

АНТИСМЫСЛОВОЙ ОЛИГОНУКЛЕОТИД К ГЕНУ TRS SARS-COV-2: ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ И ВОЗМОЖНОСТИ ПРИЖИЗНЕННОЙ И ПОСМЕРТНОЙ ДИАГНОСТИКИ COVID-19.

Горячев А.Н.^{1,2}, Штро А.А.³, Галочкина А.В.³, Горячева А.С.¹,

1 - ГБУЗ СК «Городская клиническая больница» г. Пятигорска

2 - ООО «Экспертцентр КМВ»

3 - ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России

Резюме.

Приведены данные об актуальности антисмыслового олигонуклеотида 5'-AGC CGA GTG ACA GCC ACA CAG для связывания с trs-геном вируса SARS-CoV-2, вызывающего новую коронавирусную инфекцию COVID-19. Показана высокая стабильность и консервативность данного участка генома SARS-CoV-2, позволяющего использовать его в качестве точки приложения для антисмыловых олигонуклеотидов. Методом оценки ингибирования бляшкообразования обнаружена способность данного антисмылового олигонуклеотида с фосфоротиоатной и 2'-оксиметильной модификацией подавлять репликацию вируса. При лечебно-профилактическом применении на культуре клеток значение эффективной дозировки, снижающей титр вируса на 50%, составляет 3,84 мкг/мл. Показано отсутствие токсичности вплоть до дозировки 100 мкг/мл, что составляет величину химиотерапевтического индекса более 28,8. Показана способность данного олигонуклеотида, конъюгированного с флуоресцентным красителем TAMRA, выявлять вирус SARS-CoV-2 в реакции флуоресцентной гибридизации *in situ* в цитологических препаратах мазков из носоглотки, мазков крови, а также в гистологических препаратах тканей внутренних органов.

Ключевые слова: антисмыловой олигонуклеотид, антисмыловая терапия, sars-cov-2, новая коронавирусная инфекция, covid-19

Актуальность.

За последние три года в мире возросло количество биологических угроз. В первую очередь, это вирусные заболевания, такие, как COVID-19, вирус оспы обезьян, геморрагические лихорадки Марбурга и другие. На примере COVID-19 видно, что эпидемические вирусные заболевания обладают мультиплективным эффектом, вызывая нарастающие проблемы не только в сфере здравоохранения, но и в экономике в целом.

Такие вызовы обществу требуют современных высокотехнологических решений, основывающихся на знании механизмов распространения вирусов. Одним из таких решений в отношении вирусных заболеваний является использование антисмыловых олигонуклеотидов (ACO). ACO - это

однонитевые олигонуклеотидные цепочки ДНК или РНК из 20 – 25 нуклеотидов, комплементарные последовательности геномной вирусной РНК (12).

Целесообразность использования АСО для лечения вирусов семейства Coronaviridae (SARS-CoV-Tor, MERS) ранее уже была подтверждена исследованиями (11). При этом наиболее оптимальным признано использование АСО к начальным участкам генома коронавирусов, в зоне гена, регулирующего транскрипцию (trs), который находится вблизи 5'-конца генома бета-коронавирусов. Специфическое связывание АСО с данным геном приводит к блокированию транскрипции практически всего вирусного генома, что предотвращает дальнейшее размножение вируса и синтез вирусных белков.

Ранее нами исследовался АСО вида 5'-AGC CGA GTG ACA GCC ACA CAG с фосфоротиоатной модификацией межнуклеозидной связи, комплементарный к участку гена trs коронавируса SARS-CoV-2. Исследование противовирусной активности данного АСО показало снижение репликации вируса в 9 – 13 раз (3). Однако появление новых штаммов коронавируса диктует необходимость исследования противовирусной активности новых АСО или модификации уже имеющихся АСО для лечения новой коронавирусной инфекции (НКИ) COVID-19.

Кроме того, высокоспецифичное связывание выбранных АСО с консервативными участками генома SARS-CoV-2 можно использовать для конъюгирования данных АСО с флуоресцентными метками для детекции вирусной РНК в реакции флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) при цитологических и гистологических исследованиях (10). Причем данные исследования могут представлять ценность не только для прижизненной, но и для аутопсийной диагностики, в том числе и в ретроспективных исследованиях аутопсийного материала. Исследования вирусной РНК в тканях методом FISH известны и используются для раскрытия механизмов патогенеза новой коронавирусной инфекции COVID-19 (9, 13). В связи с этим представляется актуальным исследование противовирусной активности известного АСО к SARS-CoV-2 вида 5'-AGC CGA GTG ACA GCC ACA CAG с дополнительной модификацией, а также возможность использования данного АСО для прижизненной и посмертной диагностики SARS-CoV-2 в реакции FISH, что и предполагает актуальность настоящего исследования.

Цель исследования - определить противовирусную активность известного АСО к SARS-CoV-2 вида 5'-AGC CGA GTG ACA GCC ACA CAG с фосфоротиоатной модификацией межнуклеозидного фосфата и 2'-

оксиметильной модификацией пентозы, а также определить возможность использования данного олигонуклеотида, меченного флуоресцентной меткой для цитологической и гистологической диагностики SARS-CoV-2.

В соответствии с целью были определены **задачи исследования**.

1. На основании BLAST-анализа провести исследование актуальности предложенного АСО для всех возможных мутаций SARS-CoV-2.

2. Оценить противовирусную активность предложенного АСО с фосфоротиоатной модификацией межнуклеозидного фосфата и 2'-оксиметильной модификацией пентозы *in vitro* в отношении коронавируса SARS-CoV-2.

3. Исследовать применимость предложенного АСО, конъюгированного с флуоресцентной меткой тетраметилродамина (TAMRA) на 5'-конце на цитологических мазках со слизистой носоглотки и мазках крови у пациентов с установленным диагнозом НКИ COVID-19, а также на гистологических срезах тканей внутренних органов лиц, умерших с установленным диагнозом НКИ COVID-19.

Материал и методы.

