

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ ЕКОЛОГІЧНОЇ БЕЗПЕКИ, ІНЖЕНЕРІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЇ
КАФЕДРА БІОТЕХНОЛОГІЇ

ДОПУСТИТИ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач випускної кафедри

_____ М.М. Барановський

«____» _____ 2020 р.

ДИПЛОМНА РОБОТА

(ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА)

ВИПУСКНИКА ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

ЗА СПЕЦІАЛЬНІСТЮ 162 «БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА БІОІНЖЕНЕРІЯ»

ОСВІТНЬО-

ПРОФЕСІЙНА ПРОГРАМА «ФАРМАЦЕВТИЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ»

**Тема: «Перспективи розробки фармацевтичних препаратів на основі
механізму РНК-інтерференції»**

Виконавець: студент ФБ-205М групи, Кулак М. О. _____

Керівник: д.б.н., професор кафедри біотехнології Гаркава К.Г.

Консультант розділу «Охорона праці»: _____ Павлиш В.Д.

Консультант розділу «Охорона навколишнього середовища»: _____

Рябчевський В.О.

Нормоконтролер:

Дражнікова А.В.

Київ 2020

НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет екологічної безпеки, інженерії та технологій

Кафедра біотехнології

Спеціальність: 162 «Біотехнології та біоінженерія»,

Освітньо-професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ М.М. Барановський

«___» _____ 20__ р.

ЗАВДАННЯ

на виконання дипломної роботи

Кулак Максим Олександрович

1. Тема роботи: «Перспективи розробки фармацевтичних препаратів на основі механізму РНК-інтерференції» затверджена наказом ректора від «15» вересня 2020 р. №1657/ст.
2. Термін виконання: роботи: з 15 вересня по __ грудня 2020 року
3. Вихідні дані роботи: РНК-інтерференція, системи доставки міРНК, літературні дані
4. Зміст пояснювальної записки: ВСТУП; . Перелік обов'язкового ілюстративного матеріалу: 5 таблиць, 6 рисунків.
5. Перелік обов'язкового ілюстраційного матеріалу: таблиць, рисунків

6. Календарний план-графік

№ з/п	Завдання	Термін виконання	Підпис керівника
1	Пошук літературних джерел за темою дипломної роботи	04.09.2020-20.09.2020	
2	Оброблення знайденого матеріалу	30.09.2020-10.11.2020	
3	Написання основної частини	12.11.2020-25.11.2020	
4	Формулювання висновків та рекомендацій	26.11.2020	
5	Перевірка дипломної роботи керівником	02.12.2020	
6	Кінцеве оформлення роботи	03.12.2020	
7	Захист дипломної роботи	22.12.2020	

7. Консультанти з окремих розділів роботи

Розділ	Консультант	Підпис, дата	
		Завдання видав	Завдання прийняв
Охорона праці	Старший викладач Павлиш В.Д.		
Охорона навколишнього середовища	К.д.н доцент кафедри екології Рябчевський В.О.		

8. Дата видачі завдання «___» _____ 2020 року

Керівник дипломної роботи: _____

Гаркава К.Г.

Завдання прийняв до виконання: _____

Кулак М.О.

РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка до дипломної роботи «Перспективи розробки фармацевтичних препаратів на основі механізму РНК-інтерференції»: сторінок, рисунків, таблиць, використаних літературних джерел.

Мета дипломної роботи – вивчити та проаналізувати механізми рнк-інтерференції

Об'єкт дослідження – технологія отримання міРНК

Предмет дослідження – мала інтерферуюча РНК

Методи дослідження – аналітичні, статистичні.

Завдання:

1. Проаналізувати технології отримання міРНК
2. Вивчити ліпідні вектори для доставки міРНК в клітинні мішені
3. З'ясувати які конюгуючі сполуки потрібні для доставки міРНК в клітини мішені

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	5
ВСТУП	9
1 РОЗДІЛ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ	10
1.1.РНК-інтерференція та історія відкриття.....	10
1.3.Молекулярні механізми.....	14
1.4.Біологічні функції	22
1.5.Прикладне застосування	24
1.6.Висновок до розділу	26
2 РОЗДІЛ МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	27
2.1. Хімічні модифікації міРНК.....	29
2.2. Вектори на основі ліпідів для доставки міРНК	30
2.3. Полімер-опосередковані системи доставки міРНК.....	33
2.4. Кон'югатні системи доставки міРНК	38
2.5. Інші можливі системи доставки міРНК.....	40
5 . Висновки до розділу	42
3 РОЗДІЛ АНАЛІЗ РЕЗУЛЬТАТІВ	44
3.1 . Переваги міРНК та бар'єри для міРНК	44
3.2 . Критерії проектування системи доставки міРНК.....	48
3.3 . Потенційні системи доставки ліків міРНК.....	52
3.4. Оримання міРНК.....	53
3.5. Висновок до розділу	55
4 ОХОРОНА ПРАЦІ	59
4.1.Небезпечні та шкідливі виробничі фактори при роботі в лабораторії... 59	
4.2. Технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних та шкідливих виробничих факторів при роботі в лабораторії 60	
4.2.1. Розрахунок штучного освітлення при отриманні міРНК	65
4.3 Забезпечення пожежної та вибухової безпеки в лабораторії	66
4.4. Висновок до розділу	69

5. ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА	71
5.1. Нормативно-правові основи охорони природного середовища	72
5.2. Основи нормування якості об'єктів довкілля та антропогенного навантаження на природне середовище	77
5.3. Проблема промислових стічних вод як найважливіша проблема захисту природних водойм від забруднення.....	81
5.4. Висновок до розділу	86
ВИСНОВОКИ.....	90
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ БІБЛЮГРАФІЧНИХ ДЖЕРЕЛ ТА ПОСИЛАНЬ.....	93

Перелік умовних позначень та скорочень

ВСТУП

Актуальність. З моменту першого невеликого клінічного випробування, пов'язаного з РНК (міРНК), в якому Acuity Pharmaceuticals вводили міРНК шляхом інтравітреального введення пацієнтам з віковою дегенерацією жовтої плями для націлювання на фактор росту судинного ендотелію РНК-повідомлення (мРНК) (Таблиця 1), стало ясно, що кожен ген, пов'язаний із захворюванням, є потенційною мішенню для міРНК. Враховуючи, що більшість захворювань, що зачіпають людську популяцію, пов'язані з якоюсь формою аберрантної регуляції генів, можливе використання siRNA та РНК-інтерференції (РНКі), а також інгібіторів на основі нуклеїнових кислот, як терапевтичні засоби є надзвичайно привабливим із широким спектром захворювань, включаючи рак, вірусні інфекції та генетичні та метаболічні порушення (Таблиця 1). Навіть маючи нашу сучасну велику інформацію про транскриптом людини, розробка терапії на основі siRNA представляє величезну проблему, і лише кілька сполук-кандидатів потрапили до клінічних випробувань. Тим не менше, збільшення знань про механізм та механізми РНКі має допомогти науковому співтовариству просувати РНКі як успішну терапевтичну модальність.

Метою роботи: вивчити та проаналізувати механізми рнк-інтерференції

Для досягнення мети було поставлені такі завдання:

1. Проаналізувати технології отримання міРНК
2. Вивчити ліпідні вектори для доставки міРНК в клітинні мішені
3. З'ясувати які конюгуючі сполуки потрібні для доставки міРНК в клітини мішені.

Об'єкт дослідження – технологія отримання міРНК

Предмет дослідження – мала інтерферуюча РНК

Методи дослідження – аналітичні, статистичні.

1 РОЗДІЛ

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1.1.РНК-інтерференція та історія відкриття

Оригінальне відкриття явища, що стосується РНК-інфекції, може бути ретроспективним до 1990 року. Наполі та Йоргенсен стверджували про індуковане трансгеном «косупресію» гена ендогенної халконсинтази під час генерації гібридизованих фіолетових петуній[1]. Пізніше, у 1992 р., Подібне явище спостерігали Романо та Макіно у *Neurospora crassa* [2]. Вони описали "придушення" ендогенного гена, спричинене введенням гомологічних послідовностей РНК. Однак вперше про РНК-події у тварини повідомляли у *Caenorhabditis elegans* Гуо і Кемфуес до 1995 р., Зазначивши, що введення чуттєвої або антисмислової РНК може призвести до деградації пар-1 мРНК. У той час гомологічна антисмислова РНК розглядалася як інструмент мовчання для гібридизації з ендогенними мРНК, а потім утворює дволанцюжкову РНК для зупинки трансляції. Го і Кемфуз використовували лише сенс РНК -1 РНК не має гібридизаційної здатності з ендогенною транскрипцією пар-1 при їх валідації. Цікаво, що деградація мРНК пар-1 все ще спостерігалася. Результати викликали питання та невизначеність механізму потенційного регулювання, який залишається невиявленим[3].

Продовживши розслідування цих парадоксальних висновків, Фаєр і Мелло опублікували статтю, де вказали можливі пояснення "супресії, гасіння та відчуття мРНК" проти ендогенних генів у 1998 р[4]. У своїх моделях *C. elegans* вони використовували обидві очищені одноланцюгові РНК і дволанцюгові РНК (длРНК), націлені на мРНК unc-22 ген. ДлРНК постійно демонстрували хорошу ефективність, у результатах приглушення генів окремої та цілої популяції. Вони припустили, що длРНК може бути пусковим механізмом стехіометричного імплікативного інтегрування проти ендогенної

мРНК *in vivo*, а можливі каталітичні або ампліфікаційні компоненти відігравали важливу роль під час процесу інтерференції. Ці регіональні ефекти, що переростають у системне мовчання, вимагали стабільної проміжної системи. Тоді Гамільтон і Болкомб вперше продемонстрували існування стабільної проміжної системи у рослин на підтримку цієї гіпотези. Вони припустили, що длРНК потрібно розмотати, а антисмисловий ланцюг РНК служив орієнтиром для зв'язування з мРНК. Хоча антисмислового ланцюга в повній довжині ніколи не було знайдено, для конкретного зв'язування на основі їх спостереження потрібно приблизно 25 пар основ антисмислової РНК[5]. Крім того, ще дві різні групи виявили, що 21–23 пар основ РНК завжди можна очистити відклітин дрозоді за допомогою РНКі, пропонуючи скоротити перетворення опосередкованого длРНК розщеплення цільової транскрипції[6]. Крім того, дослідники використовували 21–22 пар основ синтезовану хімічним способом длРНК для визначення цієї системи у різних видів, виявивши, що коротке опосередковане дзРНК мовчання гена існує також у клітинах ссавців[7]. Ambros ігрової групи виявила як лін-4, і нехай 7- гени можуть кодувати короткі тимчасовий зрілий РНК довжиною від 22 пар основ в *C. elegans*. Далі ці короткі РНК були ідентифіковані як мікроРНК[8]. Подальше дослідження показало, що послідовності геномів, як правило, утворюють шпильки, і ці послідовності стовбурових петель як попередники РНК є джерелом мікроРНК. Було продемонстровано, що мікроРНК впливає на регуляцію генів на посттранскрипційному рівні у різних видів[9].

Було встановлено, що речовиною, яка безпосередньо призводить до приглушення генів, є мала міРНК. Отже, як утворюється мала длРНК? Команда Бернштейна виявила, що РІСК, відповідальний за розщеплення мРНК, може бути зібраний високошвидкісним центрифугуванням, тоді як короткі перетворені фрагменти длРНК все ще залишаються в супернатанті, що вказує на фазу ініціації розщеплення длРНК в міРНКі фазу ефекту руйнування розщеплення мРНК є результатом дві різні ферментативні

активності[10]. Група Хеннона припустила, що ферментом ініціюючої фази має бути рибонуклеаза длРНК, а потім обрала різні ферменти сімейства РНКазид III для дослідження[8]. Використовуючи маркування міток епітопу Т7 та імунопреципітацію для кількісного визначення виходу міРНК21–23 пар основ різних ферментів РНКазид III, вони виявили, що тільки фермент, кодований геном CG4792, мав регуляторну активність і назвали його “Dicer”. Тоді група Сонтгеймера підтвердила, що виснаження Dicer призведе до втрати продукції міРНКі не призведе до подальшого мовчання на різних генах-мішенях[11].

З іншого боку, первинна ідентифікація РІСК була проведена командою Тушля з клітин HeLa від раку шийки матки людини[9]. Вони використовували біотин для кон'югації з 3'-кінцевими міРНК, щоб коімунопреципітувати цілі асоційовані білкові комплекси. Після очищення виділяли Argonaute 1 та Argonaute 2 (Ago1 та Ago2). У 2004 році група Джошуа-Тора очистила білок аргонавтів від архебактерії *Pyrococcus furiosus* (PfAgo). PfAgo має високу схожість з ферментами РНКазид II, і має два однакових каталітичних карбоксилата аспартат-аспартат-глутамат, які також необхідні для розщеплення в РНКазид II. На підставі цих результатів Джошуа-Тор співпрацює з Група Хеннона використовувала імунопреципітацію для дослідження активності комплексів Ago1-4 в клітинах 293Т[12]. Результати показали, що міРНК зв'язані з усіма білками Ago, але лише комплекс Ago2 мав активність розщеплення. Хеннон намагався мутувати ключові амінокислоти домену PIWI в Ago2. Мутований Ago2 може зв'язуватися лише з міРНК, але не має здатності до розщеплення. Окрім діяльності з розщеплення, те, як сиРНК зв'язуються з РІСК, також викликало великий науковий інтерес. Докази показують, що в РІСК були знайдені лише одноланцюгові міРНК, що вказувало на потенційний механізм розмотування та зв'язування. Як команда Грегорі, так і команда Матранги виявили, що Ago2 має функцію РНК-гелікази для розмотування дуплексних міРНК, використання одного направляючого ланцюга для пошуку комплементарної

мРНК, що залишився анти-направляючий ланцюг буде розщеплений і видалений [13, 14]. Цей механізм є важливим для активації РІСК. Незважаючи на те, що Ago2 виконує функцію розщеплення як міРНК, так і цільової mRNA, лише білок Ago2 не міг завербувати будь-яку міРНК. Для події РНКі дослідники виявили, що необхідний РІСК, що складається з Dicer, Ago2 та TRBP (білок, що зв'язує РНК ВІЛ-1 TAR). TRBP допомагає завербувати комплекс Dicer в Ago2, який утворює потрійний комплекс, індуюючи діяльність РНКі.

Ефект РНКі може бути викликаний дуже незначною індукцією і систематично передаватися всьому організму. Дослідники спостерігали і визнавали, що механізм потенційного посилення РНК-залежної РНК-полімерази може використовувати відхилені накопичені РНК як шаблони для генерування вторинних міРНК проти тієї самої мРНК, а потім викликати специфічну деградацію послідовностей, і цей процес отримав назву "транзитивність" [15]. Механізм потенційного посилення РНК-залежної РНК-полімерази відіграють важливу роль у різних формах ампліфікації РНКі. В арабідопсисі негрунтовані механізм потенційного посилення РНК-залежної РНК-полімерази використовували розщеплені фрагменти 5' і 3' мРНК як субстрати для отримання довгих длРНК. Потім ці длРНК розрізали Dicer для генерування вторинних міРНК та індукованої деградації мРНК. Але в *C. elegans* був описаний інший механізм. Непримітовані механізм потенційного посилення РНК-залежної РНК-полімерази можуть безпосередньо використовувати первинні міРНК як шаблонні субстрати. Завдяки процесу транзитивності, незалежні від Dicer вторинні міРНК були безпосередньо синтезовані і показали однакові властивості послідовності, специфічної деградації на тій самій мРНК [16].

Завдяки постійному збагаченню знань щодо формування та функціональної діяльності РІСК, розуміння всієї концептуальної системи РНКі значно покращилось. Дослідження спрямовано на інші важливі

компоненти, оскільки регуляція трансляції мРНК [17]. та центр розпаду мРНК [18].були швидко проведені протягом наступних кількох років.

Синтетичні малі інтерферуючі РНК (міРНК) є необхідним інструментом для дослідження функції генів у клітинах еукаріотів і можуть бути використані в терапевтичних цілях для збиття генів, причетних до захворювання. Наразі більшість синтетичних міРНК отримують за допомогою хімічного синтезу.

1.2.Молекулярні механізми

З'ясування механізмів РНКі з'являється як двофазна механістична модель, заснована на відкриттях та дослідженнях ключових компонентів регулювання. Ця комбінація включає фазу ініціації, довгі длРНК розщеплюються на ~ 21-25 послідовності дискретних малих фрагментів РНК міРНК; і ефекторну фазу міРНК, що включає багатоядерний комплекс РІСК, щоб індукувати подальше розщеплення та деградацію гомологічної мРНК.

На фазі ініціації міРНК генерувались при розщепленні довгих длРНК за допомогою ендонуклеазного дизеру III типу (Рис. 1). Dicer вперше був ідентифікований як мультидоменний фермент РНКазу у дрозофіли . Він має дві форми існування: Dicer-1 / Loquacious (R3D1-L), що продукує мікроРНК, і Dicer-2 / R2D2, який продукує міРНК. Dicer-1 та Dicer-2 поділяють структурні особливості гомології, але мають різні властивості, такі як залежність від АТФ та специфікації субстрату[19].

Dicer-1 - це АТФ-незалежний фермент, який працює як попередник, пов'язаний з біогенезом мікроРНК[20]. Попередні дослідження показали, що Dicer-1 повинен працювати разом з дволанцюговим білком, що зв'язує РНК (длRBDP). У дрозофіли виявлено, що длRBDP Loquacious (Loqs) має взаємодію з Dicer-1[20]. експериментів з ко-імунопреципітацією очистили функціональний комплекс обробки попередньої мікроРНК, що містить як Loqs, так і Dicer-1. Цей комплекс безпосередньо активував та брав участь у

діяльності з обробки пре-мікроРНК. Структурний аналіз показав, що лише Loqs-PA і Loqs-PB серед видів білків Loqs мають три домени, що зв'язують длРНК (длRBD), і Loqs-PB може збільшити спорідненість Dicer-1 до пре-мікроРНК[20].

Dicer-2 - це АТФ-залежний фермент, який показав субстратну специфічність до дсРНК. 19 Поділяючи структурну гомологію з Dicer-1, Dicer-2 також повинен працювати разом із dsRBDP-R2D2. Dicer-2, асоційований з R2D2, може утворювати функціональний гетеродимерний комплекс[19, 20]. На відміну від Loqs, R2D2 має лише два длРНК-зв'язуючих домени, які можуть взаємодіяти з довгими длРНК, але не регулює діяльність генерації міРНК. R2D2 відіграє важливу роль у розвитку та стабільності Dicer-2. Він продемонстрував, що обидва домени зв'язування длРНК R2D2 та Dicer-2 є важливими для процесу зв'язування комплексу Dcr-2 / R2D2 з міРНК, а потім завантажують їх у РІСК[21]. Структурний аналіз показав, що Dicer-2 має домен РНК-гелікази, домен DUF283, домен PAZ N-кінця, тандемні мотиви РНКази III та мотив dsRBD кінця С. Оскільки Dicer-2 або R2D2 самостійно не зв'язуються з міРНКs, що вказує, що міРНК може зв'язуватися з інтерфейсом між R2D2 і Dicer-2, то це викликало конформаційні зміни в комплексі, що дозволяє їм координовано зв'язувати міРНК для сприяння складанню комплексів siРІСК[21].

У ефекторній фазі одноланцюгові міРНК або мікроРНК працюють як направляючі ланцюги, включені в ефектор РНКі, такі як РНК-індукований мовчазний комплекс (РІСК), який розщеплює мРНК і пригнічує трансляцію, або РНК-індукований транскрипційний мовчальний комплекс (РІТМК), який регулює гетерохроматиновий склад (Рис. 1).

Структурний аналіз показав, що РІСК складається з білків домену PZWI PAZ (PPD). Білки PPD мають 100 амінокислот PAZ у центральній та 300 амінокислот PIWI у С-терміналі. Дослідники виявили, що білки PPD в РІСК є білками Ago. Білки PPD виконують різні функції в різних системах. Наприклад, PPD, RDE-1 та PPW-1 у *C. elegans* відповідають за ефективне

опосередкування міРНК розщепленням мРНК; Ago-2 у дрозофіли опосередковує включення міРНК в РІСК; а hAgo-2 у Homo sapiens призначений для розщеплення мРНК, необхідної каталітичної активності.

Під час попереднього дослідження дослідники виявили, що важко очистити повний еукаріотичний білок Ago. 12 Таким чином, дослідження прокаріотичного гомолога РНКазини Н рибонуклеази проводили для імітації білка Ago. Структурний аналіз виявив, що білки Ago складаються з N-кінця, домену PAZ, домену Middle та PIWI. Функціональний аналіз показав, що білок Ago є каталітичною субодиницею РІСК[22]. Визначено взаємозв'язок кристалічної структури білка Ago у повному розмірі з архебактерії *P. furiosus* (PfAgo). PAZ та PIWI були визначені як функціональні домени серед чотирьох основних доменів[12].

міРНК зв'язується з Dicer-2 / R2D2, утворюючи комплекс ініціатора R2D2 Dicer (RDIC). У моделі РНКі було виявлено, що RDIC має перевагу щодо орієнтаційного зв'язування: 5' кінці з нижчою температурою плавлення в дуплексі міРНК мають тенденцію взаємодіяти з Dicer-2 менш стабільним кінцем, тоді як більш стабільний кінець міРНК має тенденцію зв'язуватися з R2D2. Ці результати, висунуті гіпотезою термодинамічної асиметрії, є причиною поділу напрямної нитки та пасажирської нитки[23]. Подальше дослідження виявило, що ферменти, відповідальні за складання РІСК, виконують функцію відбору вбудованого ланцюга міРНК на основі структури. Це вказує на структуру міРНК, що визначає перевагу орієнтації комплексу Dicer-2 / R2D2, а потім призводить до вибору напрямного ланцюга, включеного в РІСК.

Залежний від Ago2 комплекс був ідентифікований як пре-РІСК, що містить дуплексну міРНК. Голо-РІСК характеризувався як РІСК після ефективного видалення пасажирської нитки. Дослідження показали, що Ago2 відповідає за перетворення пре-РІСК в голо-РІСК[23]. Для ефективного РНКі потрібні 5' кінці міРНК, що виступають в якості орієнтира для розпізнавання

цілі. Тоді Ago-2 як каталітична субодиниця голо-RISC, що має подібні до РНКаз Н активності, буде індукувати розщеплення цільової основи мРНК.

Дослідники також виявили, що особливе приглушення генів може бути викликане лише невеликою індукцією в цілому організмі, що вказує на механізм потенційного посилення. РНК-залежної РНК-полімерази може допомогти синтезувати нові послідовності гомології, які будуть набрані для знищення тієї самої мішені[24]. Під час процесу ампліфікації Механізм потенційного посилення. РНК-залежної РНК-полімерази може безпосередньо синтезувати нову міРНК або використовувати введenu міРНК як шаблон для генерування довгих длРНК, які потім розщеплюються на міРНК. Дослідження показали, що нещодавно синтезовані фрагменти міРНК мали 24–26 нт замість 20–22 нт, тоді ці фрагменти знову приєднуються до циклу виробництва довгих длРНК і підтримують процес ампліфікації[24].

