ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова” РАН, Россия). Разведенные растворы соединений, начиная с концентрации 1 : 25, смешивали с равными объемами вирусной суспензии, содержащей 200–500 CCID₅₀ (50%-ных инфекционных доз). После 1 ч инкубации при 37°C смеси вируса и соединения ее добавляли к монослоям клеток Vero в двух повторях. Контрольные клетки обрабатывали теми же последовательными концентрациями DMSO, что и в разведениях соединений (отрицательный контроль), или *N*-гидроксцитидином [20] (положительный контроль). После инкубации в течение 5 сут при 37°C визуально оценивали цитопатический эффект по вирус-индуцированной гибели клеток, приводящей к нарушению целостности монослоя, под микроскопом Olympus CKX31 (Olympus Corporation, Япония) при 20-кратном увеличении. Значения EC₅₀ рассчитывали по методу Кербера [24]. Эксперимент повторяли не менее двух раз для каждого соединения. Каждый эксперимент включал титрование дозы вируса для обеспечения приемлемого диапазона доз.

Тест на ингибирование вирус-индуцированного цитопатического эффекта (ВИЧ-1). Методика была описана ранее [25] с некоторыми изменениями. Вкратце, в двух повторях готовили восемь двукратных разведений стоковых растворов соединений (5 мМ в DMSO) в RPMI-1640 (ФГАНУ “ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова” РАН, Россия). Разведенные растворы соединений смешивали с равными объемами вирусной суспензии, содержащей 200–400 CCID₅₀. Контрольные клетки обрабатывали теми же последовательными концентрациями DMSO, что и в разведенных растворах соединений (отрицательный контроль), или 3'-азидо-3'-дезокситимидином (положительный контроль). Затем к экспериментальным смесям добавляли суспензию клеток MT-4 (~1 × 10⁵ клеток на лунку) в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS (Invitrogen, США). Конечная серия концентраций соединений начиналась с 50 мкМ. Каждый эксперимент включал титрование дозы вируса в инокуляте для обеспечения приемлемого диапазона доз. После 10 сут инкубации (5% CO₂, 37°C) визуально оценивали цитопатический эффект под микроскопом при 20-кратном увеличении. Значения EC₅₀ рассчитывали по методу Кербера [24]. Все экспериментальные процедуры проводили в двух повторностях и повторяли дважды.

Тест на ингибирование вирус-индуцированного цитопатического эффекта (EV-A71, E30 и PV1). Методика была описана ранее [26]. Вкратце, восемь

двукратных разведений 5 мМ исходных растворов соединений в 2× EMEM (ФГАНУ “ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова” РАН, Россия) готовили в двух повторностях для получения конечной серии концентраций, начиная со 100 мкМ. Разведенные растворы соединений смешивали с равными объемами суспензии энтеровируса, содержащей 100 CCID₅₀. Контрольные клетки обрабатывали теми же последовательными концентрациями DMSO, что и в разведенных растворах соединений (отрицательный контроль), или *N*-гидроксцитидином (положительный контроль). После 1 ч инкубации при 36.5°C смеси соединения и вируса к ней добавляли суспензию клеток RD (~1 × 10⁵ клеток на лунку) в 2× EMEM, содержащей 5% FBS. Каждый эксперимент включал титрование дозы вируса в инокуляте для обеспечения приемлемого диапазона доз. После 5 сут инкубации при 37°C признаки цитопатического эффекта визуально оценивали под микроскопом при 20-кратном увеличении. Значения EC₅₀ рассчитывали по методу Кербера [24].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложена схема синтеза 5-галоген-2'-азидо-замещенных производных цитидина и *N*-гидроксцитидина. При скрининге на панели из шести РНК-содержащих вирусов выявлены одно производное уридина (IV), два производных цитидина (VII) и (VIII) и одно производное *N*-гидроксцитидина (XIII), обладающие способностью ингибировать репродукцию вирусов SARS-CoV-2 и CHIKV *in vitro* и не являющиеся цитотоксичными для восприимчивых к вирусам клеток.