1. Исследование актуальности предложенного АСО вида 5'-AGC CGA GTG ACA GCC ACA CAG была проведена методом BLAST-анализа (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Необходимость проверки работоспособности АСО методом *in silico* диктовалась высоким мутационным потенциалом коронавируса, в результате чего целевые нуклеотидные последовательности генома вируса могли измениться и потерять актуальность в качестве точки приложения АСО.

Для блокирования транскрипции был выбран участок гена коронавируса, отвечающего за транскрипцию trs. Данный участок имеет последовательность 5'-CTG TGT GGC TGT SAC TCG GCT, наличие которого проверялось в секвенированных нуклеотидных последовательностях всех идентифицированных образцов SARS-CoV-2 (**SARS-CoV-2 Data Hub, NCBI**) (2).

2. Синтез препарата АСО к SARS-CoV-2 вида 5'-AGC CGA GTG ACA GCC ACA CAG с фосфоротиоатной модификацией межнуклеозидного фосфата и 2'-оксиметильной модификацией пентозы проводился в компании ООО «ДНК-Синтез» (<https://oligos.ru/>) в количестве 4 мг (101 ОЕ) классическим амидофосфитным способом с дальнейшей ВЭЖХ очисткой.

3. Противовирусная активность АСО проверялась методом оценки ингибирования бляшкообразования (7) в лаборатории химиотерапии

вирусных инфекций ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России (зав. лабораторией к.б.н А.А. Штро; НИР-ЛХТ-СА-010/2022 от 03.06.2022).

Для проведения исследования была использована клеточная культура Vero E-6 (почечный эпителий зеленой мартышки), полученная из рабочей коллекции лаборатории химиотерапии вирусных инфекций ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева».

Культивирование клеток Vero осуществлялось путем периодического пересева клеток на флаконы T-75 (раз в 3-4 суток) при использовании раствора Трипсина-Версена в соотношении 1:1. После визуального контроля сползания клеток во флакон добавляли ростовую среду DMEM, содержащую 10% сыворотки эмбрионов коров (FBS) и раствор антибиотика в таком объеме, чтобы в полученной взвеси содержалось около 3×10^6 клеток/мл. Для проведения экспериментальной работы клетки рассевали в 6-луночные планшеты в посевной дозе 9×10^6 клеток на лунку. Эксперименты проводили после формирования полной конфлюэнтности монослоя, примерно через 24 часа.

В работе был использован клинический изолят №3524, полученный из материала больного коронавирусной инфекцией методом выделения в культуре клеток Vero E6, на пятом пассаже в культуре клеток Vero. Образец вируса предоставлен вирусологическим лабораторным комплексом ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины».

Титрование вируса на культуре клеток Vero перед постановкой эксперимента проводили на 6-луночных культуральных планшетах. Из образца вирусодержащей суспензии готовили серию 10-кратных последовательных разведений, каждое разведение наносили на клеточный монослой и инкубировали в течение 2 часов. Далее, вирусодержащую жидкость удаляли, после чего наносили покровную среду с 0,9 % агаром и инкубировали в течение 3 дней. По окончании срока инкубации клетки фиксировали и окрашивали 0,2 % раствором кристаллического фиолетового в 10 %-ном растворе формальдегида, после чего в каждой лунке подсчитывали количество образовавшихся бляшек. Наименьшее тестируемое количество вируса, приводящее к образованию одной бляшки (зоны лизиса) принимается за инфекционную единицу (бляшкообразующую единицу, БОЕ). Сток вируса SARS-CoV-2 (hCoV-19/Russia/StPetersburg-RN3524VR4/2020 №35245), хранящийся при -25°C для последующих экспериментов разводили до титра 100 TCID₅₀ (50% тканевая инфекционная доза – доза вируса, вызывающая заражение 50% клеток), что соответствует значению 3×10 БОЕ.

В эксперименте была использована профилактическая схема применения препаратов за 1 час до заражения вирусом.

При изучении активности препаратов по профилактической схеме использовали 6-луночные планшеты со 100 % монослоем клеток. Непосредственно перед внесением разведений объекта исследования, из лунок планшетов, содержащих клеточный монослой, удаляли супернатанты, после чего в соответствующие лунки планшетов добавляли по 1 мл 3-х кратных разведений тестируемых объектов в двойных концентрациях и инкубировали с клетками в течение 1 ч при 37 °C, 5 % CO₂. Одну лунку планшета использовали в качестве контроля заражения – вместо разведения тестируемого объекта добавляли культуральную среду DMEM. Далее в лунки планшета добавляли вирусный инокулят в концентрации 100 TCID₅₀ и инкубировали 2 ч при 37 °C, 5 % CO₂. Затем культуральную среду (содержащую АСО и вирус) удаляли, после чего добавляли к клеткам покровную среду с содержанием 0,9 % агара, в которую также добавляли АСО в соответствующих концентрациях и, далее, инкубировали 3 суток при температуре 37 °C и 5 % CO₂. По окончании срока инкубации клетки фиксировали и окрашивали 0,2 % раствором кристаллического фиолетового в 10 %-ном формальдегиде, после чего подсчитывали количество бляшек в каждой лунке.

В экспериментах по профилактической схеме использовали концентрации АСО – 100; 10; 1; 0,1 и 0,01 мкг/мл.

Титр вируса (Т) рассчитывали по формуле (1):

$$T = N_{\text{бляшек}} * Dil / V;$$

где $N_{\text{бляшек}}$ – количество бляшек, Dil – разведение вирусодержащего материала, V – объем заражающей дозы вирусного инокулята.

На основании полученных данных для каждой концентрации тестируемого объекта рассчитывали % ингибиции вирусной активности, а также ЭД₅₀ – дозировку, вызывающую снижение титра вируса на 50 %.