міРНК - це синтетичні медіатори РНКі, які є молекулами длРНК довжиною від 21 до 23 пар основ, призначених спеціально для придушення експресії генів-мішеней. Вони можуть вводитися екзогенно в клітину або організм у короткій (21–23 bp) формі або у формі довгих молекул длРНК. Ці длРНК обробляються ендогенними механізмами РНКі після введення в клітину (Рис. 1). По-перше, цитозольний фермент Dicer розщеплює довгі dsРНК на коротші фрагменти (міРНКs), залишаючи два нуклеотидні (2-nt) 3' звиси та 5' фосфатні групи [9 , 10]. міРНКs розпізнаються ферментним комплексом AGO2-RISC, де одна з ланцюгів деградує, а інша (переважно антисмислова) ланцюг залишається в якості орієнтира для пошуку послідовностей мРНК-мішені. На відміну від мікроРНК, міРНК пов'язують послідовності з ідеальною або майже ідеальною комплементарністю і викликають розщеплення мішеней замість трансляційного придушення [11 , 12]. Оскільки вони можуть ефективно замовчувати експресію генів-мішеней специфічно для послідовності, міРНК стали необхідними інструментами для вивчення функції окремих генів [11 , 13].

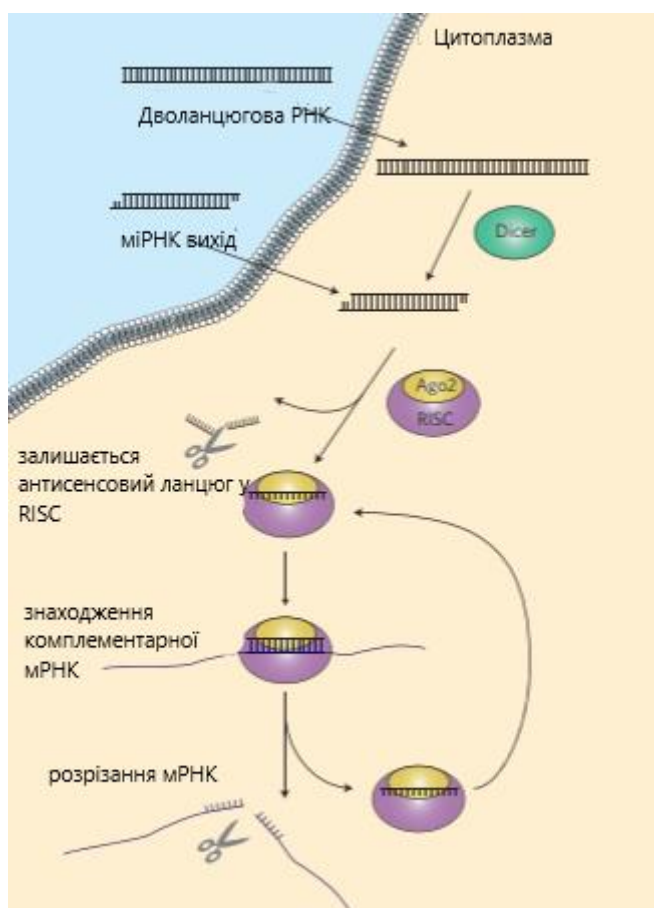


Рис.1. Механізм РНК-інтерференції.

мікроРНК - це невеликі некодуючі длРНК, транскрибовані геномом. Спочатку вони були знайдені як складні стовбурові петлі або короткі шпилькові структури, які називаються пре-мікроРНК (Рис. 1). пре-мікроРНК переробляються Drosha в пре-мікроРНК в ядрі, з подальшим транспортуванням пре-мікроРНК до цитоплазми через експортін-5. Фермент цитоплазматичної РНКазиди III, який називається Dicer, розщеплює пре-мікроРНК на коротші дволанцюгові мікроРНК з недосконалою комплементарністю. Ці короткі фрагменти розпізнаються за допомогою Argonaute 2 (AGO2) та РНК-індукованого мовчазного комплексу (RISC), де одна з ниток деградує, а інша нитка направляє AGO2-RISC для зв'язування та блокування трансляції цільових мРНК, що мають часткові комплементарні сайти зазвичай знаходиться в 3'УТР [7 , 8].

міРНК зв'язується з Dicer-2 / R2D2, утворюючи комплекс ініціатора R2D2 Dicer (RDIC). У моделі РНКі було виявлено, що RDIC має перевагу

щодо орієнтаційного зв'язування: 5' кінці з нижчою температурою плавлення в дуплексі міРНК мають тенденцію взаємодіяти з Dicer-2 менш стабільним кінцем, тоді як більш стабільний кінець міРНК має тенденцію зв'язуватися з R2D2. Ці результати, висловлені гіпотезою термодинамічної асиметрії, є причиною поділу напрямної нитки та пасажирської нитки. 23 Подальше дослідження виявило, що ферменти, відповідальні за складання РІСК, виконують функцію відбору вбудованого ланцюга міРНК на основі структури. Це вказує на структуру міРНК, що визначає перевагу орієнтації комплексу Dicer-2 / R2D2, а потім призводить до вибору напрямного ланцюга, включеного в РІСК.

Залежний від Ago2 комплекс був ідентифікований як пре-РІСК, що містить дуплексну міРНК. Голо-РІСК характеризувався як РІСК після ефективного видалення пасажирської нитки. Дослідження показали, що Ago2 відповідає за перетворення пре-РІСК в голо-РІСК. 23 Для ефективної РНКі потрібні 5' кінці siRNA, що виступають в якості орієнтира для розпізнавання мішеней. Тоді Ago-2 як каталітична субодиниця голо-РІСК, з подібними до РНКазі Н активностями, буде індукувати розщеплення цільової основи м-РНК.

Дослідники також виявили, що особливе приглушення генів може бути викликане лише невеликою індукцією у цілому організмі, що вказує на механізм потенційного посилення. РНК-залежна РНК-полімераза (РзРП) може допомогти синтезувати нові послідовності гомології, які будуть набрані для знищення тієї самої мішені. 24 Під час процесу ампліфікації РзРП може безпосередньо синтезувати нову міРНК або використовувати введenu міРНК як шаблон для генерування довгих длРНК, які потім розщеплюються на міРНК. Дослідження показали, що нещодавно синтезовані фрагменти міРНК мали 24–26 нт замість 20–22 нт, тоді ці фрагменти знову приєднуються до циклу виробництва довгих длРНК і підтримують процес ампліфікації. 24У дріжджів *S.pombe* пригнічення транскрипції забезпечує РІТМК-комплекс, який містить аргонавт, білок Chp1 із хромоменом (домен, який знаходять у

білків, пов'язаних із організацією і перебудовою хроматину), та білок із невідомою функцією Tas3 [31]. Для індукції утворення ділянок гетерохроматину необхідний фермент дайсер, а також білок-аргонавт і РНК-залежна РНК-полімераза [32-33]. Делеція цих генів у *S.pombe* порушує метилювання гістонів і формування центромер [34]., через що поділ клітини зупиняється або сповільнюється в анафазі [35].

Для підтримання вже сформованих ділянок гетерохроматину РІТМК формує комплекс із міРНК, комплементарними до генів у даній ділянці, і стабільно зв'язується із метильованими гістонами. Цей комплекс забезпечує котранскрипційну деградацію будь-яких пре-мРНК, синтез яких ініціює РНК-полімераза. Вважається, що ділянки гетерохроматину підтримуються на основі позитивного зворотного зв'язку, через те що нові міРНК формуються РНК-залежною РНК-полімеразою із випадкових транскриптів і включаються в комплекс РІТМК [36]. Всі описані дані були отримані тільки для *S.pombe*, у ссавців підтримання ділянок гетерохроматину може бути РНКі-незалежним [37].

Найбільш розповсюдженою формою редагування РНК у вищих еукаріот є перетворення аденозину в інозин у дволанцюгових РНК, яке здійснюється ферментом аденозиндеаміназою [38]. У 2000 році було припущено, що шлях РНК-інтерференції і шлях редагування РНК А→І можуть конкурувати за спільний субстрат — дволанцюгову РНК [39]. Справді, деякі пре-мікроРНК можуть підлягати редагуванню А→І [40-41]., причому цей механізм може регулювати процесинг та експресію зрілих молекул мікроРНК [41]. У ссавців описаний як мінімум один фермент РНК-редагування, що може вивести молекули міРНК із системи РНКі [42]. Дослідження лінії *C.elegans*, що не має генів редагування А→І, показали, що редагування РНК може запобігати пригніченню експресії ендогенних генів і транскриптів по шляху РНКі [43].

Організми відрізняються між собою по здатності сприймати чужорідні дволанцюгові РНК і використовувати їх у процесі РНК-інтерференції. У

рослин та *C.elegans* (але не в дрозоді та ссавців) ефект РНК-інтерференції може бути системним: введення навіть невеликої кількості длРНК у клітини викликає пригнічення експресії відповідного гену у всьому організмі, у *C.elegans* ефект РНКі може навіть успадковуватись. Для системної дії РНКі сигнал повинен ампліфікуватись та передаватись між клітинами. В ампліфікації сигналу бере участь РНК-залежна РНК-полімераза; вважається, що міРНК може виступати праймером для синтезу наступних молекул дволанцюгової РНК, що стане субстратом для ферменту дайсер [45]. Транспорт міРНК у рослин може відбуватись по плазмодесмах [20]. Успадкування ефектів РНКі у рослин може бути незалежним від самих РНК, а забезпечуватись метилуванням промоторів відповідних генів, змінений характер метилування передається кожній із дочірніх клітин при поділі [46].

Основні відмінності у механізмі РНКі в тварин та рослин полягають у тому, що в рослин ендогенні мікроРНК ідеально комплементарні до мРНК мішені і в комплексі з РІСК викликають деградацію цієї РНК. У тварин мікроРНК не повністю комплементарні до гену-мішені і викликають пригнічення трансляції [44]., наприклад шляхом запобігання взаємодії факторів ініціації трансляції та полі-(А)-хвоста мРНК [47].

У деяких еукаріот, наприклад, паразитичних одноклітинних *Leishmania major* та *Trypanosoma cruzi* всі компоненти РНКі відсутні [48-49]. Велика частина компонентів системи РНК-інтерференції також відсутня і у деяких грибів, наприклад у пивних дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* [50]. В інших дріжджів, що розмножуються брунькуванням, наприклад у *Saccharomyces castellii* та *Candida albicans* присутні всі компоненти РНК-інтерференції. Перенесення двох білків системи РНКі із *S.castellii* у клітини *S.cerevisiae* робить можливою РНК-інтерференцію в останніх [51]. . Той факт, що деякі аскоміцети та базидіоміцети не мають шляху РНК-інтерференції вказує на те, що гени, які кодують білки необхідні для даного процесу, були втрачені незалежно у багатьох філогенетичних гілках грибів, ймовірно, через

еволюцію нового шляху зі схожими функціями, або через втрату адаптивної переваги в даних екологічних нішах [52].

В прокариот експресія генів залежить від РНК-залежної системи, схожої до РНКі: РНК-кодуючі гени контролюють кількість мРНК та трансляцію через утворення комплементарних РНК, що приєднуються до мРНК. Проте ці регуляторні РНК не вважаються гомологічними до мікроРНК, оскільки фермент дайсер не задіяний в їх утворенні [53]. Також припускається, що система інтерференції CRISPR (короткі паліндромні повтори, регулярно розміщені групами), яка забезпечує бактеріям захист від бактеріофагів, є аналогом еукаріотичної системи РНК-інтерференції. Проте жоден із білкових компонентів цих двох систем не є гомологічними [54].

1.3. Біологічні функції

Система РНК-інтерференції — важлива частина імунної відповіді на віруси та інший генетично чужорідний матеріал, особливо у рослин, в яких вона також обмежує розповсюдження транспозонів [55]. Рослини (наприклад *A.thaliana*) мають кілька гомологів білка дайсер, які використовуються проти різних типів вірусів [56]. У рослин РНКі, що виникає у відповідь на зараження вірусом, має системний характер — тобто може розповсюджуватись по всьому тілу рослини, і навіть передаватись від підщепи до прищепи [57]. Отже РНКі є механізмом набутого противірусного імунітету у рослин. У відповідь у ході еволюції багато вірусів розвинули механізми пригнічення РНК-інтерференції у клітинах рослин [58]. Описано вірусні білки, що можуть зв'язувати короткі дволанцюгові РНК із двонуклеотидними виступами на кінцях, які є продуктами ферменту дайсер [59]. Деякі рослини після зараження певними бактеріями починають експресувати ендogenous міРНК [60]. Така реакція може бути частиною генералізованої відповіді організму на патогени, що здійснюється шляхом пригнічення багатьох метаболічних процесів [61].

Хоча в клітинах тварин, як правило, експресується менше варіантів білка дайсер, ніж у рослин, система РНКі може брати участь в антивірусній відповіді і в них. РНКі відіграє важливу роль у вродженому протівірусному імунітеті, зокрема захищає від Х-вірусу дрогофіли ювенільні і дорослі особини *D.melanogaster* [62-63]. Подібну роль в імунітеті система РНКі відіграє у *C.elegans*: експресія білків-аргонавтів підвищується при вірусній інфекції, при цьому нематоди отримують стійкість до вірусних інфекцій [64-65].

Роль РНКі у вродженому імунітеті ссавців не повністю досліджена. Однак той факт, що деякі віруси ссавців містять гени, які можуть пригнічувати цю систему в клітинах хазяїна, свідчить про те, що РНКі може бути частиною протівірусного імунітету ссавців[66-67]. . Проте ця гіпотеза поки не має достатнього підґрунтя і потребує подальших досліджень [68]. Віруси ссавців можуть використовувати РНК-інтерференцію і в інших цілях, наприклад малі інтерферуючі РНК, що експресуються вірусом герпесу, можуть викликати утворення гетерохроматину, що призводить до переходу вірусу в латентний стан [69].

МікроРНК у геномі більшості еукаріот відіграють важливу роль у заглушенні експресії інших генів [44]. та у регуляції розвитку, особливо у визначенні часу морфогенезу та підтриманні недиференційованих або не повністю диференційованих типів клітин, таких як стовбурові клітини [70]. Роль ендогенних мікроРНК у заглушенні експресії генів була вперше описана у *C. elegans* у 1993 році [71]. У рослин таку функцію виявили, коли було показано, що «JAW мікроРНК» *A.thaliana* задіяна у регуляції кількох генів, що визначають форму рослини [72]. У рослин більшість генів, на експресію яких впливають мікроРНК, — це гени транскрипційних факторів [73]., таким чином розмах активності РНКі дуже широкий, вона регулює цілі сітки генів під час ембріогенезу і впливає на експресію головних регуляторних генів, включаючи фактори траснкрипції та білки F-box [74]. У багатьох організмів, в тому числі і в людей, мікроРНК також можуть бути пов'язані із

формуванням пухлин та пригніченням клітинного циклу. В цьому випадку окремі мікроРНК можуть діяти і як онкогени, і як супресори пухлинного росту [75].

РНК-послідовності (міРНК або мікроРНК), комплементарні до ділянок промотора, можуть підвищувати транскрипцію відповідних генів, цей феномен назвали РНК-активацією. У даному механізмі активації генів беруть участь білки дайсер та аргонавти[76-77].

1.4. Прикладне застосування

Шлях РНК-інтерференції часто використовується в біології для вивчення функцій окремих генів, як у культурах клітин, так і *in vivo* [1]. Дволанцюгова РНК, один із ланцюгів якої комплементарний до досліджуваного гену, вводиться у клітину або організм, де вона розпізнається як чужорідна і активує РНК-інтерференцію. Використовуючи цей механізм, вчені можуть дуже сильно знизити експресію гена-мішені. Вивчення впливу «вимикання» відповідного гену на організм чи клітину дає можливість робити висновки про фізіологічну роль продукту даного гену. Оскільки РНКі не повністю усуває експресію гена, а тільки дуже суттєво її знижує, така методика називається «нокдауном» гену, на протипагу до «нокауту» гену, за якого ген повністю видаляється [81]. .

Зусилля біоінформатики спрямовані на те, щоб розробити цільові дволанцюгові РНК, які будуть мати максимальний вплив на ген-мішень і мінімальні побічні ефекти. Побічні ефекти виникають, коли введена в клітину РНК має спільні нуклеотидні послідовності з кількома генами і впливає на них всі. Дослідження геномів *H. sapiens*, *C. elegans* та *Schizosaccharomyces pombe* показали, що близько 10% можливих міРНК будуть діяти на гени, відмінні від своєї мішені [82]. Розроблена велика кількість програмного забезпечення для підбору послідовностей міРНК [83-84]., в тому числі специфічних для ссавців [85]. і вірусів [86]. Ці програми

автоматично перевіряють можливість перехресного реагування із послідовностями інших генів.

В залежності від виду організму та експериментальної системи, екзогенні РНК можуть бути або довгими, у такому разі вона має стати субстратом для розщеплення дайсером, або короткими фрагментами, що є вже готовими молекулами міРНК. Для більшості клітин ссавців використовують короткі РНК, оскільки довгі дволанцюгові РНК можуть запускати інтерферонову відповідь — форму вродженого імунітету, яка неспецифічно реагує на будь-який чужорідний генетичний матеріал [87]. У миші в яйцеклітинах та клітинах ембріонів ранніх стадій така реакція на чужорідну длРНК відсутня, тому ці клітини є поширеними моделями для вивчення ефектів нокдауну генів у ссавців [88]. Для покращення роботи РНКі у клітинах савців уникаючи прямого введення міРНК, використовують метод плазмідного введення [89]. Складніша процедура, в якій використовуються лентівірусні вектори, передбачає можливість індукованої активації або деактивації транскрипції, і відома під назвою умовна РНКі [90-91].

Методи функціональної геноміки, що використовують РНКі, зазвичай застосовують для *C. elegans* [93]. та дрозоділи [94]., через те що у цих модельних організмів РНКі найбільш ефективна. *C. elegans* — особливо зручний об'єкт з двох причин: по-перше, ефекти пригнічення експресії генів у неї успадковуються, по-друге — доставка длРНК надзвичайно проста. Хоча механізм цього явища не цілком зрозумілий, при згодовуванні бактерій, наприклад *E. coli*, які експресують потрібну РНК, нематоді, РНК проходить через травну систему у клітини *C. elegans*. Така «доставка годуванням» настільки ж ефективна, як і інші, дорожчі методи, наприклад занурення нематоди у розчин длРНК або введення останньої у гонади [95]. Хоча в інших організмів доставка значно складніша, прикладається багато зусиль щодо використання методів РНКі у широкомасштабному геномному скрінінгу в культурах клітин ссавців [96].

1.5. Висновок до розділу

Отже, РНК-інтерференція є багатообіцяючим інструментом у лікуванні багатьох захворювань, проте дуже важливо проводити ретельні пре-клінічні дослідження та оцінку імовірності неспецифічних взаємодій.

Перший препарат на основі малих інтерференційних олігонуклеотидів, патісіран був дозволений FDA США в серпні 2018 року та спрямований на лікування поліневриту, що виникає в результаті рідкісного спадкового захворювання — спадкової амілоїдної полінейропатії[en]. Олігонуклеотиди призводять до пригнічення синтезу ненормального мутованого білка транстиретину[89].

2 РОЗДІЛ

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Природно, що РНКі є важливим захисним механізмом, за допомогою якого еукаріотичні клітини можуть деградувати екзогенні гени, як віруси. Коли длРНК потрапляє в клітину, спочатку вона розщеплюється на короткі дволанцюгові фрагменти $\mu 20$ нуклеотидних міРНК за допомогою ферменту Dicer . Потім кожна дволанцюгова міРНК розщеплюється на пасажирську ланцюг і направляючу ланцюг. Після цього направляючий ланцюг включається в РНК-індукований комплекс глушіння (RISC), тоді як пасажирський ланцюг деградує. У RISC направляючий ланцюг міРНК поєднується з комплементарною послідовністю в молекулі РНК-месенджера та індукує розщеплення за допомогою Argonaute , що спричинює приглушення генів після транскрипції. Оскільки раціональний дизайн міРНК може спеціально пригнічувати ендогенну та гетерологічну експресію генів, він може модулювати будь-яку експресію генів, пов'язану із захворюванням. Наприклад, більшість захворювань спричинені надмірною експресією онкогену або мутацією генів, тому може бути можливим вилікувати хвороби шляхом придушення генів, пов'язаних із захворюваннями, за допомогою раціональної конструкції міРНК. Завдяки своєму великому потенціалу в біологічних дослідженнях та розробці ліків, у 2006 р. РНК був нагороджений Нобелівською премією з медицини. З тих пір мільярди доларів були вкладені в терапевтичне застосування РНК у людей. Щонайменше 22 препарати на основі РНКі пройшли клінічні випробування (Таблиця 1).

Таблиця 1

Ліки	захворювання	Стадія клінічних випробувань
Patisiran	Спадковий АТТР амілоїдоз	схвалено
Givosiran	Гострі печінкові порфірії	Пізня стадія (фаза 2-3)
Fitusiran	Гемофілія і рідкісні кровотечі	Пізня стадія (фаза 2-3)
Inclisiran	гіперхолестеринемія	Пізня стадія (фаза 2-3)
ALNTTRsc02	АТТР амілоїдоз	Рання стадія (фаза 1-2)
Lumasiran	Первинна гіпероксалурия типу 1	Рання стадія (фаза 1-2)
Cemdisiran	Хвороб, пов'язані з системою комплементу	Рання стадія (фаза 1-2)

Серед цих клінічних випробувань більшість міРНК вводили шляхом місцевої доставки, як правило, інтравітреальним або інтраназальним шляхом. Однак місцеві пологи можуть бути недоречними при всіх захворюваннях. За певних обставин необхідне системне введення ліків шляхом внутрішньовенних (iv) ін'єкцій, а системи доставки будуть необхідні для управління корисним навантаженням міРНК. Наприклад, PRO-040201 (АроВ-СНКЛЧ), що вводиться шляхом внутрішньовенного введення, був розроблений Tekmira із стабільною системою ліпідних частинок нуклеїнових кислот (СНКЛЧ). Він був розроблений для лікування гіперхолестеринемії шляхом націлювання на АроВ, який продукується гепатоцитами. У липні 2009 року Tekmira започаткувала клінічне

випробування фази I для PRO-040201. Сімнадцять суб'єктів отримували разову дозу на одному із семи різних рівнів дозування, а шість суб'єктів отримували плацебо. Результати показали, що АроВ міРНК ефективно доставлялася в гепатоцити і призводила до значного зниження рівня ЛПНЩ та тригліцеридів у крові. Однак Tekmira припинила клінічне випробування в січні 2010 р., Оскільки у одного з двох суб'єктів, які отримували найвищу дозу, спостерігалися грипоподібні симптоми, що узгоджуються із стимуляцією імунної системи, спричиненою корисним навантаженням АроВ міРНК [4]. Компанія Calando Pharmaceuticals (Пасадена, штат Каліфорнія, США) розробила терапію міРНК (CALAA-01), яка являє собою полімерну наночастинку на основі циклодекстрину, що містить субодиницю M2 рибонуклеотидредуктази (RRM2), орієнтовану на міРНК. CALAA-01 був модифікований за допомогою білка трансферину людини (TF) та поліетиленгліколю (PEG) для поліпшення його стабільності [3]. . На жаль, його фаза I клінічного випробування була припинена у 2013 році згідно з Управлінням з контролю за продуктами та ліками США (FDA). На додаток до вищезазначених препаратів міРНК, багато інших знаходяться в процесі розвитку.