Структуры полученных соединений могут найти применение для последующей оптимизации с целью разработки новых противовирусных препаратов.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-1049).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Holmes E.C., Goldstein S.A., Rasmussen A.L., Robertson D.L., Crits-Christoph A., Wertheim J.O., Anthony S.J., Barclay W.S., Boni M.F., Doherty P.C., Farrar J., Geoghegan J.L., Jiang X., Leibowitz J.L., Neil S.J.D., Skern T., Weiss S.R., Worobey M., Andersen K.G., Garry R.F., Rambaut A. // *Cell*. 2021. V. 184. P. 4848–4856.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.08.017>
- Triggle C.R., Bansal D., Ding H., Islam M.M., Farag E.A.B.A., Hadi H.A., Sultan A.A. // *Front. Immunol.* 2021. V. 12. P. 631139.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.631139>
- van de Leemput J., Han Z. // *Mol. Cell. Biol.* 2021. V. 41. P. 1–16.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00185-21>
- Khudhair Z.T., Shihab M.S., Hamah-Ameen B. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2021. V. 47. P. 789–804.
<https://doi.org/10.1134/S1068162021040130>
- Beigel J.H., Tomashek K.M., Dodd L.E., Mehta A.K., Zingman B.S., Kalil A.C., Hohmann E., Chu H.Y., Luetkemeyer A., Kline S., de Castilla D.L., Finberg R.W., Dierberg K., Tapson V., Hsieh L., Patterson T.F., Paredes R., Sweeney D.A., Short W.R., Touloumi G., Lye D.C., Ohmagari N., Oh M.-D., Ruiz-Palacios G.M., Benfield T., Fätkenheuer G., Kortepeter M.G., Atmar R.L., Creech C.B., Lundgren J., Babiker A.G., Pett S., Neaton J.D., Burgess T.H., Bonnett T., Green M., Makowski M., Osinusi A., Nayak S., Lane H.C. // *N. Engl. J. Med.* 2020. V. 383. P. 1813–1826.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2007764>
- Zhou S., Hill C.S., Sarkar S., Tse L.V., Woodburn B.M.D., Schinazi R.F., Sheahan T.P., Baric R.S., Heise M.T., Swanstrom R. // *J. Infect. Dis.* 2021. V. 224. P. 415–419.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiab247>
- Amblard F., LeCher J.C., De R., Goh S.L., Li C., Kasthuri M., Biteau N., Zhou L., Tber Z., Downs-Bowen J., Zandi K., Schinazi R.F. // *Pharmaceuticals* 2022. V. 15. P. 1144.
<https://doi.org/10.3390/ph15091144>
- Urakova N., Kuznetsova V., Crossman D.K., Sokratian A., Guthrie D.B., Kolykhalov A.A., Lockwood M.A., Natchus M.G., Crowley M.R., Painter G.R., Frolova E.I., Frolov I. // *J. Virol.* 2018. V. 92. P. e01965–17.
<https://doi.org/10.1128/JVI.01965-17>
- Agostini M.L., Pruijssers A.J., Chappell J.D., Gribble J., Lu X., Andres E.L., Bluemling G.R., Lockwood M.A., Sheahan T.P., Sims A.C., Natchus M.G., Saindane M., Kolykhalov A.A., Painter G.R., Baric R.S., Denison M.R. // *J. Virol.* 2019. V. 93. P. e01348–19.
<https://doi.org/10.1128/JVI.01348-19>
- Kabinger F., Stiller C., Schmitzová J., Dienemann C., Kokic G., Hillen H.S., Höbartner C., Cramer P. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2021. V. 28. P. 740–746.
<https://doi.org/10.1038/s41594-021-00651-0>
- Liu F., Chen H.-M., Armstrong Z., Withers S.G. // *ACS Cent. Sci.* 2022. V. 8. P. 656–662.
<https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c01172>
- Chen F.-F., Wang F. // *Molecules* 2009. V. 14. P. 2656–2668.
<https://doi.org/10.3390/molecules14072656>
- Wnuk S.F., Chowdhury S.M., Garcia P.I., Robins M.J. // *J. Org. Chem.* 2002. V. 67. P. 1816–1819.
<https://doi.org/10.1021/jo010899i>
- Fedeles B.I., Freudenthal B.D., Yau E., Singh V., Chang S., Li D., Delaney J.C., Wilson S.H., Essigmann J.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. P. 4571–4580.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1507709112>
- Moffatt J.G., Verheyden J.P.H., Wagner D. // *J. Org. Chem.* 1971. V. 36. P. 250–254.
<https://doi.org/10.1021/jo00801a002>
- Asakura J., Robins M.J. // *J. Org. Chem.* 1990. V. 55. P. 4928–4933.
<https://doi.org/10.1021/jo00303a033>
- McGee D.P.C., Vargeese C., Zhai Y.S., Kirschenheuter G.P., Settle A., Siedem C.R., Pieken W.A. // *Nucleosides and Nucleotides*. 1995. V. 14. P. 1329–1339.
<https://doi.org/10.1080/15257779508010694>
- Mieczkowski A., Wińska P., Kaczmarek M., Mroczkowska M., Garbicz D., Pilżys T., Marcinkowski M., Piwowarski J., Grzesiuk E. // *Chem. Pap.* 2018. V. 72. P. 981–990.
<https://doi.org/10.1007/s11696-017-0339-9>
- Paymode D.J., Vasudevan N., Ahmad S., Kadam A.L., Cardoso F.S.P., Burns J.M., Cook D.W., Stringham R.W., Snead D.R. // *Org. Process Res. Dev.* 2021. V. 25. P. 1822–1830.
<https://doi.org/10.1021/acs.oprd.1c00219>
- Sheahan T.P., Sims A.C., Zhou S., Graham R.L., Pruijssers A.J., Agostini M.L., Leist S.R., Schäfer A., Dinnon K.H., Stevens L.J., Chappell J.D., Lu X., Hughes T.M., George A.S., Hill C.S., Montgomery S.A., Brown A.J., Bluemling G.R., Natchus M.G., Saindane M., Kolykhalov A.A., Painter G., Harcourt J., Tamin A., Thornburg N.J., Swanstrom R., Denison M.R., Baric R.S. // *Sci. Transl. Med.* 2020. V. 12. P. eabb5883.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abb5883>
- Mitsuya H., Weinhold K.J., Furman P.A., St Clair M.H., Lehrman S.N., Gallo R.C., Bolognesi D., Barry D.W., Broder S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1985. V. 82. P. 7096–7100.
<https://doi.org/10.1073/pnas.82.20.7096>
- Fischl M.A., Richman D.D., Grieco M.H., Gottlieb M.S., Volberding P.A., Laskin O.L., Leedom J.M., Groopman J.E., Mildvan D., Schooley R.T., Jackson G.G., Durack D.T., King D. // *N. Engl. J. Med.* 1987. V. 317. P. 185–191.
<https://doi.org/10.1056/NEJM198707233170401>
- Kozlovskaya L.I., Volog V.P., Shatro A.A., Nikolaeva Y.V., Chistov A.A., Matyugina E.S., Belyaev E.S., Jegorov A.V., Snoeck R., Korshun V.A., Andrei G., Osolodkin D.I., Ishmukhametov A.A., Aralov A.V. // *Eur. J. Med. Chem.* 2021. V. 220. P. 113467.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113467>
- Kärber G. // *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 1931. V. 162. P. 480–483.
- Ryazantsev D.Y., Myshkin M.Yu., Alferova V.A., Tsvetkov V.B., Shustova E.Y., Kamzееva P.N., Kovalets P.V., Zaitseva E.R., Baleeva N.S., Zaitsepin T.S., Baleeva N.S., Tamin T.S., Sherkarev Z.O., Baranov M.S., Kozlovskaya L.I., Aralov A.V. // *Biomolecules* 2021. V. 11. P. 1409.
<https://doi.org/10.3390/biom11101409>
- Zenchenko A.A., Oslovsky V.E., Varizhuk I.V., Karpova E.V., Osolodkin D.I., Kozlovskaya L.I., Ishmukhametov A.A., Drenichev M.S. // *Toxicol. In Vitro*. 2022. V. 82. P. 105355.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2022.105355>