4. Синтез флюоресцентной метки АСО к SARS-CoV-2 вида 5'-AGC CGA GTG ACA GCC ACA CAG был осуществлен в компании ООО «ДНК-Синтез» (<https://oligos.ru/>) в количестве 50 ОЕ классическим амидофосфитным способом с дальнейшей конъюгацией с тетраметилродамином (TAMRA) на 5'-конце и ВЭЖХ очисткой. В качестве рабочей концентрации ДНК-зонда использовалось разведение олигонуклеотида в формамиде в концентрации около 100 нг/мкл (8)

5. Исследование диагностической эффективности АСО, конъюгированного с TAMRA проводилось методом флюоресцентной гибридизации *in situ* на цитологических мазках слизистой носоглотки и

мазках крови у пациентов с установленным диагнозом НКИ COVID-19, а также на гистологических срезах тканей внутренних органов лиц, умерших с установленным диагнозом НКИ COVID-19.

Для цитологического исследования были взяты мазки со слизистой носоглотки и мазки крови у 14 пациентов.

Пациенты по тяжести заболевания распределялись следующим образом. Контрольную группу составили здоровые респонденты в возрасте от 26 до 65 лет в количестве 8 человек без клинических проявлений НКИ, с отрицательными результатами ПЦР SARS-CoV-2 мазков из носоглотки. Пациенты опытных групп демонстрировали положительный результат ПЦР SARS-CoV-2 мазков из носоглотки и различную тяжесть НКИ. Так, первая опытная группа включала 5 человек с легким течение НКИ. Во вторую опытную группу были включены 6 пациентов со среднетяжелым течением НКИ. Третья опытная группа составляла 5 пациентов с тяжелым течением НКИ. Тяжесть заболевания оценивалась в соответствии Временными методическими рекомендациями по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции (1).

Забор цитологического материала проводился в отделении для лечения пациентов с новой коронавирусной инфекцией ГБУЗ СК «Городская клиническая больница» г. Пятигорска. У пациентов проводился забор мазков из носоглотки и забор венозной крови в пробирки с ЭДТА (фиолетовый колпачок). Забор диагностического материала, его упаковка, маркировка и транспортировка осуществлялся в соответствии с требованиями и правилами по работе с материалами, потенциально инфицированными возбудителями II группы патогенности, их хранения и транспортировки согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих МАНК при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I – IV групп патогенности» и Методическими рекомендациями Роспотребнадзора МР 3.1.0169-20 «Лабораторная диагностика COVID-19».

Изготовление мазков проводилась на стеклах с адгезивным покрытием Superfrost Plus (Thermo FS). Фиксация мазков проводилась в 100%-м этаноле (4, 5).

Далее проводилась подготовка мазков крови и носоглотки для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с использованием набора реагентов для пробоподготовки цитологических препаратов (ООО «Медико-Диагностическая Лаборатория», www.m-d-l.ru). Препараты обрабатывали раствором флюоресцентной метки АСО к SARS-CoV-2 в формамиде .

В качестве зондового контроля использовался центромерный ДНК-зонд CCP1 FISH Probe, локус 1p11-q11 (CytoTest Inc.). Изготовленные препараты

исследовали под иммерсией на люминесцентном тринокулярном микроскопе Микромед 3 ЛЮМ с зеленым люминесцентным блоком (возбуждающее излучение 500 – 550 нм, запирающий светофильтр 590 нм). Микрофотографирование проводилось фотокамерой Canon EOS 1100D. Параллельно проводилось стандартное окрашивание цитологических препаратов по Романовскому-Гимзе.

6. Применимость предложенного АСО, конъюгированного с флуоресцентной меткой тетраметилродамина (АСО-TAMRA) исследовалось на гистологических срезах тканей внутренних органов, полученных при аутопсии. Аутопсийный материал был получен в патологоанатомическом отделении инфекцией ГБУЗ СК «Городская клиническая больница» г. Пятигорска. Опытную группу респондентов составляли 6 лиц в возрасте 58 – 72 лет, умерших с установленным диагнозом НКИ COVID-19. Во всех исследуемых случаях смерти лиц опытной группы наблюдалось прижизненное тяжелое течение НКИ. Диагноз НКИ COVID-19 был установлен прижизненно по характерной клинической картине, положительному результату ПЦР SARS-CoV-2 и подтвержден при посмертном исследовании. В качестве контроля выступали 5 лиц в возрасте 64 – 74 года, с длительным отягощенным кардиологическим анамнезом, смерть которых наступила от острой коронарной смерти в пределах 24-х часов от начала приступа, у которых при прижизненном и посмертном исследовании ПЦР SARS-CoV-2 была отрицательной, а также отсутствовали прижизненные клинические и посмертные морфологические признаки НКИ.

При аутопсии производили забор тканей внутренних органов, из которых изготавливали гистологические препараты по стандартной методике с окраской гематоксилином и эозином (6). Параллельно для флуоресцентной гибридизации проводился монтаж гистологических срезов тканей внутренних органов на стекла с адгезивным покрытием Superfrost Plus (Thermo FS). Подготовка к окрашиванию флуоресцентным зондом АСО-TAMRA проводилась с использованием набора реагентов для пробоподготовки парафинизированных срезов тканей (ООО «Медико-Диагностическая Лаборатория», www.m-d-l.ru). Препараты обрабатывали раствором флуоресцентной метки АСО-TAMRA к SARS-CoV-2 с формамиде.

В качестве зондового контроля использовался центромерный ДНК-зонд CCP1 FISH Probe, локус 1p11-q11 (CytoTest Inc.). Изготовленные препараты исследовали под иммерсией на люминесцентном тринокулярном микроскопе Микромед 3 ЛЮМ с зеленым люминесцентным блоком (возбуждающее

излучение 500 – 550 нм, запирающий светофильтр 590 нм). Микрофотографирование проводилось фотокамерой Canon EOS 1100D.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Исследование актуальности предложенного АСО для всех возможных мутаций SARS-CoV-2.

Проверка актуальности предложенного АСО вида 5'-AGC CGA GTG ACA GCC ACA CAG методом BLAST-анализа показала, что комплементарный ему участок trs гена 5'-CTGTGTGGCTGTCACTCGGCT присутствует только и исключительно в геноме SARS-CoV-2. Наличие этого участка проверялось в секвенированных полногеномных (complete genome) нуклеотидных последовательностях всех идентифицированных образцов SARS-CoV-2 (около 6 млн. записей), где данный фрагмент по анализу нуклеотидных последовательностей FASTA был обнаружен в области 5'-конца генома на расстоянии до 84 нуклеотидов от 5'-конца цепи.