2.1. Хімічні модифікації міРНК

Хоча хімічні модифікації не забезпечують носія для міРНК, вони демонструють великий потенціал і необхідні в терапевтичних системах доставки міРНК. За допомогою раціональних хімічних модифікацій міРНК може набути таких переваг, як стабільність сироватки крові, здатність до імунного виходу та доступ до механізмів РНКі [8]. , [43]. , [44]. .

Хімічні модифікації можуть бути введені на 5 ' або 3'-кінці, скелет, цукор або нуклеобазу міРНК. Найбільш поширеним сайтом модифікації міРНК є положення 2 ' рибозного кільця, яке, як було доведено, підвищує стабільність міРНК, запобігаючи деградації ендонуклеазами . Дві стратегії

модифікації, тобто 2'-О-метил та 2'-дезоксигуанозин, досить добре зрозумілі та комерціалізовані, і було показано, що вони покращують стабільність міРНК у сироватці крові та збільшують її потенціал *in vivo*. Існують також деякі інші підходи, такі як заміна групи фосфодіацетату (PO₄) фосфотіоатом (PS) на 3'-кінці основи РНК або комбінація 4'-тіоляту з модифікацією 2'-О-алкілу[44]., [45]. .

Основною вимогою успішних модифікацій є підвищення стабільності сироватки міРНК без негативного впливу на її глушительну активність. Дійсно, деякі види модифікацій можуть порушити ефективність. Наприклад, модифікація боранофосфонату в центрі антисмислового ланцюга підвищує стійкість міРНК до нуклеаз, хоча і знижує активність РНКі [46]. . Крім того, метаболіти цих модифікацій також слід розглядати як питання безпеки.

2.2. Вектори на основі ліпідів для доставки міРНК

Ліпофектамін 2000 - це різновид катіонного ліпідного препарату, який широко застосовується для трансфекції плазмідної ДНК in міРНК *in vitro*. Ліпофектамін 2000 або нещодавно розроблений ліпофектамін РНКімакс є ефективними агентами трансфекції міРНК *in vitro*, які можуть поліпшити ефективність трансфекції у тисячі разів [47]. . Механізм трансфекції ліпосом включає електростатичні взаємодії між негативно зарядженими нуклеїновими кислотами та позитивно зарядженими ліпідами. При змішуванні вони спонтанно утворюють ліпоплекси [48]., [49]., [50]. .

Оскільки поверхневий заряд усіх біологічних мембран негативний, електронегативні або нейтральні ліпосоми є більш біосумісними, ніж катіонні ліпосоми, і мають чудову фармакокінетику загалом. ДГФ (1,2-діолеїлсн-гліцеро-3-фосфатидилхолін) - це різновид нейтрального ліпиду, який використовується для підвищення ефективності захоплення міРНК. У 2005 році Landen et al. розробив онкопротеїн EphA2, націлений на ДГФ-інкапсульовану ліпосому міРНК, який був високоефективним у зменшенні

експресії EphA2 через 48 годин після введення одноразової дози в ортотопічну модель раку яєчників [51]. В даний час EphA2, орієнтована на ДГФ-інкапсульовану ліпосому міРНК (міРНК-EphA2-ДГФ), перебуває у фазі І клінічного випробування, розпочатого Центром онкології MD Anderson. Оскільки електронегативні або нейтральні ліпосоми не легко ендочитуються клітинами, катіонні ліпосоми все ще є найкращим вибором. Наприклад, діолеїл-фосфатидилетаноламін-амін та 1,2-діолеїл-3-триметиламоній-пропан (ДФАДТП) є катіонними ліпідами, які утворюють катіонні ліпосоми з негативно зарядженою міРНК [52]. Соренсен та ін. використовували катіонні ліпосоми ДФАДТП для доставки міTNF- α , а летальна реакція на ін'єкцію LPS у миші на моделі сепсису була придушена [53]. Для підтримки загального позитивного поверхневого заряду для адсорбції через клітинну мембрану та зменшення можливого кліренсу, спричиненого позитивним зарядом, нормальне співвідношення А / Ф (азот до фосфату) становить від 2 до 3 [47].

Покриття ліпосом закріпленим на ліпідах ПЕГ може зменшити розмір частинок [54], запобігти агрегації під час зберігання, збільшити період напіввиведення кровообігу та зменшити поглинання ретикулоендотеліальною системою (РЕЗ), такою як еритроцити та макрофаги [54]. Але використання ПЕГ не завжди вигідно, оскільки стеричний ефект та ефект заряду ПЕГ блокують взаємодію між ліпосомою та ендосомною мембраною та перешкоджають виходу ліпосоми з ендосоми. Було проведено багато досліджень для покращення ефективності наночастинок ПЕГильованих, включаючи раціонально розроблену довжину та щільність ПЕГ або включення чутливих до рН зв'язків, що зв'язують ПЕГ з ліпосомою. Про те, як досягти найкращого результату за допомогою модуляції довжини та щільності ПЕГ, досі залишається суперечливим, але виявлено, що ефективний модифікований ПЕГ з іонними взаємодіями, такий як модифікована ПЕГ-ліпосома НЕМА – гістидин – метакрилова кислота, є ефективним. При нейтральному рН сополімер ПЕГ має чистий негативний

заряд, тоді як ліпосомальне ядро, яке складається з ДОФЕ та холестерину, має чистий позитивний заряд. В ендосомі імідазол та метакрилова кислота залишки стають протонуваними, а чистий заряд ПЕГ стає позитивним, що призводить до вивільнення ПЕГ та позитивно зарядженої ліпосомної мембрани, після чого ліпосома може злитися з ендосоною і успішно вирватися [55]. . Atu027 - ліпоплексний препарат міРНК, націлений на протеїнкіназу N3, про який повідомляли для лікування метастазів у лімфатичні вузли на мишачих моделях раку передміхурової залози та підшлункової залози та різних моделях мишачих метастазів у легені [56]. . The Silence Therapeutics (Лондон, Великобританія) проводить випробування I фази Atu027. Попередній результат показав, що Atu027 добре переносився до дози 0,18 мг / кг і не асоціювався з дозозалежною токсичністю [57].

Найвідомішими ліпідними векторами, що використовуються для клінічних випробувань, є СНКЛЧ (стабільні нуклеїнові кислоти-ліпідні частинки). СНКЛЧ - це різновид ліпідних наночастинок, які інкапсулюють міРНК і доставляють її до клітин-мішеней. СНКЛЧ - це мікроскопічні частинки діаметром приблизно 120 нм. Вони використовувались для доставки міРНК ссавцям у природних умовах *in vivo* . У СНКЛЧ міРНК оточена ліпідним бішаром, що містить суміш катіонних та фузогенних ліпідів, покритих дифузійним поліетиленгліколем [58]. Завдяки підвищеній проникності та утриманню через тривалий час циркуляції в крові, СНКЛЧ є дуже біодоступними, що призводить до накопичення СНКЛЧ у місцях витоку судин, особливо в місцях росту раку. Після накопичення СНКЛЧ легко ендочитуються зараженими клітинами і успішно доставляють міРНК в клітини. СНКЛЧ використовувались для лікування багатьох захворювань, включаючи вірусну інфекцію гепатиту В, дисліпідемію та Еболу (Заїр) [20]. . Суддя та ін. успішно продемонстрували зменшення розміру підшкірної пухлини на 75% за допомогою лікування СНКЛЧ-міPlk1 [59]. Tekmira Pharmaceuticals Corporation (Бернабі, Британська Колумбія, Канада) в грудні 2010 року ініціювала дослідження I-інкапсульованої міРНК, інкапсульованої

PLk1 (TKM080301), у дорослих пацієнтів із солідними пухлинами або лімфомами . Компанія Alnylam Pharmaceuticals (Кембридж, Массачусетс, США) розробила першу подвійний цільовий препарат міРНК, сформульовані СНКЛЧ, орієнтовані на фактор росту судинного ендотелію (VEGF) та KSP в ALN-VSP02. У квітні 2009 року було розпочато випробування фази I для лікування передових солідних пухлин із ураженням печінки. Проміжні дані первинних 28 пацієнтів у перших шестидозових когортах показали, що ALN-VSP02, як правило, добре переноситься при найвищій дозі (1,25 мг / кг) [60]. .

Іншою ліпідоподібною системою доставки є ліпідодні наночастинки, які складаються з холестерину та ПЕГ-модифікованих ліпідів, специфічних для доставки міРНК [60]. . Для поліпшення доставки, опосередкованої СНКЛЧ, Akinc et al. розробив новий хімічний метод для швидкого синтезу великої бібліотеки ліпідодів та перевіряв їх ефективність при доставці міРНК [61]. . Одним з найбільш потенційних ліпідодних препаратів був препарат міРНК на основі ліпідодів 98N12-5, що призвело до 75–90% зниження експресії фактора АроВ або FVII у гепатоцитах у приматів та мишей, які не є людиною [61]. .

2.3. Полімер-опосередковані системи доставки міРНК

Полімер-опосередковані системи доставки, які зазвичай називають полімерними наночастинками, - це тверді, біологічно розкладаються колоїдні системи, які широко вивчалися як лікарські везикули [62]. . Відповідно до використовуваного матеріалу, опосередковані полімером системи доставки можна розділити на дві категорії: водорозчинні катіонні полімери та полімерні наночастинки. Для пртиракової доставки міРНК водорозчинні катіонні полімери в основному включають циклодекстрин або поліетиленімін (PEI), тоді як наночастинки полімеру зазвичай базуються на полікапролактоні (PCL), полі (d , l- лактиді) (PLA) та полі (d , l -лактид-ко-гліколід) (PLGA) [63]. .

Циклодекстрин є найбільш перспективним природним полімером для доставки міРНК. Вперше він був введений для доставки плазмідної ДНК в 1999 році, а згодом повторно оптимізований для доставки міРНК. Менш ніж через десять років наночастинки на основі полімеру циклодекстрину (CDP) були переміщені в клінічні випробування для доставки міРНК. Наночастинка полімеру циклодекстрину була першою цілеспрямованою системою доставки міРНК, яка увійшла до клінічних випробувань для лікування хвороб [64]. . Полімери циклодекстрину - це полікатієнові олігомери, синтезовані шляхом ступенчатої полімеризації між діамерами , що містять мономери циклодекстрину, та диметилсуберимідатом , отримуючи олігомери з амідновими функціональними групами [65]. У системах доставки міРНК, що опосередковуються циклодекстрином, адамантан – ПЕГ (AD – ПЕГ) та адамантан – ПЕГ – трансферин (AD – ПЕГ – Тф) зазвичай використовуються для підвищення ефективності доставки *in vivo* [66]. , [67]. . Для AD-PEG-Tf адамантан може стабілізувати ядро циклодекстрину, утворюючи стабільний комплекс включення. Екранування ПЕГ може зменшити кліренс крові, захищаючи частинки від сироваткових білків, одночасно зменшуючи клітинне поглинання та зменшуючи ефективність. Кон'югований трансферин є цільовим компонентом, який може зв'язуватися з рецептором трансферину CD71 [68]. . Компанія Calando Pharmaceuticals (Пасадена, Каліфорнія, США) розробила CALLA-01, яка націлена на субодиницю M2 рибонуклеотидредуктази(R2) для пригнічення росту пухлини [3]. .

Поліетиленіміну (АЯ) була успішно використана для кислотної доставки нуклеїнової під як в пробірці і в природних умовах [69]. , [70]. , [71]. . Однак високомолекулярні ПЕІ забезпечують високу ефективність трансфекції, але також мають високу токсичність, тоді як низькомолекулярні ПЕІ є більш біосумісними, але набагато менш ефективними. Наварро та ін. повідомили про тип наночастинок, подібних до міцел (MNP), заснованих на поєднанні ковалентного кон'югату між фосфоліпідом та низькомолекулярним PEI (1,8 кДа) із стабілізованими ПЕГ ліпосомами як зовнішні шари [72].

Комплекси MNP мали розмір ~ 200 нм та нейтральний поверхневий заряд після додавання ПЕГ-ліпідного покриття, яке захищало завантажену міРНК від ферментативного перетравлення та посилювало клітинне поглинання корисного навантаження міРНК. Показано, що MNP здатні доставляти міРНК та мовчати гени з покращеними властивостями біосумісності. Система доставки MNP була надалі використана для глушіння P-gp для подолання резистентності до доксорубіцину в клітинах раку молочної залози людини MCF-7. Наявність P-gp на поверхні стійких клітин зменшилася після обробки клітин навантаженою MNP міРНК, націленою на MDR-1, що ефективно інгібує витік препаратодіяльність. Кількість доксорубіцину в клітинах, оброблених MDR-1, подвоїлася в порівнянні з контрольними клітинами і призвела до дворазового зниження життєздатності клітин після медикаментозного лікування протягом різних інтервалів, подібних до значень у чутливих клітинах [73]. .

Полікапролактон (PCL), як правило, використовуються для полімерної міцели систем міРНК доставки лікарських засобів. Сонце та ін. описав виробництво самостійно зібраних міцелярних наночастинок (MNP) триблочного сополімеру, монометокси полі (етиленгліколь) - блок-полі (ϵ -капролактон) -блокполі (2-аміноетил етилен фосфат) (PPEEA) (mPEG-b-PCL-b-PPEEA) (рис. 2) [74]. . У цій системі гідрофільний фосфоефірPPEEA, який вважається біосумісним та біорозкладаним, служив місцем зв'язування міРНК, а інший гідрофільний блок PEG оточував гідрофобне ядро для захисту міРНК та наночастинок від очищення в циркуляції. Наночастинок, завантажені міРНК, відомі як Micelleplex, можуть ефективно інтерналізуватися і згодом вивільняти міРНК в клітини, що призводить до значної активності нокдауну генів, що було продемонстровано доставкою двох міРНКs, спрямованих на білок зеленої флуоресценції (GFP), які ефективно пригнічували експресію GFP за 40– 70% клітин HEK293, що експресують GFP [74]. . mPEG- b -PCL- b -PPEEA також застосовувався для

кислотної керамідази(АС), доставку міРНК HIF1 та CDK4 для успішного лікування різних видів хвороб у мишей [75]. , [76]. , [77]. .

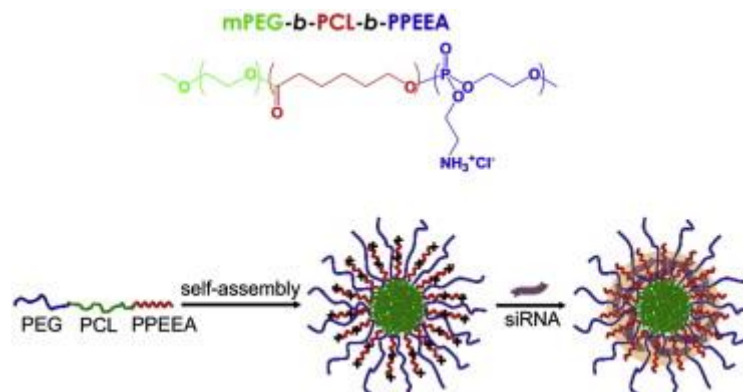


Рис.2 . Системи доставки ліків міРНК з полімерної міцели . mPEG- b - PCL- b -PPEEA - це чітко визначений триблочний сополімер , що складається з блоку монометокси полі (етиленгліколь) (mPEG), блоку полі (ε-капролактон) (PCL) та катіонного полі (2-аміноетил етилену фосфат) (PPEEA) блок , який може самосборку в катіонні міцелярних наночастинки , щоб бути завантажена з міРНК.

Полі (d , l- лактид) (PLA) та полі (d , l- лактид-ко-гліколід) (PLGA) також продемонстрували потенціал стійкої доставки нуклеїнової кислоти [78]. , [79]. , [80]. . У 2009 р. Зальцман та його співробітники повідомили, що наночастинки PLGA можуть щільно завантажуватися міРНК у присутності спермідину і, при місцевому нанесенні на слизову оболонку піхви, призводять до ефективного та стійкого глушіння генів [81]. . Ян та ін. повідомив про катіонну ліпідну систему полімерних наночастинок із прихованою властивістю для ефективного інкапсулювання та доставки міРНК, яка була виготовлена з полі (етиленгліколем) - b-полі (d , l- лактид), міРНК та катіонний ліпід, використовуючи техніку подвійного випаровування емульсії та розчинника (рис. 3). Завдяки включенню катіонного ліпиду ефективність інкапсуляції міРНК у наночастинки

становила більше 90%. Вагове співвідношення навантажень міРНК становило до 4,47%, тоді як діаметр наночастинок становив близько 170–200 нм. МіРНК зберігала свою цілісність усередині наночастинок, які ефективно інтерналізувались раковими клітинами та виходили з ендосоми, що призводило до значного приглушення генів. Системна доставка специфічної міРНК наночастинами суттєво пригнічувала люциферазу експресія в ортотопічній моделі мишачого раку печінки та пригнічений ріст пухлини в моделі мишачого ксенотрансплантата MDA-MB-435s, що свідчить про його терапевтичну перспективу при лікуванні захворювання [82]. Використовуючи ту саму катіонну ліпідну систему полімерних наночастинок, Shen et al. доставляв міРНК GATA2 до недрібноклітинної карциноми легенів (НМРЛ), зберігаючи онкогенні мутації KRAS, та успішно інгібував ріст пухлини на моделі миші [83].

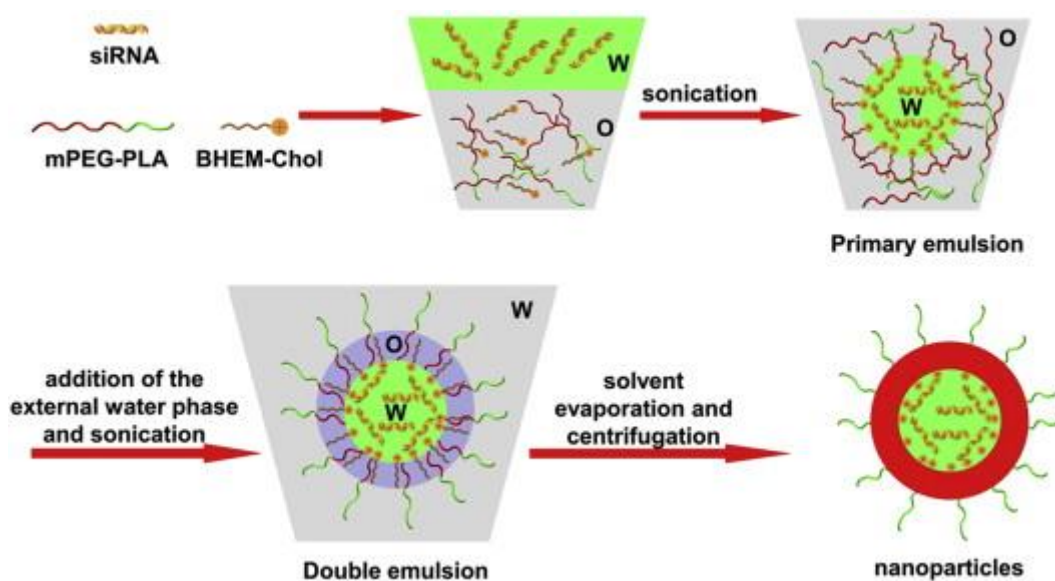


Рис.3 . Катіонні ліпідні полімерні системи наночастинок . mPEG-PLA: полі (етиленгліколь) - b -полі (d , l- лактид); BHEM-Chol: N , N-біс (2-гідроксиетил) - N- метил- N - (2-холестерилноксикарбоніламіноетил) бромід амонію ; W та O являють собою водну фазу та масляну фазу відповідно.

2.4. Кон'югатні системи доставки міРНК

Ряд перспективних систем були розроблені шляхом безпосереднього з'єднання матеріалу доставки вантажу міРНК. Такий підхід призводить до чітко визначених одноцінкієйних систем, які використовують тільки рівнозначні обсяги матеріалів доставки і міРНК. Перші кон'юговані системи доставки, щоб показати ефективність *in vivo*, склалися з міРНК, кон'юговані холестерином¹⁴ та іншими ліпофільні молекули²⁸. Інші системи кон'югування були розроблені шляхом прикріплення міРНК до полімерів, пептидів, антитіл, астамерів і невеликих молекул⁴⁸. Ми детально обговоримо дві найбільш клінічно розвинені кон'югатні платформи, DPCs і GalNAc кон'югати, а також одну нещодавно розроблену систему на основі наночастинок олігонуклеотиду. Хоча вони не дуже добре представлені в науковій літературі, тому що ці кон'югатори знаходяться в стадії розробки приватними компаніями як власні технології, вони надають корисні уроки для розробки майбутніх матеріалів доставки кон'югів.

Безпосередньо кон'югація матеріалів доставки до міРНК виявилася перспективною системою доставки міРНК. Найпоширенішими кон'югованими матеріалами є малі молекули лікарських засобів, аптамери, ліпіди, пептиди, білки та полімери [84]. Ця система має цілком очевидну перевагу для терапевтичного клінічного використання, оскільки система проста і чітко визначена.

Кон'югати ліпофіль-міРНК, які були першими системами доставки кон'югатів, що показали ефективність *in vivo*, складаються з міРНК, кон'югованої з холестерином [85]. та інших ліпофільних молекул [24]. Холестерин кон'югувався з 3'-кінцем сенсорного ланцюга міРНК за допомогою піролідонного зв'язку. Холестерин не тільки підвищував ефективність трансфекції міРНК *in vitro*, але й покращував фармакокінетичну поведінку міРНК *in vivo* [85]. Для подальшої оптимізації холестерину-

міРНК був зв'язаний ліпопротеїн високої щільності (ЛПВЩ), що збільшило ефективність приглушення генів у 8–15 разів *in vivo* [24]. .