Synthesis and Evaluation of the Antiviral Activity of 5-Halogen-2'-Azido-Substituted Derivatives of Cytidine and *N*-Hydroxycytidine on a Panel of RNA Viruses, Including SARS-CoV-2

P. N. Kamzeeva*, E. S. Kolpakova**, E. V. Karpova**, M. O. Borodulina**, ***,
E. V. Yakovchuk**, ***, V. A. Alferova*, A. A. Chistov*, E. S. Belyaev****,
L. I. Kozlovskaya**, ***, and A. V. Aralov***, #

#Phone: +7 (926) 606-29-10; e-mail: Baruh238@mail.ru

*Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

**Chumakov Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), village of the Institute of Poliomyelitis, settlement Moskovskiy, 8/1, Moscow, 108819 Russia

***Sechenov First Moscow State Medical University, ul. Trubetskaya 8/2, Moscow, 119991 Russia

****Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Science, Leninskiy prosp. 31, Moscow, 119071 Russia

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is a new global pandemic with high morbidity and mortality caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *N*-Hydroxycytidine derivatives show promise for combating viral diseases, and in particular, molnupiravir has recently been approved for emergency prophylaxis in the early stages after infection with SARS-CoV-2. Here, a scheme for the synthesis of 5-halo-2'-azido-substituted derivatives of cytidine and *N*-hydroxycytidine is proposed. The synthesized compounds were tested on a panel of six RNA viruses, including SARS-CoV-2, enteroviruses, CHIKV, and HIV-1. A number of compounds were able to inhibit the reproduction of SARS-CoV-2 and CHIKV viruses in the micromolar range without noticeable cytotoxicity. The structures of the leader compounds can be used as a starting point for further design of antiviral agents.

Keywords: SARS-CoV-2, antiviral agents, nucleoside analogues, *N*-hydroxycytidine