Исследование противовирусной активности АСО.

Противовирусная эффективность препарата АСО была оценена в отношении коронавируса методом ингибиции бляшкообразования в различных дозировках по профилактической схеме. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1
Результаты исследования противовирусной активности препарата АСО методом ингибиции бляшкообразования

Доза АСО, мкг/мл	Титр вируса, БОЕ			M±SD, БОЕ	Количество вируса, %			M±SD, %	ЭД ₅₀ , мкг/мл
	1 повтор	2 повтор	3 повтор		1 повтор	2 повтор	3 повтор		
100	5,1 *10 ⁵	5 *10 ⁵	2 *10 ⁵	4±1,8 *10 ⁵	26,5	33,7	11,1	23,8 ±11,5	3,84
10	9,6 *10 ⁵	7,2 *10 ⁵	6,6 *10 ⁵	7,8±1,58 *10 ⁵	50	48,6	36,6	45,1 ±7,3	
1	1,44 *10 ⁶	1,28 *10 ⁶	1,32 *10 ⁶	1,3±0,8 *10 ⁶	75	86,4	73,3	78,2 ±7,1	
0,1	1,88 *10 ⁶	1,72 *10 ⁶	1,68 *10 ⁶	1,8±0,1 *10 ⁶	97,9	116,2	93,3	102,4 ±12,1	
0,01	2,08 *10 ⁶	1,52 *10 ⁶	1,36 *10 ⁶	1,7±0,37 *10 ⁶	108,3	102,7	75,5	95,5 ±17,5	
0	1,92 *10 ⁶	1,48 *10 ⁶	1,8 *10 ⁶	1,7±0,22 *10 ⁶	100	100	100	100	

Из приведенных данных видно, что все исследуемый препарат продемонстрировал наличие противовирусной активности в исследуемых

концентрациях. Согласно полученным результатам, препарат обладал противовирусной защитой при профилактической схеме применения, что подтверждается низким значением $\text{ЭД}_{50} = 3,84 \text{ мкг/мл}$.

Для визуализации полученных результатов приведены фотографии одного из опытных планшетов с негативными вирусными колониями «бляшками» для проведенных экспериментов. Данные представлены на рис. 1.

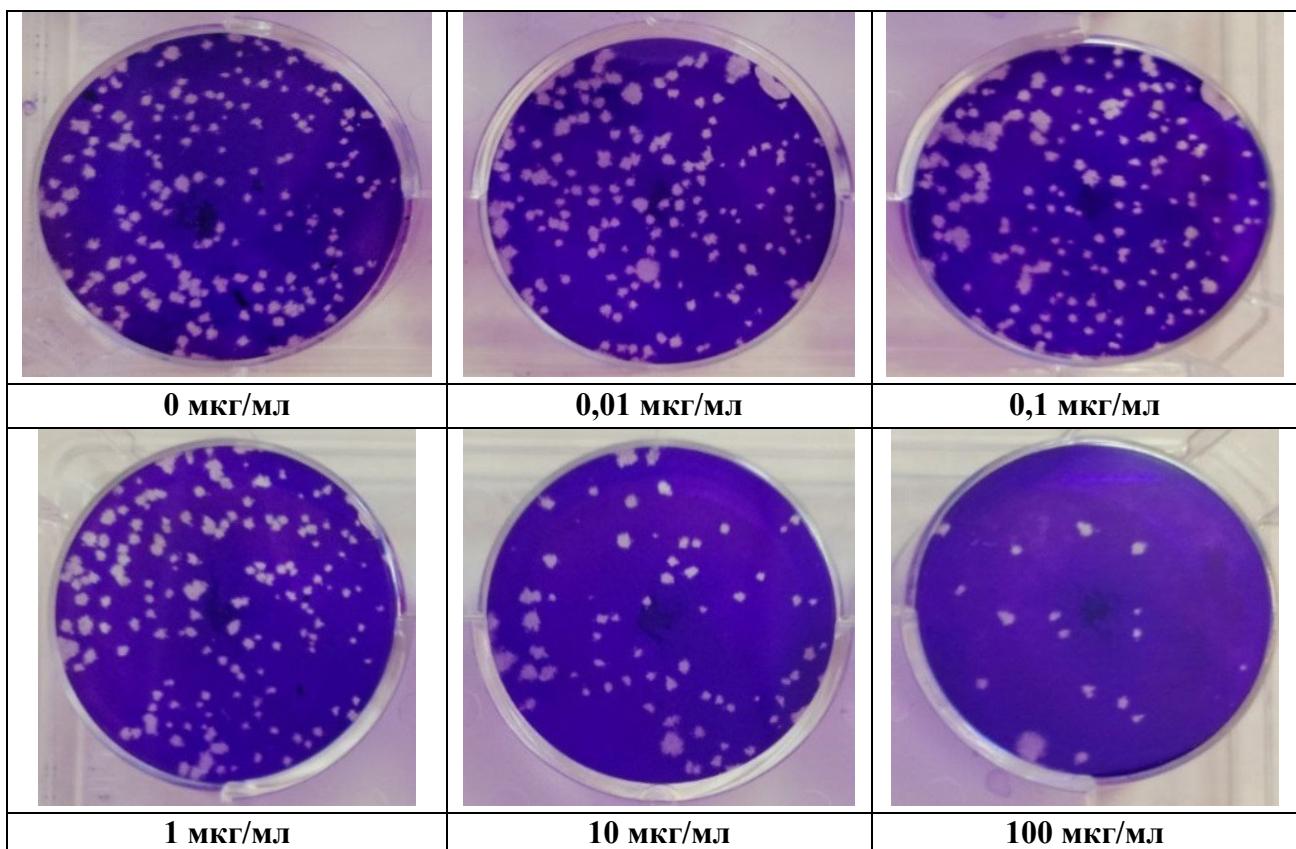


Рис. 1. Результаты тестирования противовирусной активности препарата в отношении коронавируса SARS-CoV-2

Тестирования цитотоксичности препарата не проводилось и точного значения цитотоксической дозы, вызывающей гибель 50% клеток - ЦТД₅₀ подсчитать невозможно. Тем не менее, для проведения расчетов химиотерапевтического индекса ХТИ возможно использовать концентрацию 100 мкг/мл, так как при визуальном наблюдении в присутствии исследуемого препарата в этой концентрации нарушений жизнеспособности клеточной культуры не отмечалось.