СРР (пептиди, що проникають через клітини) - це ще один кон'югований матеріал, який використовується для підвищення ефективності трансфекції міРНК. Добре відомим СРР є білок трансактиватора ТАТ від вірусу імунодефіцитності людини типу 1 (ВІЛ-1). ТАТ кон'югували з 3'-кінцем антисмислового ланцюга міРНК за допомогою гетерофункціонального зшиваючого агента (НВФС), тобто сульфосукцинімідил-4- (п-малеїмідофеніл) бутират [86]. . Кон'югат ТАТ-міРНК продемонстрував різке поліпшення внутрішньоклітинної доставки міРНК. Однак кон'югати СРР-міРНК можуть виявляти цитотоксичність, спричинену збуренням клітинної мембрани або імуногенністю [87]. .

Цільова система доставки - завжди мрія про розробку проти препаратів . Для цілеспрямованої доставки міРНК використовували пептиди, антитіла та аптамери . Для опосередкованої рецептором-лігандом міРНК група карбонової кислоти пептидного міметика IGF1, D- (Cys-Ser-Lys-Cys), була активована і кон'югована до амінної групи 5'-сенсового ланцюга міРНК . Ця стратегія призвела до зменшення експресії на 60% IRS1 (субстрат рецептора інсуліну 1), що було подібним до кон'югату хол-міРНК[88]. . Орієнтовані на антитіла системи доставки ліків привернули велику увагу завдяки своїй чудовій стабільності та високій специфічності. моноклональних антитілспрямованість рецептора трансферину на гематоенцефалічний бар'єр була безпосередньо кон'югована з міРНК за допомогою зв'язку біотин-стрептавідин. Внутрішньовенне введення кон'югату антитіло-міРНК призвело до ефективного придушення експресії репортерного гена на моделі щурів, що несе внутрішньочерепно трансплантовані пухлини мозку [89]. . Аптамери, такі як цільовий аптамер специфічного для простати мембранного антигену (PSMA), є модифікованими олігонуклеотидами із селективним спорідненістю до конкретних білків. При кон'югуванні з міРНК із використанням стрептавідину за допомогою взаємодій стрептавідин-біотин,

націлені на PSMA аптамери успішно сприяють засвоєнню міРНК клітинами, що надмірно експресують PSMA, без використання трансфекційних агентів [90]. Що стосується цих перспективних систем доставки кон'югатів, дві найдосконаліші системи кон'югатів, тобто DPC та кон'югати GalNAc, вже проходять клінічні випробування [40]. .

2.5. Інші можливі системи доставки міРНК

Окрім раніше вивчених систем доставки міРНК, описаних вище, існують деякі нові стратегії доставки міРНК, такі як опосередковані екзосомами системи доставки міРНК, наночастинки олігонуклеотидів та РНКі-мікрогубки. Хоча ці платформи доставки не дуже добре розвинені, вони все ще демонструють великий потенціал у доставці міРНК.

Екзосоми - це невеликі пухирці (40-100 нм), що виділяються з клітин при злитті багатозалежного тіла (MVB), що містить внутрішньосвітлові везикули з плазматичною мембраною [91]. . Показано, що вони є природними носіями кодуючої та некодуючої РНК, включаючи мікроРНК, зі здатністю індукувати *de novo* транскрипційні та трансляційні зміни в клітинах-мішенях [92]. , [93]. , [94]. , [95]. , [96]. Здатність екзосом переносити мРНК та міРНК між клітинами і згодом опосередковувати зміни в експресії генів у клітинах-реципієнтах, разом з їх великим вмістом у більшості рідин організму, підкреслює їх потенціал як носіїв доставки РНКі. Ель-Андалуссі та ін. першими використали цей потенціал і подали перше підтвердження концепції біотехнологічної експлуатації екзосом [97]. . Вони спеціально націлили дендритні клітинні екзосоми на мозок, демонструючи пептид, похідний вірусу сказу, глікопротеїн (RVG), а потім завантажували їх міРНК для доставки як *in vitro*, так і *in vivo* (рис. 4). Використовуючи цей метод, вони продемонстрували специфічну доставку міРНК до нейронів мозку після системної доставки у мишей, з нокдауном до 60% РНК та білків переважно в середньому мозку, корі та смугастому тілі, а також мало

наведення вантажу екзосоми до печінки . На додаток до ефективної та специфічної доставки міРНК, ці екзосоми навіть мало або взагалі не викликали токсичності або імуногенності навіть після багаторазового внутрішньовенного введення [98]. .

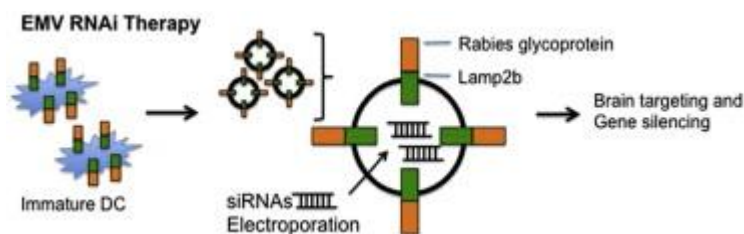


Рис.4 . Орієнтована на екзосоми опосередкована доставка міРНК .

Екзосома - це різновид позаклітинних мембранних везикул (EMV), які можуть бути прикрашені лігандом-націлювачем і завантажені міРНК. Як EMV, навантажена міРНК екзосома може досить ефективно засвоюватися клітинами. Copyright 2012, Димитров, Каммінс, Майко та Портфорс.

Наночастинки олігонуклеотидів (ONP) складаються з комплементарних фрагментів ДНК, призначених для гібридизації в заздалегідь визначені тривимірні структури (рис. 5) [40]. . Раніше описаний метод [99]. побудови тетраедрів ДНК був адаптований шляхом включення одноланцюгових звисів по кожному краю [32]. . міРНКs були модифіковані шляхом розширення 3'-чуттєвих ланцюгів з звисами ДНК, що уможливило гібридизацію до країв тетраедрів. Використовуючи унікальні звисаючі послідовності, до кожної частинки можна приєднати шість ланцюгів міРНК, кожна у визначеному положенні. Отримані наночастинки мали гідродинамічний діаметр близько 29 нм [40]. . Наночастинки олігонуклеотидів, модифіковані фолієві ліганди використовувались для вивчення мінімальної кількості цільових лігандів, необхідних для доставки, та для дослідження оптимального розташування цих лігандів. Для досягнення значного мовчання генів було потрібно мінімум три фолієві ліганди, проте включення більше трьох лігандів не значно

покращило ефективність мовчання. Крім того, позиціонування трьох лігандів було критичним: ONP з трьома лігандами, розташованими так, щоб максимізувати локальну щільність (усі три ліганди, розташовані навколо однієї сторони або однієї вершини), демонстрували ефективне мовчання, тоді як ті, у яких ліганди, віддалені один від одного, мали нижчу мовчальну активність [32]. У дозі 2,5 мг / кг фолат-ONP пригнічували експресію люциферази в пухлині на ~ 60% без значної імуностимуляції.

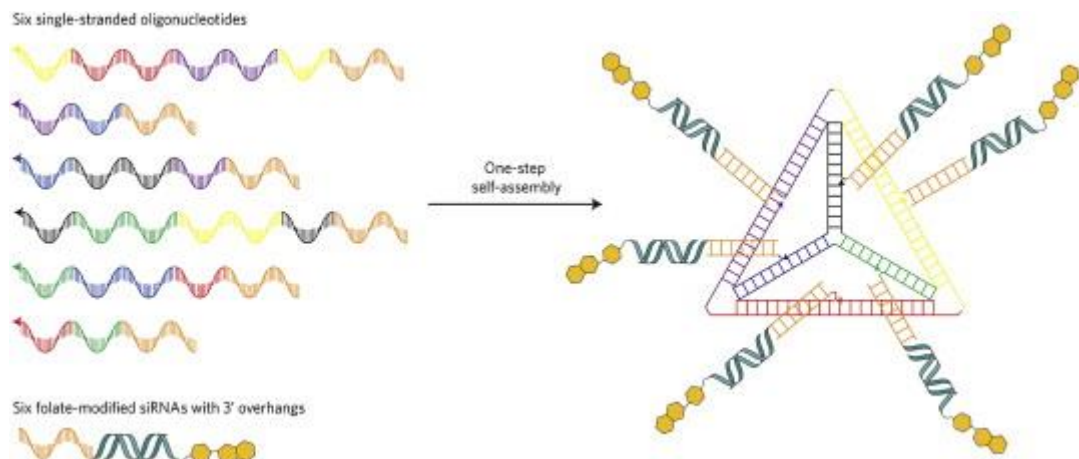


Рис.5 . Самозборки з олігонуклеотидних наночастинок . ДНК-тетраедри, що містять шість міРНК , синтезували в один етап шляхом гібридизації комплементарних ланцюгів. Позиціонування кожної міРНК на поверхні тетраедра можна було контролювати, використовуючи унікальні послідовності в кожному з висів міРНК 3'. Авторське право 2013, видавництво Macmillan.

5 . Висновки до розділу

Як один з найбільш перспективних препаратів для лікування хвороб, міРНК має великі переваги, такі як відмінна безпека, висока ефективність, необмежений вибір мішеней та специфічність. Для вирішення проблем доставки міРНК було розроблено багато систем доставки. Ці високоефективні системи доставки досить сильно відрізняються за

структурою, розмірами та хімією, але все ж існують деякі рекомендації щодо оптимальних систем доставки.

3 РОЗДІЛ

АНАЛІЗ РЕЗУЛЬТАТІВ

3.1 . Переваги міРНК та бар'єри для міРНК

У порівнянні з хімічними препаратами, є маса переваг препарату міРНК. Завдяки спеціальному механізму міРНК, вона має чотири переваги як потенційна стратегія терапії хвороб. Перший - це високий ступінь безпеки. міРНК діє на посттрансляційній стадії експресії генів, тому вона не взаємодіє з ДНК і тим самим уникає мутації та тератогенності ризику генної терапії. Другою перевагою міРНК є її висока ефективність. В одній хворобливій клітині міРНК може викликати різке пригнічення експресії генів лише кількома копіями. Порівняно з іншими лікарськими засобами з невеликими молекулами або препаратами на основі антитіл, найбільшими перевагами міРНК є необмежений вибір мішеней та специфічність, що визначаються принципом додаткового спарювання основ. Ця стратегія також виграє від швидкого розвитку молекулярної біології та секвенування цілого генома. Крім того, комплексний нуклеотид. Створені бази даних послідовностей, включаючи геномні бази даних людини, бази даних кДНК та бази даних про гени захворювань, які заклали міцну основу для розвитку препарату міРНК. Основною стратегією препарату міРНК є лікування хвороб шляхом приглушення специфічного гена, що стимулює хворобу, за допомогою раціонально розробленої міРНК. Звичайно, також можна розробити ефективний препарат, спрямований на міРНК, для будь-якого гена захворювання відповідно до послідовності мРНК.

Однак на шляху до клінічного використання міРНК для терапії хвороб все ще існує кілька бар'єрів (рис. 1). По-перше, міРНК нестабільна у фізіологічних умовах. Коли міРНК потрапляє через кров, вона легко засвоюється нуклеазами в сироватці крові. Внутрішньоклітинний обіг міРНК,

що доставляється різними реагентами, як правило, починається в ранніх ендосомах. Ці ранні ендосоми згодом зливаються з сортуючими ендосомами, які, в свою чергу, переносять їх вміст у пізні ендосоми. Ендосомні відділи клітини є значно кислими (pH 5,0-6,2), тоді як цитозоль або внутрішньоклітинний простір нейтральні (pH \approx 7,4) [5]. Потім ендосома переміщується до лізосом, які в подальшому підкислюються (pH \approx 4,5) і містять різні нуклеази, що сприяють деградації міРНК [6]. . Ідеальним шляхом введення міРНК є системне введення, завдяки чому міРНК може ефективніше досягати клітин. Після ін'єкції в кров міРНК легко ферментативно розкладається ендогенними нуклеазами, фільтрується нирками, поглинається фагоцитами і агрегується з білками сироватки [7]. . Одним з перших біологічних бар'єрів, з якими стикається введена міРНК, є активність нуклеази в плазмі та тканинах. Основною нуклеазою в плазмі є 3' екзонуклеаза; однак може також відбуватися розщеплення міжнуклеотидних зв'язків. Повідомлений період напіввиведення для немодифікованої міРНК у сироватці коливається від декількох хвилин до 1 години [8]. . Крім того, нирка відіграє ключову роль у кліренсі міРНК; кілька досліджень на тваринах повідомили, що біорозподіл міРНК демонструє найвище поглинання в нирках [9]. . На додаток до деградації циркулюючої нуклеази та ниркового кліренсу, основним бар'єром для доставки міРНК *in vivo* є поглинання ретикулоендотеліальною системою (РЕС). РЕС складається з фагоцитарних клітин, включаючи циркулюючі моноцити та тканинні макрофаги, фізіологічна функція яких полягає у очищенні чужорідних патогенів та видаленні клітинного сміття та апоптотичних клітин [10]. Тканинні макрофаги найбільш поширені в печінці (де їх називають клітинами Купфера) та селезінці, тканинах, які також отримують високий кровотік і мають фенестровану судинну систему. Таким чином, не дивно, що ці органи накопичують високі концентрації міРНК після системного введення . Через 4 год зафіксовано поглинання міРНК після стандартної

ін'єкції iv хвостової вени або інтраперитонеальної (ip) ін'єкції у печінку, селезінку, нирки та кістковий мозок, але загальний сигнал був слабким [11]. .

По-друге, вільна міРНК, яка є різновидом аніонних та гідрофільних дволанцюгових малих РНК, не сприймається клітинами легко. Більше того, гідрофільність і негативний заряд молекул міРНК заважає їм легко перетинати біологічні мембрани. Отже, міРНК потрібно упакувати у везикули, щоб потрапити в клітини.

Третій бар'єр - це нецільові ефекти міРНК, які призводять до непередбачуваних фенотипів, що ускладнює інтерпретацію терапевтичних переваг міРНК, включаючи індуковану міРНК послідовність регуляції ненавмисних транскриптів через часткову комплементарність послідовності до їх 3' UTR, як а також широко розповсюджений вплив на обробку і функціонування міРНК через насичення ендogenous механізму РНКі екзогенною міРНК [12]. . Встановлено, що масштаб нецільових ефектів є надзвичайним під час ідентифікації нових компонентів шляхів передачі сигналу на екранах РНКі [13]. . Усі потрапляння міРНК, незалежно від їх прямої мішені, знижували рівні мРНК двох відомих компонентів шляху проходження, TGF- β рецептори 1 та 2 (TGFB1 та TGFB2), через мікроРНК-подібні нецільові ефекти [13]. . Трансфекція малих РНК може глобально порушити регуляцію генів ендogenous міРНК. Мішені ендogenous міРНК експресуються на значно вищих рівнях після специфічної трансфекції міРНК, що узгоджується з порушенням ефективності ендogenous репресії міРНК, що призводить до несподіваних змін у експресії генів.

Нарешті, міРНК не така безпечна, як очікувалося. Відомо, що високий рівень міРНК призводить до активації вроджених імунних відповідей та продукції цитокінів *in vitro* та *in vivo* [14]. , [15]. . Імунні клітини ссавців експресують підсімейство рецепторів розпізнавання образів, які називаються Toll-подібними рецепторами (TLR), які розпізнають асоційовані з патогенами молекулярні структури , включаючи неметильовану ДНК CpG та вірусну дЛРНК[12]. . Кілька TLR беруть участь у розпізнаванні міРНК, включаючи

TLR3 , TLR7 та TLR8 [16]. , [17]. TLR3 є рецептором міРНК, і культивовані клітини людського ембріона HEK-293 із надмірною експресією TLR3 здатні розпізнавати міРНК. Показано, що міРНК активує передачу сигналів TLR3 незалежно від послідовності [16]. . Спочатку було показано, що TLR7 і TLR8 опосередковують розпізнавання РНК-вірусів та невеликих синтетичних противірусних сполук, що називаються імідазохінолінами [18]. . Було показано, що TLR7 абсолютно необхідний для індукції цитокінів з використанням відповідних нокаутованих мишей у імунних клітинах миші у відповідь на міРНК [14]. , [15]. міРНК може бути розпізнана людськими плазмоцитоїдними дендритними клітинами (pDC) через TLR7 та моноцитами людини, ймовірно, за допомогою TLR8 [19]. . TLR7 і TLR8 опосередковують розпізнавання міРНК залежно від послідовності, і послідовності РНК, включаючи UG- динуклеотиди та мотив 5'-UGU-3 ' , переважно розпізнаються [18]. . Таким чином, питання послідовності опосередкованої міРНК імунної стимуляції вимагає подальшого дослідження.

Враховуючи ці бар'єри для реалізації широкого потенціалу терапії на основі міРНК, бажані безпечні та ефективні методи доставки міРНК. Отже, необхідні хімічні модифікації та / або способи доставки, щоб довести міРНК до місця її дії без негативних наслідків. Досліджується широкий спектр матеріалів для вирішення проблем доставки *in vivo* , включаючи полімери, ліпіди, пептиди, антитіла , аптамери та малі молекули. Успішні системи були розроблені за допомогою раціонального проектування або виявлені за допомогою високопродуктивних екранів.

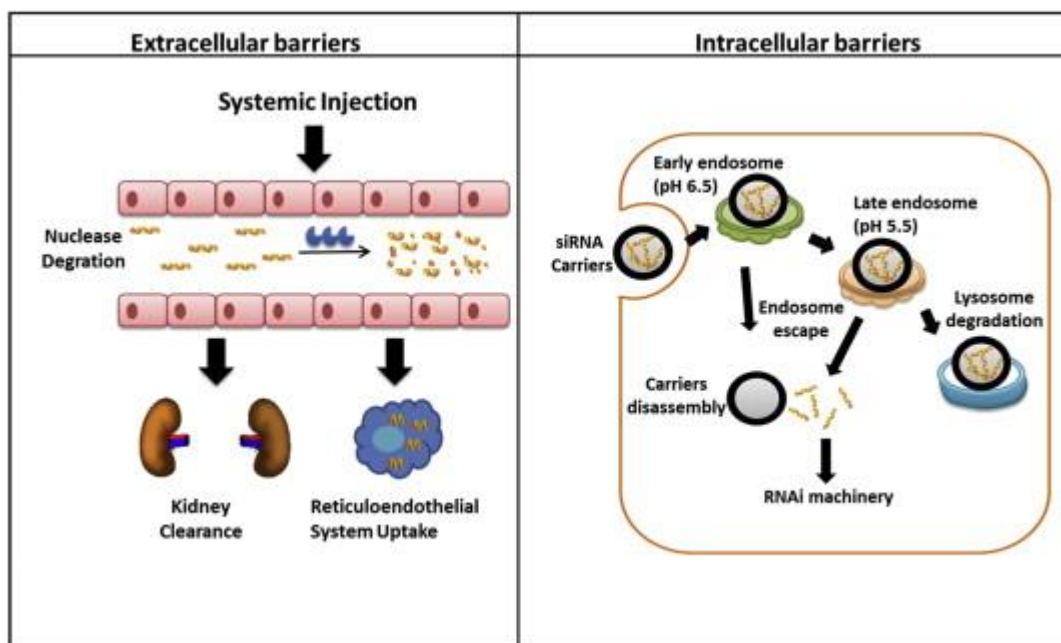


Рис. 1 . Бар'єри, з якими стикається міРНК після системного введення . міРНК може деградувати в крові або видалитись нирковою екскрецією або макрофагами. міРНК можуть не досягти своїх клітин-мішеней через електростатичне відштовхування. Після інтерналізації міРНК може перешкодити досягненню їх внутрішньоклітинної цільової мРНК через неможливість виходу з шляху ендосоми-лізосоми.

3.2 . Критерії проектування системи доставки міРНК

Щоб застосувати міРНК до терапії, бар'єри доставки міРНК *in vivo* є головними проблемами, які слід вирішити. Відповідно до бар'єрів міРНК, які зустрічаються при терапії хвороб, існує кілька критеріїв системи доставки міРНК. Оскільки молекули міРНК занадто великі (~ 13 кДа) і занадто негативно заряджені, щоб дифузувати лише по мембранах клітин, питання ефективного та нетоксичного доставки є ключовим викликом і служить найважливішим бар'єром між технологією міРНК та її терапевтичним застосуванням [20]. . Щоб систематично вводити міРНК і дозволяти їй перетинати фізіологічні бар'єри, щоб досягти місця дії, системи доставки повинні бути спроектовані так, щоб (I) забезпечували стабільність сироватки, (II) дозволяли ухилятися від імунітету, (III) пом'якшували взаємодію з

білками сироватки та хворобові клітини, (IV) протистоїть нирковому кліренсу, (V) посилюють проникність судин до клітин мішеней, (VI) дозволяють потрапляння клітин та втечу ендосом у механізм РНКі [7]., [20]. та (VII) мають низьку токсичність.

По-перше, міРНК слід вводити в кров для терапії. Як тільки голі молекули РНК вводяться в кров, вроджена імунна система стимулюється, і нуклеази сироватки негайно руйнують РНК. Загальною стратегією уникнення цих проблем є модифікація основи міРНК за допомогою хімічних елементів. Найбільш часто використовуваними стратегіями хімічної модифікації є включення 2'-О-метильних та 2'-дезоксид-2'-фторних груп, блокованих або незаблокованих нуклеїнових кислот або фосфоротіоатних зв'язків [21]. . Спеціальний дизайн послідовності та структури міРНК також може уникнути розпізнавання вродженою імунною системою. Хоча хімічні модифікації можуть вирішити деякі проблеми доставки міРНК, наночастинкищо інкапсулюють міРНК краще захищають її від деградації та імунного розпізнавання [22]. . Отже, потрібні не тільки модифікації хімічної структури міРНК, але також необхідні додаткові матеріали для доставки, щоб подолати інші бар'єри в організмі.

У крові багато компонентів, які різними способами будуть взаємодіяти з доставкою міРНК. Високі позитивні заряди на поверхні наночастинок можуть спричинити несприятливу агрегацію з еритроцитами [23]., але такий вид взаємодії між наночастинами та білками сироватки може також сприяти засвоєнню хворобливими клітинами [24]., [25]. . Наприклад, багато ліпосомних систем доставки, а також міРНК, кон'югована з ліпофільними молекулами, взаємодіють із сироватковими ліпопротеїнами і згодом потрапляють у гепатоцити, які поглинають ці ліпопротеїни [24]. . Проте сироваткові білки опсоніну можуть також адсорбуватися на поверхні доставляючих наночастинок і мітити їх для поглинання моноядерна система фагоцитів (MPS) [7]., [26]. Основним шляхом очищення наночастинок від крові є опсонізація та подальше поглинання MPS, що заважає їм досягти

своїх цілей. Найбільш часто використовуваною та найкраще охарактеризованою стратегією мінімізації взаємодії між доставляючими наночастинками та білками сироватки є захист поверхні наночастинок поліетиленгліколем (ПЕГ)[7],[27]. Раціональне ПЕГилування доставки наночастинок може продовжити час кровообігу, мінімізуючи неспецифічні взаємодії наночастинок із сироватковими білками, вродженою імунною системою та іншими нецільовими тканинами. ПЕГ утворює бар'єр навколо наночастинок, який забезпечує стеричну стабілізацію та захист від фізіологічного оточення [28]. Довжина ланцюга PEG може мати значний вплив на його стабілізаційні та захисні властивості, і довжина ланцюга, як правило, оптимізована для кожної окремої системи доставки.

Після системного введення існує багато способів, за допомогою яких міРНК виходить з крові, в тому числі через печінку, селезінку, нирки та легені. Однак кліренс нирок - найпоширеніший шлях. Нирка складається з багатьох клубочків, які працюють як природний бар'єр фільтрації, що дозволяє воді та дрібним молекулам проникати в зароджується сечу, тоді як більші молекули утримуються в циркуляції [29]. Розмір пор клубочкового фільтраційного бар'єру становить приблизно 8 нм [30], а виведення через нирку зазвичай відбувається для молекул розміром менше 50 кДа [31]; молекулярна маса оголеної міРНК становить близько 13 кДа [20]. Тому міРНК проходить через клубочки і потрапляє в сечу. Комплексуючи міРНК із синтетичними матеріалами, розмір доставляючої наночастинок можна збільшити, щоб уникнути клубочкової фільтрації через нирки та зарезервувати міРНК для альтернативних цільових органів [31]. Багато систем доставки розраховані на розмір більше 20 нм [32]. Однак 20 нм - це суворя межа, оскільки динамічні полікон'югати (DPC; 10 нм) [33] та трикутні кон'югати N-ацетилгалактозаміну (GalNAc) є високоефективними системами доставки.

Виходячи з посиленого ефекту проникності та утримання (ефект ЕПР), що означає, що наночастинки розміром від десятків до сотень нанометрів

пасивно накопичуються в пухлинах більшою мірою, ніж у нормальній тканині, головним чином тому, що новоутворені судини пухлини зазвичай за формою та архітектурою було розроблено багато систем доставки нанорозмірних лікарських засобів, включаючи міцели або везикули, дендримери, ліпосоми та неорганічні гібридні частинки для терапії хвороб.

Більшість систем доставки міРНК зазнають клітинної інтерналізації через ендоцитоз. Різні системи доставки спрямовані на поліпшення швидкості клітинного поглинання шляхом включення лігандів-націлювачів, які специфічно зв'язуються з рецепторами клітин-мішеней, щоб викликати опосередкований рецепторами ендоцитоз [34]. Адсорбція білків сироватки на поверхні наночастинок може перешкоджати цій взаємодії ліганд-рецептор [35]. В інших системах використовуються проникаючі в клітини пептиди, які можуть індукувати поглинання клітин за допомогою ендоцитозу або неендоцитарних механізмів [36]. Ендоцитозовані матеріали потрапляють у зв'язані з мембраною ендоцитарні пухирці, які зливаються з ранніми ендосомами і стають дедалі кислотнішими, коли дозрівають до пізніх ендосом. Деякі системи доставки включають матеріали, розроблені для реагування на середовище з низьким рН, стаючи руйнуючи мембрану, щоб викликати вивільнення міРНК з ендосом у цитоплазму [33]., [37]. Тим не менше, точний механізм ендосомного вивільнення багатьох систем доставки міРНК недостатньо вивчений.

Крім того, низька токсичність є найважливішою частиною систем доставки міРНК. Якщо доставка міРНК провокує неприйнятну токсичність як на клітинному, так і на системному рівні, навіть найефективніша система доставки міРНК стане марною. Вірусні вектори, які були одними з перших носіїв, що вивчалися для доставки міРНК, можуть індукувати неприйнятні рівні токсичності шляхом активації імунних відповідей [38]. Тому синтетичні ліпіди та полімери були розроблені, щоб запропонувати альтернативи вірусним векторам для доставки нуклеїнової кислоти, і ретельно сформульовані, щоб уникнути стимуляції імунної системи [15].

Очищення матеріалів більшої молекулярної маси, як правило, вимагає їх біологічного розкладу. Використання біодеградуючих полікатіонів з високою молекулярною масою та полімерів, що містять зв'язки, які можуть розщеплюватися всередині клітини, може допомогти зменшити цитотоксичність [39]. .

3.3 . Потенційні системи доставки ліків міРНК

Хоча повідомлялося про багато стратегій, які можуть доставити міРНК в цитоплазму клітин, більшість із них можуть задовольнити лише застосування *in vitro* . Більшість препаратів міРНК в клінічних випробуваннях безпосередньо вводяться в регіони, що несуть патологію, щоб уникнути складності системного розродження. За їх цілями їх можна розділити на дев'ять класів, включаючи захворювання очей, вроджену пахіоніхію , вірусні захворювання, астму, гіперхолестеринемію , гостру травму нирок , амілоїдоз тироксину та хвороба [40].. Однак чудовий терапевтичний потенціал міРНК для терапії хвороб залишається не виявленим. Необхідно запровадити системні шляхи доставки міРНК для лікування більшості видів хвороб.

Як зазначалося вище, критерії проектування системної системи доставки міРНК *in vivo* повинні включати біосумісність, біологічну розкладність та неімуногенність. Крім того, система повинна захищати міРНК від нуклеаз сироватки та ефективно доставляти її в клітини-мішені. Нарешті, система доставки повинна забезпечити міРНК здатність виходу ендосоми для проникнення в механізм РНКі та активації шляхів РНКі [41]. , [42]. . На даний час розроблені системи доставки міРНК для терапії хвороб можна розділити на чотири категорії: хімічні модифікації, нановектори на основі ліпідів, опосередковані полімером системи доставки, системи доставки кон'югатів та інші (екзосоми, РНКі-мікрогубки, наночастинки олігонуклеотидів).

3.4. Отримання міРНК

РНКі був вперше виявлений в *C. elegans* і використовувались як інструмент протягом декількох років, перш ніж він отримав назву РНКі. Спочатку РНК проводили шляхом мікроін'єкції відповідних длРНК у глистів, щоб спостерігати за фенотиповими змінами батьків та нащадків[4]. Того ж року Ліза Тіммонс та Ендрю Фаєр виявили, що *C. elegans* демонструє генно-специфічні манери в залежності від длРНК в середовищі впливу. *C. elegans* зазвичай харчуються бактеріями, всмоктуючи глотку і згодом перетравлюючи їх в кишечнику. Таким чином, бактерії, які експресують длРНК, можуть призвести до специфічного замовчування генів на нематодах, які живляться бактеріями. Хірлакі Табара, Крейг С. Мелло та їх одногрупник також показали, що годування та замочування глистів у кшРНК є ефективними способами приглушення генів[53]. І ці методи мають перспективу для високопродуктивної РНКі[54, 55, 56].

Цей метод починається зі утворення кормового штаму. Спочатку виберіть цільову область приблизно 500 п.н., що відповідає мРНК, і зв'яжіть у плазміді, що мають специфічну структуру. Потім плазміді слід трансформувати в мутантний штаб РНКізи III *E. coli* для експресії длРНК. Одне, що потребує особливої згадки тут, полягає в тому, що ефект приглушення генів на рідке культуральне середовище або пластини, що живлять нематоди, подібний, залежно від проникнення та ефективності експресії. Однак експериментальні процеси та обмеження все ще відрізняються[57].

Синтетично екзогенна міРНК - це повністю спарений в основі 21-22 нуклеотид. Як правило, це хімічний синтетичний полінуклеотид.

Розробка послідовностей ефективної та специфічної міРНК є запорукою успішного замовчування генів за допомогою РНКі. На сьогодні різні алгоритми та програми проектування міРНК розроблені та широко

використовуються біологами для проектування міРНК. Ці алгоритми мають певні правила, звані правилами Тушля, які базуються на деяких параметрах, включаючи довжину, 3' звис, відсутність ділянок інтронів, вміст GC, відсутність повторів, відсутність сайтів поліморфізму одиночного нуклеотиду (SNP), гомологію з іншими генами або послідовностями, Вторинна структура РНК та ін[7, 25, 26, 27]. Через два роки Хворова та ін. припустив, що термодинамічні властивості міРНК також є критично важливими складовими при визначенні функції та довговічності, залучаючи до дуплексного розмотування міРНК та відбору ланцюга[28].

Після багатьох років розвитку зараз існують різні веб-програми, які розробляють кандидатів на міРНК. Факультети Гонконзького університету об'єднали 11 безкоштовних онлайн-інструментів проектування міРНК і розробили власний алгоритм фільтрації для фільтрації неефективних міРНК (<http://i.cs.hku.hk/~miRNA/software/miRNA.php>) [29]. Було показано, що багато програм проектування міРНК, як правило, вибирають різних кандидатів міРНК з діапазоном ефективності міРНК, навіть якщо ми використовуємо однакові алгоритми з однаковими цільовими послідовностями[30]. Отже, рекомендується використовувати дві або більше програм проектування міРНК та порівняти численні набори кандидатів для пошуку оптимальних послідовностей міРНК.

Після отримання міРНК, яка проти конкретного гена, її необхідно ефективно доставити в клітини. Існує три ефективні та недорогі методи доставки міРНК: трансфекція, електропорація та вірусний вектор. Перші два - це невірусна доставка, решта - це, як випливає з назви, вірусна доставка. Трансфекція, як правило, має три режими: катіонні ліпосоми, наночастинки полімеру та кон'югація ліпідів. Відносно легко трансфікувати міРНК у більшість клітинних ліній з високою ефективністю та відтворюваністю, і пропонується багато комерційних реагентів. Однак він не підходить для всіх видів клітин, таких як первинні клітини та клітини, що не діляться, і має низьку ефективність *in vivo* [31]. Для важко трансфікованих первинних

клітин, стовбурових клітин та нейрональних клітин електропорація, інший метод внутрішньоклітинної доставки, може бути хорошим вибором. Клітинна мембрана складається з фосфоліпідного бішару, який схильний до ураження електричним струмом. Коли є потужний імпульс напруги, молекули ліпідів переорієнтуються, утворюючи гідрофільні пори, щоб пропускати нуклеїнові кислоти через електричний струм. Але для різних типів клітин потрібні різні оптимальні параметри, і цей спосіб простіше змусити клітину загинути. Доставка, опосередкована вірусами, подібна до трансдукції, доставляє міРНК через деякі рекомбінантні вірусні вектори на основі ретровірусу, аденоасоційованого вірусу (AAV), аденовірусу та лентівірусу. Його можна використовувати для первинних та неділитися клітин, сумісних для експериментів *in vivo* та стабільної експресії[32].

Доктор Марк Гельм та його одногрупники використовували мічену флуоресцентною міРНК, щоб простежити долю та їх субклітинне розташування синтетичної міРНК. З результатів візуалізації на основі флуоресцентного резонансного переносу енергії (FRET), як тільки міРНК потрапляє в клітину, вона переміщується в ядро і досягає високих концентрацій на ранніх термінах, а потім переміщається в цитоплазму протягом наступних 4 годин. До 48 год майже 99% міРНК розкладається. Це відповідає активності РНКі, яка досягає піку приблизно через 24 год і зменшується протягом 48 год. 33 У цьому процесі міРНК збирається з РНК-індукованим мовчазним комплексом (RISC) без необхідності продовжувати обробку Tat-РНК-зв'язуючим білком (TRBP) / активуючим РНК білком (RISC)/ Dicer-комплексом, який необхідний для кшРНК або довго длРНК[34].

3.5. Висновок до розділу

Системи доставки наночастинок повинні мати розмір частинок приблизно 20–200 нм, тобто бути достатньо великими, щоб уникнути ниркової фільтрації, але досить малими, щоб уникнути фагоцитарного

кліренсу. ПЕГ як захисний засіб виявився цінним для запобігання неспецифічних взаємодій та уникнення імунного розпізнавання в циркуляції [40]. Хімічні модифікації, такі як заміщення 2'-О-метилу, необхідні для мінімізації неспецифічних ефектів та уникнення перетравлення нуклеаз. Крім того, ендогенні або екзогенні ліганди-націлювачі також часто корисні для поглинання міРНК хворобливими клітинами. Хоча низка звітів продемонстрували великий потенціал міРНК в лікуванні хвороб, залишаються труднощі щодо забезпечення повного потенціалу міРНК в клініці, і більшість систем доставки міРНК все ще перебувають у доклінічних дослідженнях. В останні роки розробка препаратів міРНК зазнала високих і мінімальних рівнів. Ставлення великих фармацевтичних компаній до препаратів РНКі також стало надмірно оптимістичним. Підсумовуючи, хороша система доставки є запорукою розробки ліків міРНК.

Системи доставки, які показали ефективність *in vivo*, демонструють велику різноманітність за структурою, розміром, хімією та загальним підходом до проблеми доставки. Системи, які обговорюються тут, є дуже ефективними, перспективними кандидатами, але вони є унікальними в багатьох аспектах своїх конструкцій. Деякі з них мають точно визначені структури, тоді як інші неоднорідні. Їх розміри варіюються від сотень нанометрів до розміру однієї міРНК. Деякі міцно тримаються разом за допомогою ковалентних зв'язків або точного склеєння водню; інші пов'язані гідрофобні або іонографічні взаємодії. Наночастинки, що складаються з синтетичних ліпідів, є одними з найбільш потужних рецептури в розробці трубопроводу. Кон'югатні системи користуються точно визначеними молекулярними структурами з мінімальною кількістю матеріалів доставки і, мабуть, широкими терапевтичними вікнами, а їх ефективність продовжує поліпшуватися. Незважаючи на те, що в лабораторії були розроблені різні системи доставки, проблеми залишаються в залученні повного потенціалу РНКі в клініку. Найбільш передовими системами є наночастинки, утворені шляхом змішування і самостійного складання різних компонентів, але цей

метод рецептури представляє додаткові проблеми в масштабі процесу виробництва, такі як необхідність жорстко контрольованих процесів змішування для досягнення стабільної якості лікарського продукту[112]. Насправді, мікрофлюїдні методи вже використовуються для підвищення якості та відтворюваності рецептури LNP84,[113]. В даний час найбільш клінічно передові системи доставляють міРНК в добре перфузні тканини, такі як печінка, де фенестований або переривчастий ендотелію дозволяє проходження макромолекулів до цільових тканин. Але доставка в менш доступні тканини залишається значним викликом. Безпечна та ефективна доставка міРНК до багатьох тканин, де вона має терапевтичний потенціал, ймовірно, потребуватиме розробки різних систем, кожна з яких оптимізована для вирішення конкретних проблем доставки до певної тканини. Оскільки наше механістичне розуміння процесу доставки залишається неповним, ми маємо лише деякі настанови щодо характеристик оптимальних матеріалів доставки. Системи доставки наночастинок спрямовані на розмір частинок 20-200 нм, достатньо великі, щоб уникнути фільтрації нирок, але досить малі, щоб уникнути фагоцитарного кліренсу. Захисні агенти, такі як PEG, виявилися цінними в запобіганні неконкретивних взаємодій і уникненню розпізнавання імунітету в обігу. Хімічна модифікація міРНК зазвичай використовується для підвищення стійкості нуклеази та зниження імуностимуляції. Експлуатація ендогенних або екзогенних таргетингних лігандів часто корисна для поліпшення споживання цільовими клітинами. Мембранні руйнівні матеріали, які захищені або нейтралізовані в обігу, але стають активними в ендосомі, виявилися ефективними. Але навіть ці встановлені керівні принципи не встановлені в камені. Наприклад, передбачається, що міРНК повинна втекти від ендосом для того, щоб викликати РНКі, але ми спостерігаємо ефективне заглушення від транспортних засобів доставки, таких як кон'югати GalNac, які не включають в себе ніякої moiety, спрямованої на досягнення цього. Такі системи доставки досягають техніки РНКі невідомими перспективами. Дійсно,

вони можуть слідувати нерозкритими внутрішньоклітинними шляхами торгівлі людьми, можуть втекти від ендосом неідентифікованим механізмом або можуть входити в клітини невідомим не ендочитичним способом. Продовження досліджень на різноманітних платформах доставки допоможе з'ясувати біологічні явища, які в даний час незрозумілі, і з'явиться більше керівних принципів. Дійсно, важливі частини процесу доставки залишаються нез'ясованими, і в дизайні матеріалів доставки міРНК є багато місця для творчості та інновацій.

4 ОХОРОНА ПРАЦІ

4.1. Небезпечні та шкідливі виробничі фактори при роботі в лабораторії

Під час отримання ферменту α -амілази на працівників підприємства впливають небезпечні та шкідливі виробничі фактори (НШВФ). Згідно з ГОСТ 12.0.003-74* ССБТ [117], вони поділяються на такі групи: фізичні, хімічні, біологічні, психофізіологічні.

Були виявлені наступні фактори:

1. Фізичні НШВФ:

- рухомі частини виробничого обладнання (ротори центрифуг);
- підвищений рівень шуму на робочому місці (центрифуга, просіювач, ферменер, витяжна шафа);
- підвищений рівень вібрації (просіювач, центрифуга);
- підвищене значення напруги в електричному ланцюзі, замикання якого може статися через тіло людини (всі електроприлади);
- підвищена температура поверхонь обладнання (ліофільна сушарка, ферменер);
- підвищена рухомість повітря (витяжна шафа);
- недостатність природного світла (на дільниці виробничого культивування);
- недостатня освітленість робочої зони (на дільниці виробничого культивування);

2. Біологічні НШВФ (патогенні мікроорганізми і продукти їх життєдіяльності):

- мікроорганізми (*E. coli*, стафілококки, тощо);
- простіші (акант, амеба);
- гельмінти (аскариди, остриці).

3. Психофізіологічні НШВФ:

- фізичні перевантаження (статичні: робота при постійній позі);
- нервово-психічні перевантаження (розумові перенапруження при аналізі та обробки результатів дослідження; перенапруження зорового аналізатору при проведенні дослідження; монотонність праці).

4.2. Технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних та шкідливих виробничих факторів при роботі в лабораторії

До роботи допускаються тільки ті працівники, які пройшли вступний та первинний інструктаж з охорони праці у хімічній лабораторії. Працівник повинен мати усі засоби індивідуального захисту (халат, гумові рукавички та респіратор). Робоче місце повинно знаходитися у належному стані. Все обладнання повинне бути у робочому стані.

Для усунення або максимального зниження дії виявлених небезпечних та шкідливих факторів, проектом передбачено виконання наступних заходів:

- До роботи допускаються особи не молодше 18 років, які пройшли медогляд, які володіють вмінням безпечної роботи, пройшли усі необхідні види інструктажів, перевірку знань з техніки безпеки.
- Шкідливу дію машин та механізмів, що рухаються, зменшують регулярними ремонтними роботами, контролем за надійністю гальм, обмеженням швидкості руху по території 10 км/год.
- Все теплове обладнання надійно ізольовано та має місцеві відсмоктувачі.
- На усіх рухливих деталях встановлюються кожухи та звукова сигналізація про вмикання, блокуючи пристрої.

– Обладнання, що є джерелом шуму огорожується і встановлено в окремому приміщенні, а працівникам видаються засоби індивідуального захисту. воно регулярно змащується та ремонтується.

– Підлога мийного відділення водонепроникна та має уклін. Робота каналізації регулярно контролюється, а працюючим видається спецодяг з водонепроникних матеріалів. відділення вентильовується.

– Майданчики мають стаціонарні сходи. Ширина майданчика 2 м. Загородження перилами мають висоту 1,0 м. Сходи майданчиків та сходинок виготовлені з рифленої сталі.

– Усе електрообладнання надійно огорожено, ізолювано, заземлено та має пристрої вимкнення.

– Реактори мають запобіжні клапани, які перевіряють кожну зміну.

– В лабораторії встановлена система припливно-витяжної вентиляції. Передбачається ущільнення та герметизація теплового обладнання та паропроводів.

– Усі трубопроводи для розпізнання транспортуємих середовищ фарбуються в наступні кольори: для води – зелений, пари – червоний, повітря – синій.

– Здійснюється регулярний контроль за виконанням обслуговуючим персоналом правил внутрішнього розпорядку та особистої гігієни.

– Усе обладнання після роботи піддається ретельному миттю та дезинфекції.

– Обладнання лабораторії розміщено таким чином, щоб забезпечити вільний доступ до нього для обслуговування або ремонту.

– Проходи не загромаджуються, відходи регулярно вивозяться, а транспорт і тара дезінфікується. Робочі місця знаходяться у чистоті та порядку.

– Для зниження дії хімічних факторів, працюючі з лугами забезпечуються бавовняно-паперовим костюмом з лугозахистною пропиткою, гумовими чоботами, захисними окулярами, гумовими рукавицями.

– Весь персонал має навички надання долікарської допомоги при травмах, опіках, ураженні електричним струмом.

Для збереження здоров'я людини велике значення мають умови мікроклімату, які характеризуються температурою повітря, його вологістю і швидкістю руху. При цьому, різній інтенсивності робочого навантаження відповідають різні значення цих параметрів. Для заводу, що проектується допустимими є наступні параметри, які наведені у таблиці 4.2.

Таблиця 4.2

Величини температур, відносної вологості і швидкості руху повітря у робочій зоні виробничих приміщень

Період року	Категоріяробіт	Температура, °С				Відносна вологість, %		Швидкість руху, м/с		
		Оптимальна	Допустима		Оптимальна	Допустима на робочих місцях постійних і не постійних, не більше	Оптимальна, не більше	Допустима на робочих місцях постійних і не постійних, не більше		
			Верхня межа	Нижня межа						
			На робочих місцях							
Постійних	Не постійних	Постійних	Не постійних							
Холодний	Легка 1а	22-24	25	26	21	18	40-60	75	0,1	0,1
Теплий	Легка 1а	23-25	28	30	22	20	40-60	55 при 28°С	0,1	0,1-0,2

Примітка: більша швидкість руху повітря у теплий період року відповідає максимальній температурі повітря, менша мінімальній

температурі повітря. Для проміжних величин температурі повітря швидкість його руху може бути визначена інтерполяцією[120].

Для забезпечення оптимальних параметрів мікроклімату в цеху проектується система вентиляції-опалення.

Окрім централізованої сумісної системи вентиляція-опалення в цеху, що проектується, в місцях встановлення обладнання з підвищеним виділенням тепла і випаровуванням води передбачені місцеві відсоси нагрітого вологого повітря. За сприятливих параметрів зовнішнього повітря для природної вентиляції і аерації виробничого приміщення передбачено використання фрамуг ліхтаря і вікон. Для обмеження променевого теплообміну з нагрітим обладнанням і трубопроводами їх поверхні надійно ізольовані.

Рівень шуму на робочому місці не повинен перевищувати 80 дБА. Для боротьби з підвищеним шумом і вібрацією застосовують звукоізолюючі прокладки, амортизатори і кожухи, проводять регулярний контроль і ремонт обладнання, застосовують використання обладнання на номінальних режимах роботи (тобто усунення холостого ходу). При перевищенні допустимого рівня шуму робітники застосовують засоби індивідуального захисту – антифони, навушники, шлемофони. Машини і апарати, що створюють підвищений рівень шуму, необхідно встановлювати в окремому приміщенні. Контроль рівнів шуму на робочих місцях проводиться не менше 1 разу на рік (ДСН 3.3.6.037 – 99).