Таким образом, значение химиотерапевтического индекса ХТИ препарата составляет более $100/3,48 = 28,8$, что существенно превышает пороговое значение 8, поэтому представляется возможным сделать вывод о высокой противовирусной активности исследуемого препарата.

Исследование диагностической эффективности АСО, конъюгированного с TAMRA в реакции FISH.

При цитологическом исследовании мазков носоглотки в реакции FISH было обнаружено, что у лиц контрольной групп отсутствовала флюоресценция гибридизованной метки в клетках, что говорит об отсутствии вирусных частиц. При легком течении НКИ были обнаружены немногочисленные клетки эпителия, содержащие единичные фокусы светящейся метки АСО-TAMRA, гибридизовавшейся с РНК SARS-CoV-2 (рис. 2 А, Б). Количество вирус-позитивных клеток составляло 1- 2 в поле зрения на малом увеличении 10^*10 .

В случае среднетяжелого течения НКИ были обнаружены множественные клетки (4 – 5 в поле зрения на малом увеличении 10^*10), в которых обнаруживалось интенсивное размножение вируса в клетках эпителия. Причем гибридизованные в коронавирусом метки располагались как в ядре, так и в цитоплазме (рис. 2 В). При тяжелом течении НКИ метки АСО-TAMRA обнаруживались в количестве 10 – 15 поле зрения на малом увеличении 10^*10 . Вирус-позитивные клетки также были насыщены вирусными частицами (рис. 2 Г).

При исследовании мазков крови цитологическая картина была менее выраженной. В контрольной группе флюоресценция меток АСО-TAMRA обнаружены не была. Также не были обнаружены флуоресцентные метки в цитологических мазках венозной крови у лиц с легким течением НКИ. У пациентов опытной группы со среднетяжелым течением НКИ были обнаружены единичные клеточные элементы (эритроциты), содержащие единичные вирусные частицы РНК (рис. 3А). Более интенсивным содержанием вирусных частиц отличалась кровь пациентов с тяжелым течением НКИ. У данной группы пациентов флюоресценция меток АСО-TAMRA обнаруживалась во многих полях зрения, причем содержание частиц вируса было достаточно насыщенным (Рис.3 Б).