Вимоги щодо вібраційної безпеки робочих місць викладені в ДСН 3.3.6.039 – 99[121].

Санітарні норми одночислових показників вібраційного навантаження на оператора для тривалості зміни 8 годин наведені в таблиці 4.2.1.

Таблиця 4.2.1

**Санітарні норми одночислових показників вібраційного навантаження
на оператора для тривалості зміни 8 годин**

Вид вібрації	Категорія вібрації згідно санітарних норм	Напрямок дії	Нормативні, кореговані за частотою і еквівалентні кореговані значення			
			Віброприскорення		Віброшвидкості	
			м * с ⁻²	дБ	м * с ⁻¹ *10 ⁻²	дБ
Локальна	-	X _л , Y _л , Z _л	2,000	126	2,000	112
Загальна	1	Z _о ,	0,560	115	1,100	107
		Y _о , X _о	0,400	112	3,200	116
	2	Z _о , Y _о , X _о	0,280	109	0,500	101
	3 тип «а»	Z _о , Y _о , X _о	0,100	100	0,200	92
	3 тип «в»	Z _о , Y _о , X _о	0,014	83	0,028	75

Обов'язковою умовою комфортності є обмеження променистого теплообміну людини з нагрітими поверхнями обладнання, температура яких не повинна перевищувати 45 °С, за умови розміщення робочого місця ближче ніж 1 м від нагрітої поверхні.

В лабораторії передбачені заходи, які забезпечують необхідний санітарний стан виробництва: мийка і профілактична дезинфекція приміщень та обладнання; для захисту від комах застосовують сітки та липкий папір; для захисту від гризунів – оббивають пороги і двері приміщень на висоту 0,4...0,5 м листовим залізом, закривають отвори вентиляційних каналів захисними сітками, своєчасно очищують цех від відходів.

Для зменшення втоми працівники лабораторії повинні кожну годину роботи перерву на 15 хв. та робити фізичні вправи кожні 3 години роботи [122].

Для забезпечення здоров'я працівників необхідно проводити санітарно-профілактичне обслуговування персоналу, проведення інгаляцій лікувальними речовинами і ультрафіолетове опромінення в соляріях або за допомогою еритемних ламп.

У аптечці, окрім загального набору медикаментів, повинні бути розчини питної соди, борної та лимонної кислот необхідної концентрації, камфора, рицинова олія, палена магнезія. Наявність медикаментів та їх строк придатності повинна перевірятися відповідальним за охорону праці 1 раз на квартал.

4.2.1. Розрахунок штучного освітлення при отриманні міРНК

Розрахунок штучного освітлення в лабораторії методом коефіцієнтів використання світлового потоку.

Розміри приміщення: довжина $a=6$ м, ширина $b=3$ м, висота $H=4,2$ м, в приміщенні передбачена світла побілка: коефіцієнт відбиття від стелі $\rho_{\text{стелі}}=70\%$, $\rho_{\text{стін}}=50\%$, $\rho_p=60\%$. Висота робочих поверхонь $h_p=0,7$ м, відстань від світильника до стелі $h_c=0,5$ м. Мінімальна освітленість за норми $E=300$ лк.

Визначаємо висоту підвісу світильників над підлогою:

$$h_o = H - h_c = 4,2 - 0,5 = 3,7 \text{ м}$$

Висота підвісу світильника над робочою поверхнею дорівнює:

$$h = h_o - h_p = 3,7 - 0,7 = 3 \text{ м}$$

Рівномірність освітлення досягатиметься при відповідному співвідношенні відстані між світильниками L і висоті їх підвісу h . Визначимо рекомендовану відстань між світильниками:

$$L = 0,7h = 0,7 \cdot 3 = 2,1 \text{ м}$$

Необхідна кількість світильників становить:

$$N = \frac{ab}{L^2} = \frac{6 \cdot 3}{2,1^2} = \frac{18}{4,41} = 4,08 = 4 \text{ шт}$$

Приймаємо 4 світильники, враховуючи розміри приміщення передбачається розміщення їх в два ряди по 2 штук.

Показник приміщення i становить:

$$i = \frac{ab}{h(a+b)} = \frac{6 \cdot 3}{3(6+3)} = \frac{18}{27} = 0,66$$

Відповідно коефіцієнт використання світлового потоку $\eta=0,38$ при $i=0,7$, $\rho_{\text{стелі}}=70\%$, $\rho_{\text{стіни}}=50\%$, $\rho_{\text{р}}=60\%$.

Світловий потік одного світильника дорівнює:

$$\Phi_{\lambda} = \frac{E S K_{\lambda} Z}{N \eta} = \frac{300 \cdot 18 \cdot 1,4 \cdot 1,1}{4 \cdot 0,38} = \frac{8316}{1,52} = 5471,052 \text{ лм}$$

За розрахунковими значеннями світлового потоку вибирають найближчу стандартну лампу, потік якої може відрізнятись від розрахункового не більше як на $-10 \dots +20\%$. Отже, межі світлового потоку стандартної лампи: 4923,9...6565,2 лм.

Відповідно до технічних даних передбачено вибір ламп типу ЛБ-80-4; $F = 5220$, світловий потік якої становить 5220 лм.

Знайдемо кількість ламп n :

$$n = \frac{E S K_{\lambda} Z}{\Phi_{\lambda} \cdot \eta} = \frac{300 \cdot 18 \cdot 1,4 \cdot 1,1}{5220 \cdot 0,38} = 4,19 \approx 4 \text{ шт}$$

4.3 Забезпечення пожежної та вибухової безпеки в лабораторії

Пожежна безпека лабораторії обумовлена розташуванням об'єкту що проектується та інших споруд, раціональним плануванням водопровідних мереж, наявністю та розташуванням резервів для споруд. Для своєчасного виявлення та гасіння пожежі передбачено необхідні засоби (пожежна сигналізація, інвентар, вогнегасники). Автомобільні дороги та проїзди на території підприємства забезпечують доступ до пожежних водойм, засобів пожежогасіння, а також до споруд та будівель. Основний засіб пожежогасіння – вода[126].

Для забезпечення пожежної безпеки виробництва необхідно зробити наступні заходи:

- освітлення території в темний час доби;
- заборона на спалювання тари і відходів на підприємстві;
- дозволити паління лише у відведених місцях;
- устаткування приміщень засобами автоматичного пожежогасіння і пожежної сигналізації;
- забезпечення підприємства необхідною кількістю води;
- обслуговування пожежних гідрантів і водойм;
- комплектація пожежних кранів у середині цеху рукавами і стовбурами;
- забезпечення всіх будівель пожежними щитами, на яких написано номер телефону пожежної охорони і інвентарем (пожежними засобами пожежогасіння): вогнегасники, ящики з піском, бочки з водою, совкові лопати, пожежні відра, ломи, сокири, багри;
- підтримка вогнегасників у справному стані;
- розробка плану евакуації і вивішування його на видних місцях;
- не загроможувати евакуаційні шляхи;
- експлуатація устаткування тільки в режимах, відповідних паспортним даним;
- застосування аспірації й установок аварійної вентиляції;
- виключення вогневих робіт одночасно з розбиранням устаткування і продуктопроводів при яких можливе виділення палих речовин, а також при нанесенні антикорозійних покриттів, нітрофарб і інших матеріалів з легкозаймистими розчинами;
- застосування маркірування і фарбування технологічних трубопроводів;

- своєчасне проведення оглядів, профілактичних іспитів і планово попереджувальних ремонтів машин[128].

Передбачено встановлення вогнегасників, розрахунок яких проводиться виходячи з категорії приміщень за пожежонебезпекою, класу можливих пожеж, вибраного типу вогнегасника та площі цеху. Склад готової продукції, склад сировини відносяться до категорії В, цех, в якому будуть проходити основні технологічні процеси за пожежонебезпекою відноситься до категорії В(основні технологічні процеси). Враховуючи загальну площу цеху – $S_{ц}=112\text{м}^2$, задаємося вогнегасниками марки ВВК-2 в кількості 1 шт. на кожні 50 м^2 захищеної площі. Тоді необхідна кількість вогнегасників лабораторії

$$n = (S_{ц}/50) = (112/50) = 2,24 \sim 3 \text{ шт.} \quad (4.3)$$

Приймаємо 3 вогнегасників.

Таблиця 4.3

Вибір вогнегасників

Назва	Клас вибухо-пожежної і пожежно-безпечної зони	Категорія приміщення за вибухо-пожежною і пожежною небезпекою	Кількість вогнегасників, шт
Біля входу	II-IIIa	В	1 вогнегасник
Відділення основних лабораторних маніпуляцій процесів	II-IIIa	В	2 вогнегасники

Всі вогнегасники рівномірно розподілені по всій території лабораторії в місцях найбільш небезпечних в пожежному відношенні, розташовані поблизу дверей, в місцях з доброю видимістю. В лабораторії передбачені евакуаційні виходи на випадок пожежі. Працюючих в лабораторії систематично інспектують з питань пожежо- та вибухобезпеки. В лабораторії встановлені щити з пожежним інвентарем та ящики з піском[118].

4.4. Висновок до розділу

Для забезпечення функціональності лабораторного приміщення, було розраховано кількість ламп 4 шт. і їх світловий потік для комфортного перебування в лабораторії. Також, розраховано кількість вогнегасників 3шт./м².

Для усунення або максимального зниження дії виявлених небезпечних та шкідливих факторів, проектом передбачено виконання наступних заходів:

- До роботи допускаються особи не молодше 18 років, які пройшли медогляд, які володіють вмінням безпечної роботи, пройшли усі необхідні види інструктажів, перевірку знань з техніки безпеки.

- Шкідливу дію машин та механізмів, що рухаються, зменшують регулярними ремонтними роботами, контролем за надійністю гальм, обмеженням швидкості руху по території 10 км/год.

- Все теплове обладнання надійно ізольовано та має місцеві відсмоктувачі.

- На усіх рухливих деталях встановлюються кожухи та звукова сигналізація про вмикання, блокуючи пристрої.

- Обладнання, що є джерелом шуму огорожується і встановлено в окремому приміщенні, а працівникам видаються засоби індивідуального захисту. воно регулярно змащується та ремонтується.

- Підлога мийного відділення водонепроникна та має уклін. Робота каналізації регулярно контролюється, а працюючим видається спецодяг з водонепроникних матеріалів. відділення вентилується.

- Усе електрообладнання надійно огорожено, ізольовано, заземлено та має пристрої вимкнення.

- Реактори мають запобіжні клапани, які перевіряють кожну зміну.

- В лабораторії встановлена система припливно-витяжної вентиляції.

Передбачається ущільнення та герметизація теплового обладнання та паропроводів.

- Для зниження дії хімічних факторів, працюючі з лугами забезпечуються бавовняно-паперовим костюмом з лугозахисною пропиткою, гумовими чоботами, захисними окулярами, гумовими рукавицями.

- Весь персонал має навички надання долікарської допомоги при травмах, опіках, ураженні електричним струмом.

5. ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

В необхідності охорони природи і охорони довкілля людини не виникає сумніву, проте ці аспекти мають дещо різне підґрунтя і реалізуються на різних ділянках з різними пріоритетами. Охорона природи реалізується в умовах природних екосистем шляхом утворення природно-заповідного фонду і основним пріоритетом даної ділянки є збереження природного біорізноманіття, первинного ландшафту тощо. Під охороною природи розуміють систему заходів, що скеровані на збереження, відновлення і раціональне використання природних ресурсів, підтримання природного видового біорізноманіття, попередження прямого чи опосередкованого впливу діяльності людини на природу. Охорона довкілля людини реалізується в межах природно-антропогенних та антропогенних екосистем і основним пріоритетом даних територій є збереження життя і здоров'я людини. Під охороною довкілля людини розуміють систему заходів і дій, що направлені на підтримку взаємодії людини і довкілля з метою стабілізації якості об'єктів довкілля, що попереджує негативний вплив господарської діяльності людини на здоров'я і життя людей. Слід зазначити, що людина не є самим чутливим компонентом довкілля, хоча більшість функцій людини є консервативними. -137- Тому, кінцевою метою охорони природи і охорони довкілля людини є гармонізація відношення природи і суспільства, що є запорукою нормального функціонування природних екосистем, підтримання якості об'єктів довкілля з точки зору вимог людини та збереження цілісності екосистем, тобто охорона навколишнього природного середовища. Це є основою саморегуляції компонентів довкілля і основою сучасного підходу до проблем охорони природи і охорони довкілля людини є вчення про біосферу Землі. Все в довкіллі взаємопов'язане, отже при будь-якій господарській діяльності людини слід враховувати можливий комплексний характер впливу людини на довкілля і природу. Людина своєю діяльністю прямо чи

опосередковано впливає на зв'язки між компонентами біосфери (і її складових – екосистем) і може істотно їх порушувати. Промислове та сільськогосподарське виробництво, а також інші галузі діяльності людства протягом багатьох років надають негативного впливу на довкілля, проте ця дія до певної міри компенсувалась за рахунок саморегуляції природного середовища. Сучасні масштаби виробництва викликають негативні зміни в екосистемах, що призводить до виникнення негативних тенденцій, аж до екологічних криз. На початку третього тисячоліття навколишнє середовище нашої планети неухильно погіршується внаслідок антропогенного фактору і люди вже не спроможні адаптуватись до цих швидких глобальних змін. Постало питання виживання людства як цивілізації. Усвідомлення реальної можливості наближення регіональних та глобальних екологічних криз поставило питання необхідності розробки правової основи охорони навколишнього природного середовища.

5.1. Нормативно-правові основи охорони природного середовища

Державна політика в галузі охорони навколишнього природного середовища полягає у розробці необхідних заходів щодо охорони та науково-обґрунтованого раціонального використання землі та її надр, водних ресурсів, рослинного та тваринного світу, збереження чистоти повітря та води, забезпечення відтворюваності природних ресурсів та поліпшення оточуючого людину середовища. Цей підхід до охорони навколишнього природного середовища повинен бути підкріплений -138- системою законодавчих актів та нормативно-технічних документів в галузі охорони природи. З метою утворення правової бази охорони навколишнього природного середовища, Верховна Рада України 25 червня 1991 року прийняла Закон “Про охорону навколишнього природного середовища”, який передбачає систему гарантій екологічної безпеки людини і вносить певну впорядкованість в систему управління в галузі природокористування.

Україна здійснює на своїй території екологічну політику, спрямовану на збереження безпечного для існування живої і неживої природи навколишнього середовища, захисту життя і здоров'я населення від негативного впливу, зумовленого забрудненням навколишнього природного середовища, досягнення гармонійної взаємодії суспільства і природи, охорону, раціональне використання і відтворення природних ресурсів. Цей Закон визначає правові, економічні та соціальні основи організації охорони навколишнього природного середовища в інтересах нинішнього і майбутніх поколінь. У відповідності із статтею 1 цього Закону, завданням законодавства про охорону навколишнього природного середовища є регулювання відносин у галузі охорони, використання і відтворення природних ресурсів, забезпечення екологічної безпеки, запобігання і ліквідації негативного впливу господарської та іншої діяльності на навколишнє природне середовище, збереження природних ресурсів, генетичного фонду живої природи, ландшафтів та інших природних комплексів, унікальних територій та природних об'єктів, пов'язаних з історико-культурною спадщиною.

В статті 3 цього Закону визначені основні принципи охорони навколишнього природного середовища:

- пріоритетність вимог екологічної безпеки, обов'язковість додержання екологічних стандартів, нормативів та лімітів використання природних ресурсів при здійсненні господарської, управлінської та іншої діяльності;
- гарантування екологічно безпечного середовища для життя і здоров'я людей;
- запобіжний характер заходів щодо охорони навколишнього природного середовища;
- екологізація матеріального виробництва на основі комплексності рішень у питаннях охорони навколишнього природного середовища, використання та відтворення відновлюваних природних ресурсів, широкого

впровадження новітніх технологій; • збереження просторової та видової різноманітності і цілісності природних об'єктів і комплексів;

- науково обґрунтоване узгодження екологічних, економічних та соціальних інтересів суспільства на основі поєднання міждисциплінарних знань екологічних, соціальних, природничих і технічних наук та прогнозування стану навколишнього природного середовища; • обов'язковість екологічної експертизи;

- гласність і демократизм при прийнятті рішень, реалізація яких впливає на стан навколишнього природного середовища, формування у населення екологічного світогляду; • науково обґрунтоване нормування впливу господарської та іншої діяльності на навколишнє природне середовище;

- безоплатність загального та платність спеціального використання природних ресурсів для господарської діяльності; • стягнення збору за забруднення навколишнього природного середовища та погіршення якості природних ресурсів, компенсація шкоди, заподіяної порушенням законодавства про охорону навколишнього природного середовища;

- вирішення питань охорони навколишнього природного середовища та використання природних ресурсів з урахуванням ступеня антропогенної змінності територій, сукупності дії факторів, що негативно впливають на екологічну обстановку;

- поєднання заходів стимулювання і відповідальності у справах охорони навколишнього природного середовища; • вирішення проблем охорони навколишнього природного середовища на основі широкого міжнародного співробітництва. Цей Закон України закріплює екологічні права і обов'язки громадян України, визначає повноваження різних органів управління у галузі охорони навколишнього природного середовища, вимоги до спостереження, прогнозування, обліку та інформування в галузі навколишнього природного середовища, вимоги до проведення екологічної експертизи, вимоги щодо стандартизації і нормування в галузі охорони

навколишнього природного середовища, вимоги щодо контролю у галузі охорони навколишнього природного середовища, регулювання використання природних ресурсів, економічний механізм забезпечення охорони навколишнього природного середовища, вимоги щодо заходів забезпечення екологічної безпеки, природних територій та об'єктів, що підлягають особливій охороні, регулювання у випадках надзвичайних екологічних ситуацій, відповідальність за порушення законодавства про охорону навколишнього природного середовища, регулювання міжнародних відносин України у галузі охорони навколишнього природного середовища. У відповідності із Законом України “Про охорону навколишнього природного середовища”, розроблені відповідні інші законопроекти, які визначають політику держави при охороні окремих складових навколишнього природного середовища шляхом регулювання відношень в галузі охорони навколишнього природного середовища, а саме: Закон “Про природно-заповідний фонд України” (1992 рік); Закон України про охорону атмосферного повітря (1992 рік); Закон України про рослинний світ (1999 рік); Закон України про тваринний світ (2001 рік); Закон України про Червону книгу України (2002 рік); Лісовий кодекс України (1994 рік); Кодекс України про надра (1994 рік); Водний кодекс України (1995 рік); Земельний кодекс України (2001 рік). Крім того, є законопроекти, що регулюють окремі галузі діяльності людини, які можуть впливати на екологічний стан довкілля. Зокрема, це Закон України про екологічну експертизу (1995 рік). Державну політику в галузі охорони навколишнього природного середовища, раціонального використання та відтворення природних ресурсів, захисту населення і навколишнього середовища від негативного впливу господарської діяльності шляхом регулювання екологічної, ядерної та радіаційної безпеки на об'єктах всіх форм власності здійснює Міністерство екології та природних ресурсів України. В 2004 році Указом Президента України це Міністерство розділено на Міністерство охорони навколишнього природного середовища України та Державний комітет України по

природним ресурсам. На ці органи державної виконавчої влади з врахування їх регіональних структур покладено різноманітні завдання щодо охорони природи та охорони довкілля. Саме на них покладено проведення екологічної експертизи, організації системи державного моніторингу навколишнього природного середовища, природоохоронне інспектування та екологічна паспортизація території, тощо. Крім того, контроль за дотриманням вимог екологічної безпеки та захист населення від негативного впливу факторів довкілля здійснюється санітарно-епідеміологічними станціями, які відносять до Міністерства охорони здоров'я України і які діють на підставі Закону України “Про забезпечення санітарного та епідемічного благополуччя населення” (1994 рік). При організації заходів по охороні природи слід враховувати ряд методологічних принципів, які базуються на знаннях екологічних законів і на розумінні цілісності природного середовища.

1. Всі явища природи мають безліч значень і повинні оцінюватись з різних точок зору. Жодне явище в природі не може мати тільки позитивні або тільки негативні наслідки для природи. До природних явищ слід відноситись, перед усім, з точки зору підтримання саморегуляції природи.

2. Необхідно максимально враховувати особливості місцевих умов при організації заходів по охороні природи, охороні довкілля людини та використанню природних ресурсів. Цей принцип називають правилом регіональності.

3. Охорона одного природного об'єкта вимагає одночасної охорони інших об'єктів, безпосередньо пов'язаних з ним. Цей принцип має певні протиріччя. Наприклад, інтенсивна охорона копитних тварин призводить до виснаження рослинності, що ставить під загрозу рівновагу в даній екологічній системі. В цілому цей принцип є справедливим і використовується в заповідній справі тощо. Врахування цих правових і методологічних принципів охорони навколишнього природного середовища дозволить раціонально втілювати відповідні заходи щодо охорони природи і довкілля людини. Одним із ключових питань охорони природи і довкілля

людини є забруднення об'єктів навколишнього природного середовища, виявлення джерел забруднення, вивчення наслідків цього процесу та розробка заходів запобігання та ліквідації забруднення об'єктів навколишнього природного середовища. З екологічної точки зору, забруднення навколишнього природного середовища – це внесення в екологічні системи невластиві їм компонентів живої чи неживої природи і зумовлені цим внесенням структурні зміни, які порушують кругообіг речовин, функціонування екосистем та пригнічують життєдіяльність організмів, що є причиною руйнування екосистем або зниження їх продуктивності. Безумовно, це визначення забруднення навколишнього середовища є загальним, але воно відображає всю повноту небезпеки цього явища. При розгляді питання охорони конкретних об'єктів навколишнього середовища термін забруднення буде уточненим. У відповідності з діючими нормативними документами, під забрудненням розуміють погіршення якості об'єкту природи або довкілля людини[114].

5.2. Основи нормування якості об'єктів довкілля та антропогенного навантаження на природне середовище

Метою нормування якості об'єктів довкілля та антропогенного навантаження на природне середовища є утворення орієнтирів мінімізації антропогенного впливу на довкілля. Сучасна концепція екологічного нормування визначає його як діяльність, яка направлена на встановлення системи нормативів стану і нормативів граничнодопустимого впливу на екосистеми, які необхідні для ефективного здійснення екологічного менеджменту. Нормативи стану природних об'єктів повинні базуватись на тих характеристиках, які найбільш інформативно відображають антропогенний чи природний вплив, значимий для стану даної екосистеми в цілому. Встановлення нормативів граничнодопустимого впливу на екосистеми сприяє регулюванню забруднення навколишнього природного

середовища та обмеженню антропогенної трансформації екосистем. У відповідності з природоохоронним законодавством України, здійснення нормування якості навколишнього природного середовища проводиться шляхом встановлення граничнодопустимих норм впливу, що гарантує екологічну безпеку населення, збереження генофонду, забезпечення раціонального використання та відтворення природних ресурсів в умовах стійкого розвитку народного господарства. Під впливом розуміють антропогенну діяльність, яка пов'язана з реалізацією економічних, рекреаційних або культурних інтересів -147- людей, внаслідок чого в довкілля вносяться фізичні, хімічні або біологічні зміни. Отже, метою нормування є накладання граничних умов як на сам вплив, так і на фактори середовища, які відображають і вплив, і наслідки впливу в екосистемах. Прийнято розрізняти нормування якості природного середовища (екологічне та санітарно-гігієнічне нормування) та нормування антропогенного навантаження на довкілля (науково-технічне нормування). Реалізація нормування якості природного середовища базується на концепції граничнодопустимих концентрацій (ГДК) шкідливих речовин або значеннях параметрів в об'єктах довкілля. Метою ГДК є попередження негативного впливу фактору або параметру довкілля на людину і, тільки в окремих випадках враховується вплив на рослинний і тваринний світи. Принципи встановлення ГДК в різних об'єктах довкілля є різними, але тільки при нормуванні якості природних вод враховується екологічний аспект. В санітарно-гігієнічному розумінні, ГДК – це нормативи, що встановлюють концентрації шкідливих речовин в одиниці об'єму (повітря, вода), маси (грунти, харчові продукти) або поверхні (шкіра робітників), які при дії за певний проміжок часу практично не впливають на здоров'я людини і не викликають негативних наслідків у його нащадків. Науково-технічне нормування передбачає введення обмежень діяльності господарюючих суб'єктів по відношенню до впливу на навколишнє природне середовище, тобто, визначає граничнодопустимі потоки шкідливих речовин, які можуть

потрапляти від джерел забруднення в повітря, води, ґрунти. Від господарюючих підприємств вимагається дотримання вимог граничнодопустимих викидів і скидів шкідливих речовин, встановлених для підприємства в цілому, або окремих джерел, що входять до його складу. Зафіксоване перевищення величин ГДК в об'єктах навколишнього середовища само по собі не є порушенням зі сторони підприємств, хоча служить сигналом невиконання встановлених науково-технічних нормативів або свідченням необхідності їх перегляду. З екологічної точки зору, граничним вважається таке навантаження, під впливом якого відхилення від нормального стану екосистеми не перевищує природних змін і, як наслідок, не виникає небажаних наслідків у живих організмах і не погіршується якість середовища. Під якістю об'єктів навколишнього природного середовища розуміють сукупність властивостей природних об'єктів, які забезпечують нормальне функціонування природних екосистем, кругообіг речовини і які сприятливо впливають на життя та розвиток живих організмів. Якість природних об'єктів оцінюють за показниками якості – кількісними характеристиками основних властивостей об'єкту. Рівень якості об'єктів довкілля – це відносна характеристика якості об'єкту, яка базується на порівнянні показників якості оцінюваного об'єкту з базовими значеннями відповідних показників. При оцінюванні якості об'єктів навколишнього природного середовища слід враховувати принципи системності і переважності. Принцип системності полягає в тому, що необхідно здійснювати комплексну та упереджуючу стандартизацію всіх етапів оцінки якості середовища. Принцип системності забезпечує обмеження різноманітності та кількості параметрів навколишнього середовища, за якими проводять оцінку якості. Число параметрів повинно бути мінімальним, але ці параметри повинні якомога повніше характеризувати стан природного об'єкту, тобто давати повне уявлення про нього та його реакцію на зовнішній вплив. Параметри об'єктів навколишнього природного середовища, за якими оцінюють їх якість, поділяють на головні, основні і допоміжні. Головним

називають такий параметр із числа основних, який найбільш повно характеризує об'єкт оцінки, залишається незмінним тривалий час і може змінюватись тільки в крайніх випадках. До основних параметрів часто відносять інтегральні величини показнику якості, а до допоміжних – індивідуальні. У відповідності із Законом України “Про охорону навколишнього природного середовища” зазначено:

Стаття 31. Завдання стандартизації і нормування в галузі охорони навколишнього середовища. Екологічна стандартизація і нормування проводяться з метою встановлення комплексу обов'язкових норм, правил, вимог щодо охорони навколишнього природного середовища, використання природних ресурсів та забезпечення екологічної безпеки.

Стаття 32. Екологічні стандарти. Державні стандарти в галузі охорони навколишнього природного середовища є обов'язковими для виконання і визначають поняття і терміни, режим використання й охорони природних ресурсів, методи контролю за станом навколишнього природного середовища, вимоги щодо запобігання забруднення навколишнього середовища, інші питання, пов'язані з охороною навколишнього природного середовища та використання природних ресурсів.

Стаття 33. Екологічні нормативи. Екологічні нормативи встановлюють гранично допустимі викиди та скиди у навколишнє середовище забруднюючих хімічних речовин, рівні допустимого шкідливого впливу на нього фізичних та біологічних факторів. Законодавством України можуть встановлюватись нормативи використання природних ресурсів та інші екологічні нормативи. Екологічні нормативи повинні встановлюватись з урахуванням вимог санітарно-гігієнічних та санітарно-протиепідемічних правил і норм, гігієнічних нормативів. Нормативи граничнодопустимих концентрацій забруднюючих речовин у навколишньому природному середовищі та рівні шкідливих фізичних впливів на нього є єдиними для всієї території України. У разі необхідності для курортних, лікувально-оздоровчих, рекреаційних та інших окремих районів можуть

встановлюватись більш суворі нормативи граничнодопустимих концентрацій забруднюючих речовин та інших шкідливих впливів на навколишнє природне середовище. Екологічні нормативи розробляються і вводяться в дію спеціально уповноваженим центральним органом виконавчої влади з питань екології і природних ресурсів та іншими уповноваженими на те державними органами відповідно до законодавства України. Нормування якості та нормування антропогенного навантаження на ті чи інші природні об'єкти проводиться у відповідності з чинним законодавством України. Для забезпечення належної якості природного середовища та регулювання антропогенного впливу на нього, важливими є моніторинг довкілля та екологічна експертиза, яка проводить оцінку впливу на навколишнє середовище (ОВНС). Задачею ОВНС є вибір прийнятного в екологічному аспекті варіанту проекту господарської діяльності людини на основі виявлення можливих негативних екологічних наслідків і оцінки повноти та достатності заходів по їх недопущенню. Основними проблемами нормування антропогенного навантаження на природне середовище та ОВНС є кількісна оцінка впливу на довкілля, для забезпечення оцінки сукупності наслідків втручання людини в природне середовище[115].

5.3. Проблема промислових стічних вод як найважливіша проблема захисту природних водойм від забруднення

Проблема промислових стічних вод як найважливіша проблема захисту природних водойм від забруднення, промислові стічні води є найбільш потужними антропогенними джерелами забруднення природних вод. Промислові стічні води характеризуються як великими об'ємами утворення, так і непостійністю хімічного складу. Крім того, промислові стічні води можуть утворюватись несистематично, що ускладнює проблему їх утилізації. Вирішення проблем промислових стічних вод можливе різними шляхами:

- попередження їх виникнення, тобто утворення безвідходних виробництв (пріоритет майбутнього);

- скидання січних вод у природні водойми, передусім річки, за умови, що концентрація забруднювальних речовин у водоймах, яка створюється стічними водами, разом із фоновою концентрацією забруднювальних речовин, не створюють зон з перевищенням граничнодопустимих концентрацій;

- очистка промислових стічних вод на міських очисних спорудах із відведенням промислових стічних вод в каналізаційні мережі;

- попередня очистка стічних вод на заводських очисних спорудах, з наступною їх доочисткою на міських очисних спорудах тобто відведення частково очищених стічних вод в каналізацію;

- очистка стічних вод на заводських очисних спорудах із поверненням частини води у виробничий цикл, а друга частина очищених стічних вод викидається в природні водойми. Як бачимо, шляхів вирішення проблеми стічних вод є багато, але пріоритетним має бути утворення безвідходних технологій[130]. Цей напрямок є, здебільшого, напрямком майбутнього, адже впровадження таких технологій вимагає значних капіталовкладень. Крім того, абсолютно безвідходною технологія бути не може. Безпосереднє скидання стічних вод у природні водойми, навіть із дотриманням санітарно-гігієнічних вимог є небажаним. Це зумовлено як поступовим погіршенням якості вод природних водойм, так і тим, що із зміною фонового стану водного джерела, для дотримання вимог ГДК, необхідно буде так чи інакше проводити очистку промислових стічних вод. Серед інших заходів по вирішенню проблеми промислових стічних вод віддають перевагу тим, які є найбільш раціональні в економічному розумінні. Вибір методу утилізації промислових стічних вод залежить від концентрації забруднювальних речовин, від об'ємів стічних вод, від систематичності їх утворення та від необхідного ступеня їх очистки. На систематичність утворення та кількість утворюваних стічних вод впливає схема промислового водопостачання. Врахування цих параметрів дозволяє раціонально обрати заходи по утилізації промислових стічних вод. Розрізняють чотири основних схеми промислового водопостачання:

- прямоточні – які включають забір води із водного джерела, їх використання у виробничому циклі, та після очистки – скидання у природні водойми чи каналізаційні мережі;

- з послідовним використанням води – коли вода, яка вилучена із водного джерела, спочатку використовується в технологічних процесах із високими вимогами до якості води, а потім – в інших технологічних процесах. Після цього очищені стічні води відводяться у водойми або каналізаційну мережу;

- змішані – коли різні технологічні процеси мають різні системи водопостачання (прямоточні, оборотні тощо);

- оборотні – коли води, що вилучені із водного джерела і використані у виробничому циклі, після очистки повертаються у технологічний цикл. Найбільш екологічно безпечними є оборотні системи, які передбачають забір води із водного джерела, використання води у виробничому циклі, її очистки за необхідністю та повернення у виробничий цикл. Безумовно, жодна із систем оборотного водопостачання не є досконалою, адже можливі втрати води. Це вимагає постійного використання частини чистої води із водного джерела.

досконалою є схема оборотного водопостачання. Для правильного вибору заходів по утилізації промислових стічних вод, необхідно, як нами зазначалось раніше, враховувати об'єм стічних вод та їх характеристики: концентрація забруднювальних речовин, температура тощо. Тому проводять класифікацію промислових стічних вод, яка також необхідна для правильного вибору методів очистки цих вод. Стічні води, які виводяться з території промислових підприємств, за своїм походженням можуть бути поділені на три види:

- виробничі – які використані в технологічному процесі виробництва або утворені при добуванні корисних копалин;

- побутові – стічні води санітарних вузлів виробничих приміщень та душових установок;

- атмосферні – дощові та від талого снігу. Ці стічні води відрізняються як різноманітністю хімічного складу, так і їх об'ємами, і систематичністю утворення, що слід враховувати при організації заходів по їх очистці. Забруднені стічні води, які містять різноманітні домішки, за своїм хімічним складом поділяють на такі групи: забруднені, переважно, мінеральними домішками. Це стічні води підприємств металургійних, рудо- та вуглезбагачувальних галузей промисловості, заводів по виробництву мінеральних добрив, кислот тощо;

- забруднені, переважно, органічними домішками. Це стічні води підприємств харчової, целюлозно-паперової та мікробіологічної промисловості, заводів по виробництву пластичних мас, гуми тощо;

- забруднені і мінеральними, і органічними домішками. Це стічні води підприємств нафтодобувної, нафтопереробної, нафтохімічної, текстильної, легкої, фармацевтичної промисловості, заводів по виробництву консервів, цукру тощо. Ця класифікація промислових стічних вод має важливе значення при виборі методів очистки стічних вод. Виробничі стічні води за концентрацією забруднювальних речовин поділяють на чотири групи:

I група – води, які містять від 0 до 500 мг/дм³ забруднювальних речовин;

II група – води, які містять від 500 до 5000 мг/дм³ забруднювальних речовин;

III група – води, які містять від 5000 до 30000 мг/дм³ забруднювальних речовин.

IV група – води, які містять понад 30000 мг/дм³ забруднювальних речовин. Ця класифікація має також важливе значення при виборі методів очистки стічних вод, адже при різній концентрації забруднювальних речовин використовуються різні методи очистки, тощо[130].

За ступенем агресивності до матеріалів і споруд промислові стічні води поділяють на:

- слабоагресивні (слабокислі з рН 6,0-6,5 та слаболужні з рН 8,0-9,0); - сильноагресивні (кислі з рН < 6,0 та лужні з рН > 9,0);

- неагресивні або практично нейтральні (води з рН 6,5-8,0). Така класифікація необхідна для врахування впливу стічних вод на каналізаційні мережі, устаткування тощо. Класифікація стічних вод, безумовно, має важливе значення для вибору заходів по утилізації та очистці стічних вод, але важливе значення мають і умови відведення стічних вод. Очищені або частково очищені стічні води можуть бути відведені у каналізаційну мережу, або скинуті у природні водойми. При цьому слід враховувати умови водовідведення[130].

Скидання стічних вод у міську каналізаційну мережу дозволяється за таких умов:

- не повинна порушуватись нормальна робота каналізаційних мереж;
- компоненти стічних вод не повинні захаращувати каналізаційні мережі і не утворювати відкладень на каналізаційних трубах;
- хімічні компоненти стічних вод не повинні руйнувати матеріали каналізаційних мереж;
- шкідливі компоненти промислових стічних вод не повинні перешкоджати самоочищенню води в каналізаційних мережах, за рахунок біохімічних перетворень, тому стічні води не повинні містити токсичних інгредієнтів і їх температура не повинна перевищувати 40°C;
- домішки горючих речовин, що містяться у стічних водах, не повинні утворювати вибухонебезпечних сумішей в каналізаційних мережах;
- компоненти стічних вод не повинні вступати в хімічні реакції з побутовими стоками і не утворювати отруйних та вибухонебезпечних компонентів (передусім, газів). Встановлюються ліміт скиду речовин до каналізації, під яких розуміють (за ДСТУ 3041-95) масу нормованої речовини, максимально допустима до відведення в одиницю часу в каналізацію із зворотною водою без порушення умов нормальної роботи каналізаційних споруд і без загрози забруднення водного об'єкта, що

приймає очищену зворотну воду. Як видно, щоб промислові стічні води були скинуті в каналізаційну мережу, вони повинні відповідати ряду вимог[130]. Крім того, за відведення стічних вод в каналізацію необхідно платити. Тому, більш раціональним, з економічної точки зору, є очистка стічних вод і їх скидання в природні водойми, передусім, у річки. Місце спуску стічних вод у річки має бути розташоване за течією поза населеним пунктом і місцями водокористування населення з врахуванням можливої зворотної течії при нагінних вітрах. Умови відведення стічних вод у водні об'єкти встановлюються з врахуванням можливого їх змішування та розведення, фонові якості води, нормативів її якості[116].

5.4. Висновок до розділу

Протягом останніх десятиліть увагу багатьох дослідників в усьому світі привертає проблема зростаючої неконтрольованої присутності залишків лікарських засобів та їх метаболітів у навколишньому середовищі. Лікарські засоби створюються з метою здійснення впливу на організм людини, проте у зв'язку з подібністю фізіологічних механізмів у різних біологічних видів ліки можуть впливати і на інші організми, що являють собою екосистеми на індивідуальному, видовому і міжвидовому рівнях. У зв'язку з цим вивчення життєвого циклу лікарських засобів у навколишньому середовищі і з'ясування впливу залишків ліків на різноманітні живі організми є напрямом досліджень екологічної токсикології. Питання потенційної небезпеки таких речовин для біологічних видів почали вивчати у 90-х роках ХХ ст. Актуальним залишається з'ясування присутності, складу, розподілу, методів виявлення, біодеградації, способів попередження забруднення та способів видалення з навколишнього середовища залишків різноманітних лікарських засобів.

Істотно забруднює навколишнє середовище фармацевтична галузь, яка щорічно збільшує випуск лікарських засобів на кілька мільйонів упаковок і розширює їх асортимент.

Екологічна безпека таких виробництв регулюється законодавством, тому значні викиди не мають систематичного характеру. Завдяки послідовному підвищенню технологічності й організованості виробничого процесу, впровадженню підвищених стандартів якості та екологічної безпеки, контролю з боку уповноважених державних органів в останні роки спостерігається загальна тенденція до зниження екологічного навантаження з боку фармацевтичних виробництв, у першу чергу в розвинених країнах світу. Крім того, фармацевтичне виробництво локалізоване географічно, і в разі аварії або порушення екологічного законодавства, викиди носять виключно місцевий характер і є небезпечними лише для конкретного регіону. Численними дослідженнями доведено вкрай негативний вплив на водні об'єкти незначної кількості лікарських засобів, що надходять в них зі стічними водами. Вивчені групи препаратів, які слабо розчиняються у воді: протизапальні, знеболюючі засоби, антибіотики, гормони, ліки, що знижують вміст холестерину. Вони слабо піддаються біодеструкції і, проходячи через очисні споруди без змін, потрапляють у природні води. В даний час гостро стоїть проблема утилізації неякісних лікарських засобів і препаратів із закінченим терміном придатності.

Відповідно до наказу Міністерства охорони здоров'я України № 349 від 08.07.2004 р порядок проведення та вибір методу знищення відходів лікарських засобів визначаються після встановлення їхнього класу небезпеки.

Так, відходи, що належать до 3-го класу небезпеки, можна захоронити на полігоні твердих побутових відходів, а відходи 2-го класу небезпеки підлягають утилізації спеціальними методами. На жаль, в аптеках і лікарнях практикують багаторазове розведення і скидання в міську каналізацію неякісних ін'єкційних форм препаратів 2-го і 3-го класів небезпеки. Їх

розкладання на очисних спорудах становить близько 68%. Більш небезпечними для навколишнього середовища є джерела лікарських засобів, які практично не піддаються контролю і формуються переважно людьми, що застосовують медичні препарати з лікувальною метою та у тваринництві. У домашніх аптечках жителів розвинених країн світу накопичується велика кількість ліків, що залишаються незатребуваними після завершення курсу лікування або придбаних без прямої потреби, про запас. Загальне споживання фармацевтичних субстанцій у світі перевищує 3 млн. тонн на рік. Внаслідок фізіологічної екскреції в навколишнє середовище щорічно потрапляють сотні тисяч тонн діючих речовин різноманітних лікарських засобів. Незначна частина лікарських засобів потрапляє у водні середовища внаслідок їх транспорту через шкіру. Деякі засоби для зовнішнього застосування можуть вимиватися під час купання у відкритих водоймах.

Основними причинами, що призводять до накопичення фармацевтичного побутового сміття, є: доступність лікарських засобів; реклама фармацевтичних компаній, спрямована на підвищення споживання ліків; поліпрагмація; самолікування, самодіагностика; похилий вік та (або) наявність хронічних захворювань у осіб, що проживають у будинку; наявність у сім'ї маленьких дітей. Лікарські засоби, що накопичилися стають непридатними внаслідок порушення первинної упаковки, неправильного зберігання або після закінчення терміну придатності. Після цього їх або змивають у каналізацію, або викидають у складі побутового сміття.

Фізіологічні виділення тварин являють собою ще одне важливе джерело некерованого потрапляння лікарських засобів у навколишнє середовище.

Прикладом можуть бути антибіотики, що використовуються в якості харчових добавок для сільськогосподарських тварин. В Євросоюзі використання антибіотиків, що стимулюють ріст худоби, заборонено. Це знизило масштаб проблеми, але не виключило її повністю. Спочатку основна маса лікарських засобів, які згодом забруднюють навколишнє середовище,

потрапляє в господарсько-побутові стічні води в результаті фізіологічної екскреції і (або) змиву в каналізацію непотрібних препаратів. Особливе місце займає господарсько-побутова каналізація стаціонарних медичних організацій та організацій соціального забезпечення, в яких обсяг, частота використання та перелік використовуваних лікарських засобів у розрахунку на одну особу значно перевищують аналогічні показники в приватних домоволодіннях, а правила утилізації ліків, затверджені для медичних установ, найчастіше порушуються. У міру переміщення по каналізаційним мережам до очисних споруд концентрація присутніх лікарських засобів може дещо змінюватися внаслідок біологічної, хімічної або фізико-хімічної деградації речовин. Залежно від принципу і якості організації каналізування, в результаті протікання та інфільтрації в ґрунт може потрапляти певна кількість лікарських засобів. Найбільший вплив на показники подальшої присутності ліків у навколишньому середовищі має очищення стічних вод. Різні методи очищення відрізняються за ефективністю щодо видалення лікарських засобів. Мулові відкладення, що залишаються після очищення господарсько-побутових стічних вод, часто використовуються в сільському господарстві як добрива, відкриваючи шлях проникнення в ґрунт залишкам препаратів, абсорбованих мулом. Очищені стоки зливаються в поверхневі води і приносять із собою залишки лікарських засобів, не видалених системою очищення і процесами природної деградації фармацевтичних субстанцій. Поверхневі води несуть лікарські засоби до морських берегів і поповнюють водоносні шари ґрунтових вод. Ґрунт, удобрений каналізаційним мулом або гноєм сільськогосподарських тварин, до яких застосовувалися лікарські засоби, який взаємодіє з поверхневими прісними водами, що містять залишки лікарських засобів, або фармацевтичним сміттям, є середовищем, по якому фармацевтичні субстанції інфільтруються в ґрунтові води. Здатність речовин до інфільтрації визначається їх фізико-хімічними властивостями. Ґрунтові і поверхневі прісні води є джерелами питної води. Незважаючи на якісну очистку природних вод, що здійснюється

в розвинених країнах світу, залишки лікарських засобів у певних кількостях надходять у водопровідну мережу і далі знову вживаються людьми вже у складі питної води. Це підтверджує інформація агентства Associated Press у березні 2008 р. щодо наявності залишків лікарських засобів, включаючи антибіотики, протисудомні та психотропні речовини, в питній воді 24 основних міських територій США, в яких проживають більше 41 млн. чоловік.

Отже, в результаті підвищення доступності лікарських засобів, загального розвитку систем охорони здоров'я, зростає споживання ліків в медичних цілях і, як наслідок, збільшується їх вміст у навколишньому середовищі. Цей процес є малокерованим і потенційно небезпечним для здоров'я людей та інших біологічних організмів.