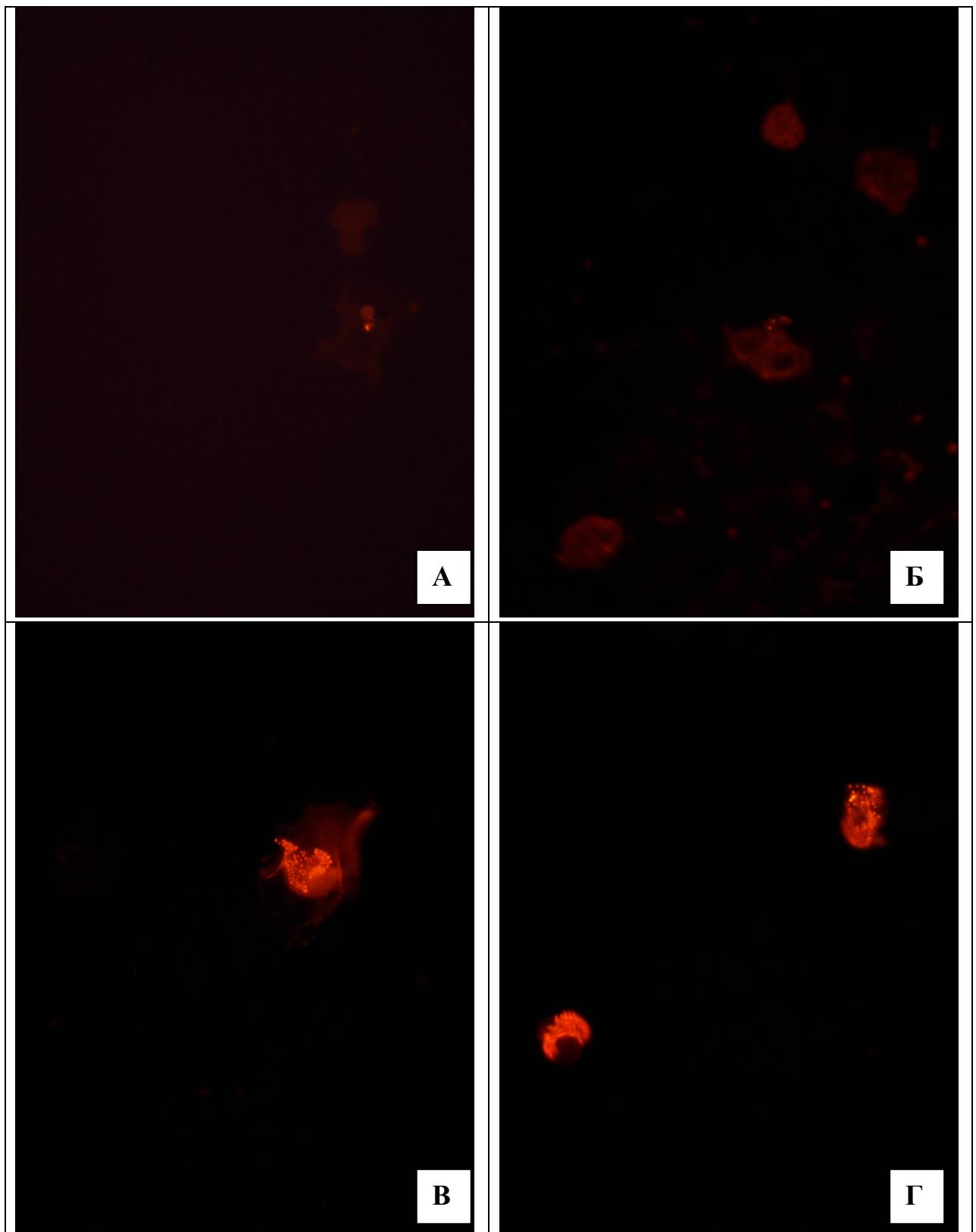


Рис. 2. FISH-реакция на РНК SARS-CoV-2 в мазках из носоглотки. Флуоресцентная микроскопия. А, Б – легкое течение, единичные вирусные включения в цитоплазме эпителия. В – среднетяжелое течение. Обилие вирусных РНК в клетках эпителия носоглотки. Г – тяжелое течение. Множественные клетки с вирусным поражением. Ув.10*100, иммерсия.

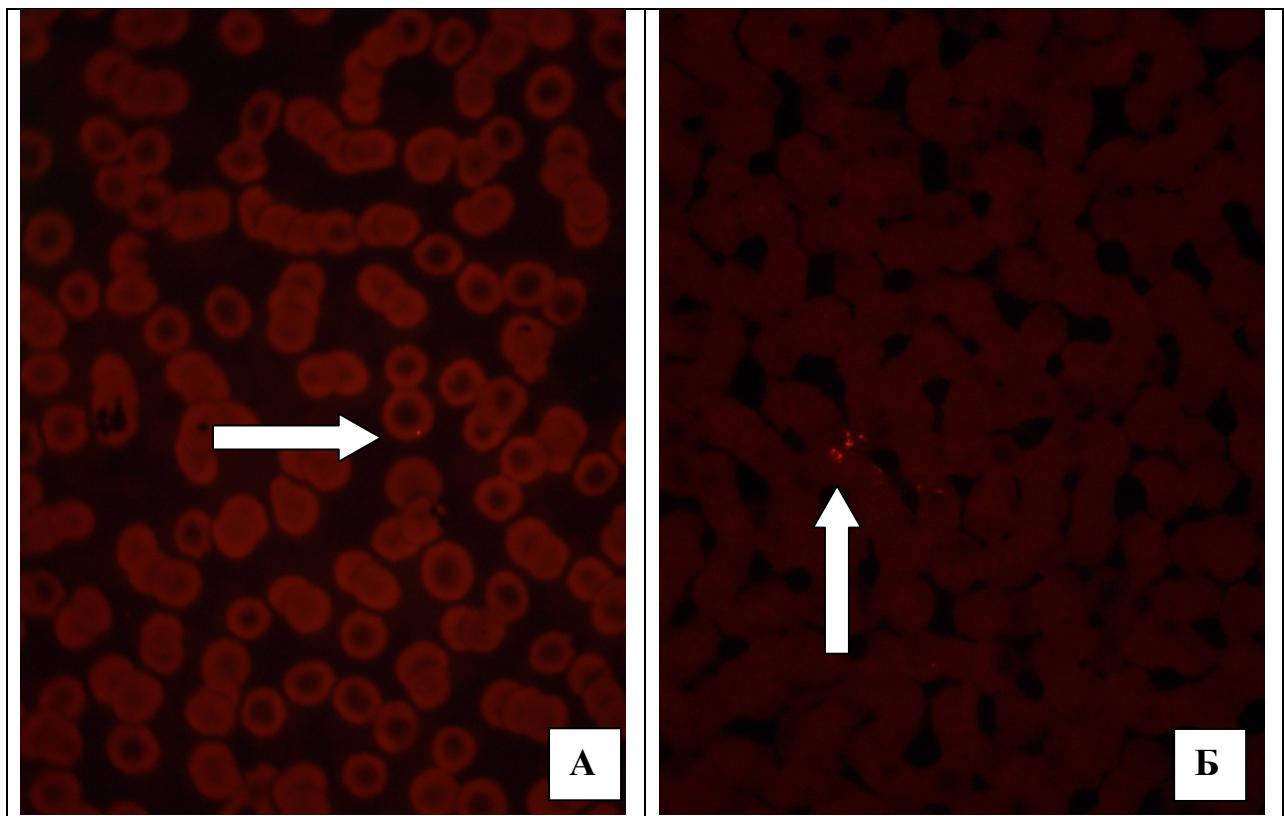


Рис. 3. FISH-реакция на РНК SARS-CoV-2 в мазках крови. Флуоресцентная микроскопия. А - среднетяжелое течение. Единичные фокусы гибридизации вирусной РНК в единичных эритроцитах (показано стрелкой). Б – тяжелое течение новой коронавирусной инфекции. Умеренное количество инфицированных клеток крови (показаны стрелкой). Ув.10*100, иммерсия.

Наибольшая выраженность экспрессии вирусной РНК наблюдалась в тканях внутренних органов лиц, умерших от НКИ. В качестве демонстрации представлены исследования ткани легких и коры головного мозга. В контрольной группе флуоресценция меток АСО-TAMRA отсутствовала, в то время как в случае смерти от НКИ обнаруживалась множественная флуоресценция меток в клетках легких (Рис. 3А). При увеличении 10*100 было видно, что гибридизация меток АСО-TAMRA была как в ядре, так и в цитоплазме (рис. 3Б). В ткани коры головного мозга при световой микроскопии были обнаружены множественные фокусы глыбчатого распада нейронов и глии, представленные на рис. 3В, видимые даже на не окрашенном гематоксилином и эозином срезе. При исследовании данного участка при флюоресценции было обнаружено, что погибшие клетки демонстрировали высокую насыщенность вирусной РНК, давшей гибридизацию с флуоресцентной меткой АСО-TAMRA.

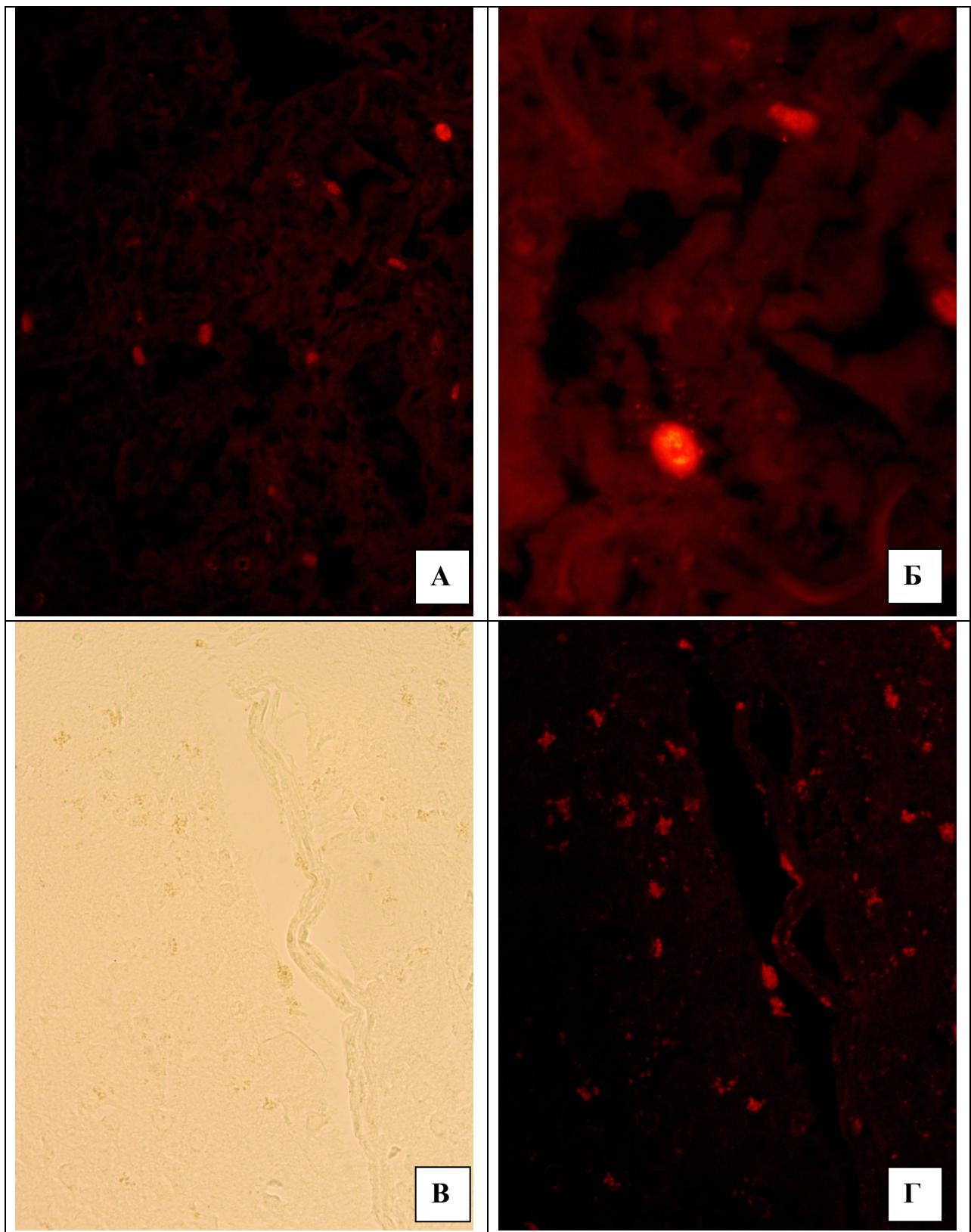


Рис. 3. FISH-реакция на РНК SARS-CoV-2 в тканях легких и мозга (аутопсийный материал). Флуоресцентная микроскопия. А – Многочисленные фокусы репликации вирусных частиц в легких. Ув. 10*40. Б. Ткань легких. Частицы вирусной РНК в ядре и цитоплазме клетки (предположительно, альвеолярный макрофаг). Ув.10*100, иммерсия. В – ткань мозга, множественные очаги глыбчатого распада мозга. Световая микроскопия. Г – тот же препарат. Флюоресценция гибридизованной вирусной РНК в этих же пораженных клетках. Ув. 10*40.

Обсуждение полученных результатов.

В проведенном исследовании было показано, что АСО вида 5'-AGC CGA GTG ACA GCC ACA CAG к участку trs-гена SARS-CoV-2 обладает высокой специфичностью связывания и уникальностью нуклеотидной последовательности. Правильный выбор *in silico* нуклеотидной последовательности блокируемого участка гена и комплементарного ему АСО является гарантией специфичности и отсутствием гибридизационно-зависимой токсичности из-за неспецифической гибридизации с другими однонитевыми нуклеиновыми кислотами в организме (12). Выбор trs-гена обусловлен его высокой консервативностью у коронавирусов. Низкий уровень мутаций этого гена определяет его пригодность для ингибиции транскрипции всего генома коронавируса, что доказывается эффективным подавлением внутриклеточного размножения вируса в реакции ингибиции бляшкообразования в настоящем исследовании. При лечебно-профилактическом применении на культуре клеток значение эффективной дозировки ЭД₅₀, снижающей титр вируса на 50%, составило 3,84 мкг/мл (0,000384% раствор). Учитывая отсутствие токсичности на дозировках вплоть до 100 мкг/мл, химиотерапевтический индекс составляет величину более 28,8. Такие результаты позволяют рекомендовать данный АСО для дальнейшего исследования в качестве перспективного лекарственного препарата от НКИ.

Учитывая консервативность trs-гена SARS-CoV-2, исследуемый АСО может быть также использован для диагностических исследований в реакции флюоресцентной гибридизации *in situ*. Исследование АСО, конъюгированного с красителем TAMRA показало, что данная флюорохромная метка может быть использована в диагностике SARS-CoV-2 в реакции FISH на цитологических препаратах мазков из носоглотки и крови, а также на гистологических препаратах умерших пациентов. Детекция вирусной РНК в FISH-реакции с АСО-TAMRA может визуализировать наличие вирусной РНК в отделяемом носоглотки даже при протекании НКИ в легкой форме. В то же время, при исследовании мазков крови пациентов с НКИ было обнаружено, что детекция вирусной РНК начинается лишь у среднетяжелых и тяжелых пациентов, что связано с проникновением вируса в системный кровоток. Поэтому обнаружение вируса в форменных элементах крови может служить диагностическим маркером проникновения вируса за пределы легочной системы и началом генерализации инфекции. Кроме того, внутриклеточная детекция вирусной РНК с помощью АСО-TAMRA при

отсутствии характерной для НКИ клинической картины может быть признаком скрытого внутриклеточного носительства вируса.

Использование АСО-TAMRA также оказывается эффективным для детекции вирусной РНК в тканях внутренних органов. Данный метод может быть полезен для определения вируса в клинической практике в прижизненной биопсийной диагностике и посмертной диагностике при аутопсии, а также для исследовательских целей для определения механизмов распространения и локализации вируса SARS-CoV-2.

Выводы.

Антисмысловой олигонуклеотид вида 5'-AGC CGA GTG ACA GCC ACA CAG, комплементарный к участку гена *trs* коронавируса SARS-CoV-2 актуален для имеющихся секвенированных последовательностей SARS-CoV-2 и может быть использован для лечебных и диагностических целей.

2. Антисмысловой олигонуклеотид к SARS-CoV-2 вида 5'-AGC CGA GTG ACA GCC ACA CAG с фосфоротиоатной модификацией межнуклеозидного фосфата и 2'-оксиметильной модификацией показал высокую противовирусную активность против SARS-CoV-2 методом оценки ингибирования бляшкообразования. При лечебно-профилактическом применении на культуре клеток значение эффективной дозировки ЭД₅₀, снижающей титр вируса на 50%, составило 3,84 мкг/мл (0,000384% раствор). Учитывая отсутствие токсичности на дозировках вплоть до 100 мкг/мл, химиотерапевтический индекс составляет величину более 28,8.

3. Антисмысловой олигонуклеотид вида 5'-AGC CGA GTG ACA GCC ACA CAG, конъюгированного с флуоресцентной меткой тетраметилродамина (TAMRA), может быть использован в качестве диагностического ДНК зонда для определения РНК вируса SARS-CoV-2 методом флуоресцентной гибридизации *in situ* на цитологических препаратах мазков носоглотки, мазков крови и препаратов тканей внутренних органов.

Литература.

1. Временные методические рекомендации: профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 15 (22.02.2022).

2. Гарафутдинов Р.Р., Баймиев Ан.Х., Малеев Г.В., Алексеев Я.И., Зубов В.В., Чемерис Д.А., Кирьянова О.Ю., Губайдуллин И.М., Матниязов Р.Т., Сахабутдинова А.Р., Никоноров Ю.М., Кулувеев Б.Р., Баймиев Ал.Х.,

Чемерис А.В. Разнообразие праймеров для ПЦР и принципы их подбора. *Биомика*. 2019. Т.11(1). С. 23 – 70. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-04

3. Горячев А.Н., Калантаров С.А., Ткачев В.В., Северова А.Г., Горячева А.С. Потенциальная возможность антисмысловой терапии COVID-19 // Современные проблемы науки и образования. – 2020. – № 6.; URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=30269> (дата обращения: 24.07.2022)

4. Долгов В. В. Клиническая лабораторная диагностика. В 2 томах. Том 2: национальное руководство / Под ред. В. В. Долгова - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2012. - 808 с.].

5. Клиническая лабораторная диагностика: учебник / Под ред. В.В. Долгова, ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования». – М.: ФГБОУ ДПО РМАНПО, 2016 – 668 с.

6. Коржевский, Д.Э. Основы гистологической техники – Коржевский Д. Э. – Практическое руководство. – М : Медицина, 2010 – 234 с.

7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. — М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.

8. Сайфитдинова А.Ф. Двумерная флуоресцентная микроскопия для анализа биологических образцов. Учебно-методическое пособие / ISBN: 978-1-4477-3612-7 СПб: «Свое издательство», 2011. 108 с.

9. Jansen GJ, Wiersma M, van Wamel WJB, Wijnberg ID. Direct detection of SARS-CoV-2 antisense and sense genomic RNA in human saliva by semi-autonomous fluorescence *in situ* hybridization: A proxy for contagiousness? *PLoS One*. 2021 Aug 17;16(8):e0256378. doi: 10.1371/journal.pone.0256378. PMID: 34403446; PMCID: PMC8370601.

10. Kula-Pacurar A, Wadas J, Suder A, Szczepanski A, Milewska A, Ochman M, Stacel T, Pyrc K. Visualization of SARS-CoV-2 using Immuno RNA-Fluorescence *In Situ* Hybridization. *J Vis Exp*. 2020 Dec 23;(166). doi: 10.3791/62067. PMID: 33427241.

11. Neuman B.W., Stein D.A., Kroeker A.D., Churchill M.J., Kim A.M., Kuhn P., Dawson P., Moulton H.M., Bestwick R.K., Iversen P.L., Buchmeier M.J. Inhibition, escape, and attenuated growth of severe acute respiratory syndrome coronavirus treated with antisense morpholino oligomers. *Journal of Virology*. 2005. no. 79. P. 9665-9676.

12. Pharmacology of Antisense Drugs C. Frank Bennett, Brenda F. Baker, Nguyen Pham, Eric Swayze, and Richard S. Geary *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2017. vol. 57. no. 1. P. 81-105.].

13. von Stillfried S, Boor P. Nachweismethoden von SARS-CoV-2 in Gewebe [Methods of SARS-CoV-2 detection in tissue]. Pathologe. 2021 Mar;42(2):208-215. German. doi: 10.1007/s00292-021-00919-8. Epub 2021 Mar 1. PMID: 33646360; PMCID: PMC7919251.