ВИСНОВОКИ

1. Для створення молекули рекомбінантної ДНК необхідно пройти декілька етапів:

- виділення потрібного цільової послідовності гена
- вбудова гена в специфічну ДНК послідовність (вектор), здатну до реплікації в клітині-хазяєві
- введення вектора в організм-реципієнт
- визначення (скринінг) та відбір клітин, в геномі яких виявлена присутність РНК інтересу. Метод починається зі утворення кормового штаму. Спочатку виберіть цільову область приблизно 500 п.н., що відповідає мРНК, і зв'яжіть у плазміді, що мають специфічну структуру. Потім плазміді слід трансформувати в мутантний штаб РНКазиди III *E. coli* для експресії длРНК. Одне, що потребує особливої згадки тут, полягає в тому, що ефект приглушення генів на рідке культуральне середовище або пластини, що живлять нематоди, подібний, залежно від проникнення та ефективності експресії. Однак експериментальні процеси та обмеження все ще

відрізняються. Але на мою думку один з найкращих методів отримання міРНК є конструювання міРНК за допомогою програм-бібліотек і замовлення її у власників сайта. Після її можна колувати методом вище зазначеним.

2. Найвідомішими ліпідними векторами, що використовуються для клінічних випробувань, є СНКЛЧ (стабільні нуклеїнові кислоти-ліпідні частинки). СНКЛЧ - це різновид ліпідних наночастинок, які інкапсують міРНК і доставляють її до клітин-мішеней. СНКЛЧ - це мікроскопічні частинки діаметром приблизно 120 нм. Вони використовувались для доставки міРНК ссавцям у природних умовах *in vivo*. У СНКЛЧ міРНК оточена ліпідним бішаром, що містить суміш катіонних та фузогенних ліпідів, покритих дифузійним поліетиленгліколем. Іншою ліпідоподібною системою доставки є ліпідодні наночастинок, які складаються з холестерину та ПЕГ-модифікованих ліпідів, специфічних для доставки міРНК. Для поліпшення доставки, опосередкованої СНКЛЧ, Akinc et al. розробив новий хімічний метод для швидкого синтезу великої бібліотеки ліпідодів та перевірів їх ефективність при доставці міРНК. Встановлено що вектори на основі ліпідів у багатьох дослідження призводять до 75–90% зниження експресії гена у приматів та мишей.

3. Системи доставки наночастинок повинні мати розмір частинок приблизно 20–200 нм, тобто бути достатньо великими, щоб уникнути ниркової фільтрації, але досить малими, щоб уникнути фагоцитарного кліренсу. ПЕГ як захисний засіб виявився цінним для запобігання неспецифічних взаємодій та уникнення імунного розпізнавання в циркуляції. Системи, які обговорюються тут, є дуже ефективними, перспективними кандидатами, але вони є унікальними в багатьох аспектах своїх конструкцій. Деякі з них мають точно визначені структури, тоді як інші неоднорідні. Їх розміри варіюються від сотень нанометрів до розміру однієї міРНК. Деякі міцно тримаються разом за допомогою ковалентних зв'язків або точного склеєння водню; інші пов'язані гідрофобні або іонографічні взаємодії. Наночастинок, що складаються з синтетичних ліпідів, є одними з найбільш

потужних рецептури в розробці трубопроводу. Кон'югатні системи користуються точно визначеними молекулярними структурами з мінімальною кількістю матеріалів доставки і, мабуть, широкими терапевтичними вікнами, а їх ефективність продовжує поліпшуватися. Незважаючи на те, що в лабораторії були розроблені різні системи доставки, проблеми залишаються в залученні повного потенціалу РНКі в клініку. Найбільш передовими системами є наночастинки, утворені шляхом змішування і самостійного складання різних компонентів, але цей метод рецептури представляє додаткові проблеми в масштабі процесу виробництва, такі як необхідність жорстко контрольованих процесів змішування для досягнення стабільної якості лікарського продукту.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ БІБЛІОГРАФІЧНИХ ДЖЕРЕЛ ТА ПОСИЛАНЬ

1. Morrissey, D. V. et al. Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified miPHKs. *Nature Biotechnol.* 23, 1002–1007 (2005).
2. Okumura, A., Pitha, P. M. & Harty, R. N. ISG15 inhibits Ebola VP40 VLP budding in an L-domain-dependent manner by blocking Nedd4 ligase activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 3974–3979 (2008).
3. Alnylam PHKi Roundtable: Conjugate Delivery (2012); <http://www.alnylam.com/capella/wp-content/uploads/2012/12/ALNY-PHKiRoundtable-ConjugateDelivery-Dec-14-2012.pdf>
4. Shen, H., Sun, T. & Ferrari, M. Nanovector delivery of miPHK for cancer therapy. *Cancer Gene Ther.* 19, 367–373 (2012).
5. Davis, M. E. et al. Evidence of PHKi in humans from systemically administered miPHK via targeted nanoparticles. *Nature* 464, 1067–1070 (2010).
6. Whitehead, K. A., Langer, R. & Anderson, D. G. Knocking down barriers: advances in miPHK delivery. *Nature Rev. Drug Discov.* 8, 129–138 (2009).
7. Singha, K., Namgung, R. & Kim, W. J. Polymers in small-interfering RNA delivery. *Nucleic Acid Therapeut.* 21, 133–147 (2011).
8. Semple, S. C. et al. Rational design of cationic lipids for miPHK delivery. *Nature Biotechnol.* 28, 172–176 (2010).
9. Akinc, A. et al. A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of PHKi therapeutics. *Nature Biotechnol.* 26, 561–569 (2008).
10. Mo, R. H., Zaro, J. L. & Shen, W.-C. Comparison of cationic and amphipathic cell penetrating peptides for miPHK delivery and efficacy. *Mol. Pharm.* 9, 299–309 (2012).
11. Yao, Y. et al. Targeted delivery of PLK1-miPHK by ScFv suppresses Her2+ breast cancer growth and metastasis. *Sci. Transl. Med.* 4, 130ra48 (2012).

12. Dassie, J. P. et al. Systemic administration of optimized aptamer-miPHKchimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors. *Nature Biotechnol.* 27, 839–849 (2009).
13. Neff, C. P. et al. An aptamer-miPHKchimera suppresses HIV-1 viral loads and protects from helper CD4(+) T cell decline in humanized mice. *Sci. Transl. Med.* 3, 66ra6 (2011).
14. Soutschek, J. et al. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified miPHKs. *Nature* 432, 173–178 (2004).
15. Thomas, M. et al. Ligand-targeted delivery of small interfering RNAs to malignant cells and tissues. *Ann. NY Acad. Sci.* 1175, 32–39 (2009).
16. Hannon, G. J. RNA interference. *Nature* 418, 244–251 (2002).
17. Nishina, K. et al. Efficient in vivo delivery of miPHKto the liver by conjugation of alpha-tocopherol. *Mol. Ther.* 16, 734–740 (2008).
18. Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L. K. & Farokhzad, O. C. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol. Pharm.* 5, 505–515 (2008).
19. Petros, R. A. & DeSimone, J. M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nature Rev. Drug Discovery* 9, 615–627 (2010).
20. Kanasty, R. L., Whitehead, K. A., Vegas, A. J. & Anderson, D. G. Action and reaction: the biological response to miPHKand its delivery vehicles. *Mol. Ther.* 20, 513–524 (2012).
21. Layzer, J. M. et al. In vivo activity of nuclease-resistant miPHKs. *RNA* 10, 766–771 (2004).
22. Jackson, A. L. & Linsley, P. S. Recognizing and avoiding miPHKoff-target effects for target identification and therapeutic application. *Nature Rev. Drug Discov.* 9, 57–67 (2010).
23. Nguyen, D. N. et al. Lipid-derived nanoparticles for immunostimulatory RNA adjuvant delivery. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 109, E797–E803 (2012).
24. Deleavey, G. F., Watts, J. K. & Damha, M. J. in *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* (ed. Beaucage, S. L. et al.) Ch. 16, Unit 16.3 (2009).

25. Whitehead, K. A., Dahlman, J. E., Langer, R. S. & Anderson, D. G. Silencing or stimulation? miPHK delivery and the immune system. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 2, 77–96 (2011).
26. Wang, A. Z., Langer, R. & Farokhzad, O. C. Nanoparticle delivery of cancer drugs. *Annu. Rev. Med.* 63, 185–198 (2012).
27. Malek, A. et al. In vivo pharmacokinetics, tissue distribution and underlying mechanisms of various PEI(-PEG)/miPHK complexes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 236, 97–108 (2009).
28. Wolfrum, C. et al. Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic miPHKs. *Nature Biotechnol.* 25, 1149–1157 (2007).
29. Akinc, A. et al. Targeted delivery of PHKi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms. *Mol. Ther.* 18, 1357–1364 (2010).
30. Romberg, B., Hennink, W. E. & Storm, G. Sheddable coatings for long-circulating nanoparticles. *Pharm. Res.* 25, 55–71 (2008).
31. Bazile, D. et al. Stealth Me.PEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system. *J. Pharm. Sci.* 84, 493–498 (1995).
32. Jarad, G. & Miner, J. H. Update on the glomerular filtration barrier. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 18, 226–232 (2009).
33. Wartiovaara, J. et al. Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. *Filtration* 114, 1475–1483 (2004).
34. He, X. M. & Carter, D. C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* 358, 209–215 (1992).
35. Huang, Y. et al. Elimination pathways of systemically delivered miPHK. *Mol. Ther.* 19, 381–385 (2011).
36. Lee, H. et al. Molecularly self-assembled nucleic acid nanoparticles for targeted in vivo miPHK delivery. *Nature Nanotech.* 7, 389–393 (2012).
37. Rozema, D. B. et al. Dynamic PolyConjugates for targeted in vivo delivery of miPHK to hepatocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 12982–12987 (2007).

38. Zuckerman, J. E., Choi, C. H. J., Han, H. & Davis, M. E. Polycation-miPHKnanoparticles can disassemble at the kidney glomerular basement membrane. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 109, 3137–3142 (2012).
39. Naeye, B. et al. In vivo disassembly of IV administered miPHKmatrix nanoparticles at the renal filtration barrier. *Biomaterials* 34, 2350–2358 (2013).
40. Aird, W. C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circul. Res.* 100, 158–173 (2007).
41. Wisse, E., Jacobs, F., Topal, B., Frederik, P. & De Geest, B. The size of endothelial fenestrae in human liver sinusoids: implications for hepatocyte-directed gene transfer. *Gene Ther.* 15, 1193–1199 (2008).
42. Maeda, H. Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect: background and future prospects. *Bioconj. Chem.* 21, 797–802 (2010).
43. Yu, B., Zhao, X., Lee, L. J. & Lee, R. J. Targeted delivery systems for oligonucleotide therapeutics. *AAPS J.* 11, 195–203 (2009).
44. Salvati, A. et al. Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. *Nature Nanotech.* 8, 137–143 (2013).
45. Bolhassani, A. Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1816, 232–246 (2011).
46. Shim, M. S. & Kwon, Y. J. Stimuli-responsive polymers and nanomaterials for gene delivery and imaging applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 1046–1059 (2012).
47. Schwarz, D. S. et al. Asymmetry in the assembly of the PHKi enzyme complex. *Cell* 115, 199–208 (2003).
48. Jeong, J. H., Mok, H., Oh, Y-K. & Park, T. G. miPHKconjugate delivery systems. *Bioconj. Chem.* 20, 5–14 (2009).
49. Davis, M. E. The first targeted delivery of miPHKin humans via a selfassembling, cyclodextrin polymer-based nanoparticle: from concept to clinic. *Mol. Pharm.* 6, 659–668 (2009).

50. Gonzalez, H., Hwang, S. J. & Davis, M. E. New class of polymers for the delivery of macromolecular therapeutics. *Bioconj. Chem.* 10, 1068–1074 (1999).
51. Hwang, S. J., Bellocq, N. C. & Davis, M. E. Effects of structure of betacyclodextrin-containing polymers on gene delivery. *Bioconj. Chem.* 12, 280–290 (2001).
52. Pun, S. H. et al. Cyclodextrin-modified polyethylenimine polymers for gene delivery. *Bioconj. Chem.* 15, 831–840 (2004).
53. Pun, S. H. & Davis, M. E. Development of a nonviral gene delivery vehicle for systemic application. *Bioconj. Chem.* 13, 630–639 (2002).
54. Reineke, T. M. & Davis, M. E. Structural effects of carbohydrate-containing polycations on gene delivery. 1. Carbohydrate size and its distance from charge centers. *Bioconj. Chem.* 14, 247–254 (2003).
55. Popielarski, S. R., Mishra, S. & Davis, M. E. Structural effects of carbohydrate-containing polycations on gene delivery. 3. Cyclodextrin type and functionalization. *Bioconj. Chem.* 14, 672–678 (2003).
56. Davis, M. et al. Self-assembling nucleic acid delivery vehicles via linear, water-soluble, cyclodextrin-containing polymers. *Curr. Med. Chem.* 11, 179–197 (2004).
57. Hu-Lieskovan, S., Heidel, J. D., Bartlett, D. W., Davis, M. E. & Triche, T. J. Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer Res.* 65, 8984–8992 (2005).
58. Mishra, S., Heidel, J. D., Webster, P. & Davis, M. E. Imidazole groups on a linear, cyclodextrin-containing polycation produce enhanced gene delivery via multiple processes. *J. Control. Release* 116, 179–191 (2006).
59. Bartlett, D. W. & Davis, M. E. Physicochemical and biological characterization of targeted, nucleic acid-containing nanoparticles. *Bioconj. Chem.* 18, 456–468 (2007).

60. Mishra, S., Webster, P. & Davis, M. E. PEGylation significantly affects cellular uptake and intracellular trafficking of non-viral gene delivery particles. *Eur. J. Cell Biol.* 83, 97–111 (2004).
61. Bellocq, N. C., Pun, S. H., Jensen, G. S. & Davis, M. E. Transferrin-containing, cyclodextrin polymer-based particles for tumor-targeted gene delivery. *Bioconj. Chem.* 14, 1122–1132 (2003).
62. Bartlett, D. W. & Davis, M. E. Insights into the kinetics of miPHK-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic Acids Res.* 34, 322–333 (2006).
63. Bartlett, D. W., Su, H., Hildebrandt, I. J., Weber, W. A. & Davis, M. E. Impact of tumor-specific targeting on the biodistribution and efficacy of miPHKnanoparticles measured by multimodality in vivo imaging. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 15549–15554 (2007).
64. Bartlett, D. W. & Davis, M. E. Impact of tumor-specific targeting and dosing schedule on tumor growth inhibition after intravenous administration of miPHK-containing nanoparticles. *Biotechnol. Bioeng.* 99, 975–985 (2008).
65. Heidel, J. D. et al. Administration in non-human primates of escalating intravenous doses of targeted nanoparticles containing ribonucleotide reductase subunit M2 miPHK. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 5715–5721 (2007).
66. Zimmermann, T. S. et al. PHKi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* 441, 111–114 (2006).
67. Alabi, C., Vegas, A. & Anderson, D. Attacking the genome: emerging miPHKnanocarriers from concept to clinic. *Curr. Opin. Pharmacol.* 12, 427–433 (2012).
68. Burnett, J. C., Rossi, J. J. & Tiemann, K. Current progress of miPHK/shRNA therapeutics in clinical trials. *Biotechnol. J.* 6, 1130–1146 (2011).
69. Xu, Y. & Szoka, F. C. Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry* 35, 5616–5623 (1996).
70. Zhang, S., Zhi, D. & Huang, L. Lipid-based vectors for miPHKdelivery.

- J. Drug Target. 20, 724–735 (2012).
71. Kesharwani, P., Gajbhiye, V. & Jain, N. K. A review of nanocarriers for the delivery of small interfering RNA. *Biomaterials* 33, 7138–7150 (2012).
72. Huang, L. & Liu, Y. In vivo delivery of PKi with lipid-based nanoparticles. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 13, 507–530 (2011).
73. Sato, Y. et al. A pH-sensitive cationic lipid facilitates the delivery of liposomal miPK and gene silencing activity in vitro and in vivo. *J. Control. Release* 163, 267–276 (2012).
74. Bottega, R. & Epand, R. M. Inhibition of protein kinase C by cationic amphiphiles. *Biochemistry* 31, 9025–9030 (1992).
75. Love, K. T. et al. Lipid-like materials for low-dose, in vivo gene silencing. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107, 1864–1869 (2010).
76. Mahon, K. P. et al. Combinatorial approach to determine functional group effects on lipidoid-mediated miPK delivery. *Bioconj. Chem.* 21, 1448–1454 (2010).
77. Zhang, J., Fan, H., Levorse, D. A. & Crocker, L. S. Ionization behavior of amino lipids for miPK delivery: determination of ionization constants, SAR, and the impact of lipid pKa on cationic lipid-biomembrane interactions. *Langmuir* 27, 1907–1914 (2011).
78. Hafez, I. M., Maurer, N. & Cullis, P. R. On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids. *Gene Ther.* 8, 1188–1196 (2001).
79. Hafez, I. M., Ansell, S. & Cullis, P. R. Tunable pH-sensitive liposomes composed of mixtures of cationic and anionic lipids. *Biophys. J.* 79, 1438–1446 (2000).
80. Jayaraman, M. et al. Maximizing the potency of miPK lipid nanoparticles for hepatic gene silencing in vivo. *Angew. Chem. Int. Ed.* 51, 8529–8533 (2012).
81. Zuhorn, I. S. et al. Nonbilayer phase of lipoplex-membrane mixture determines endosomal escape of genetic cargo and transfection efficiency. *Mol. Ther.* 11,

801–810 (2005).

82. Zhigaltsev, I. V, Maurer, N., Wong, K. F. & Cullis, P. R. Triggered release of doxorubicin following mixing of cationic and anionic liposomes.

Biochim. Biophys. Acta 1565, 129–135 (2002).

83. Koltover, I. An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes

related to DNA release and delivery. *Science* 281, 78–81 (1998).

84. Belliveau, N. M. et al. Microfluidic synthesis of highly potent limit-size lipid nanoparticles for in vivo delivery of miPHK. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 1, e37 (2012).

85. Bao, Y. et al. Effect of PEGylation on biodistribution and gene silencing of miPHK/lipid nanoparticle complexes. *Pharm. Res.* 30, 342–351 (2013).

86. Kolli, S. et al. pH-Triggered nanoparticle mediated delivery of miPHK to liver cells in vitro and in vivo. *Bioconj. Chem.* 24, 314–332 (2013).

87. Lin, S-Y. et al. Sterically polymer-based liposomal complexes with dualshell structure for enhancing the miPHK delivery. *Biomacromolecules* 13, 664–675 (2012).

88. Virtanen, J. A., Ruonala, M., Vauhkonen, M. & Somerharju, P. Lateral organization of liquid-crystalline cholesterol-dimyristoylphosphatidylcholine bilayers. Evidence for domains with hexagonal and centered rectangular cholesterol superlattices. *Biochemistry* 34, 11568–11581 (1995).

89. Takahashi, H., Sinoda, K. & Hatta, I. Effects of cholesterol on the lamellar and the inverted hexagonal phases of dielaidoylphosphatidylethanolamine. *Biochim. Biophys. Acta* 1289, 209–216 (1996).

90. Sato, Y. et al. Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver miPHK against a collagen-specific chaperone. *Nature Biotechnol.* 26, 431–442 (2008).

91. Ishiwatari, H. et al. Treatment of pancreatic fibrosis with miPHK against a collagen-specific chaperone in vitamin A-coupled liposomes. *Gut* 62, 1328–1339 (2013).

92. Yoshizawa, T., Hattori, Y., Hakoshima, M., Koga, K. & Maitani, Y. Folate-linked lipid-based nanoparticles for synthetic miPHKdelivery in KB tumor xenografts. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70, 718–725 (2008).
93. Feng, C. et al. Silencing of the MYCN gene by miPHKdelivered by folate receptor-targeted liposomes in LA-N-5 cells. *Ped. Surg. Int.* 26, 1185–1191 (2010).
94. Wan, K. et al. In vivo tumor imaging using a novel PHKi-based detection mechanism. *Nanomedicine* 8, 393–398 (2012).
95. Taberero, J. et al. First-in-humans trial of an RNA interference therapeutic targeting VEGF and KSP in cancer patients with liver involvement. *Cancer Discov.* 3, 406–417 (2013).
96. Alsina, M. et al. Open-label Extension Study of the PHKi Therapeutic ALN-VSP02 in Cancer Patients Responding to Therapy. American Society of Clinical Oncology Meeting (2012); <http://www.alnylam.com/capella/wp-content/uploads/2012/06/ALN-VSP-ExtensionStudyPoster-ASCO-June2012-panel.pdf>
97. Wakefield, D. H., Klein, J. J., Wolff, J. A. & Rozema, D. B. Membrane activity and transfection ability of amphipathic polycations as a function of alkyl group size. *Bioconj. Chem.* 16, 1204–1208 (2005).
98. Lewis, D. Dynamic polyconjugates (DPC) technology: an elegant solution to the miPHKdelivery problem (2006); http://www.arrowheadresearch.com/sites/default/files/udocs/Arrowhead_Research_Corporation-DPC_Technology_White_Paper.pdf
99. Wong, S. C. et al. Co-injection of a targeted, reversibly masked endosomolytic polymer dramatically improves the efficacy of cholesterol-conjugated small interfering RNAs in vivo. *Nucleic Acid Therapeut.* 22, 380–390 (2012).
100. Macron, D. Arrowhead presents preclinical data on HBV candidate, subcutaneous delivery tech. *Gene Silencing News* (2012); http://www.arrowheadresearch.com/sites/default/files/news/Gene_Silen_News_111612_reprint.pdf

101. Rozema, D. B., Ekena, K., Lewis, D. L., Loomis, A. G. & Wolff, J. A. Endosomolysis by masking of a membrane-active agent (EMMA) for cytoplasmic release of macromolecules. *Bioconj. Chem.* 14, 51–57 (2003).
102. Wooddell, C. I. et al. Hepatocyte-targeted PHKi therapeutics for the treatment of chronic hepatitis B virus infection. *Mol. Ther.* 21, 973–985 (2013).
103. Biessen, E. A. et al. Synthesis of cluster galactosides with high affinity for the hepatic asialoglycoprotein receptor. *J. Med. Chem.* 38, 1538–1546 (1995).
104. Rensen, P. C., Van Leeuwen, S. H., Sliedregt, L. A., van Berkel, T. J. & Biessen, E. A. Design and synthesis of novel N-acetylgalactosamine-terminated glycolipids for targeting of lipoproteins to the hepatic asialoglycoprotein receptor. *J. Med. Chem.* 47, 5798–5808 (2004).
105. Baenziger, J. U. & Fiete, D. Galactose and N-acetylgalactosamine-specific endocytosis of glycopeptides by isolated rat hepatocytes. *Cell* 22, 611–620 (1980).
106. Rensen, P. C. et al. Determination of the upper size limit for uptake and processing of ligands by the asialoglycoprotein receptor on hepatocytes in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 276, 37577–37584 (2001).
107. Kallanthottathil, R. Conjugation strategies for in vivo miPHKdelivery (2012); <http://www.alnylam.com/capella/wp-content/uploads/2012/11/ALNY-OTSConjugate-Oct2012.pdf>
108. Smith, D., Schüller, V., Engst, C., Rädler, J. & Liedl, T. Nucleic acid nanostructures for biomedical applications. *Nanomedicine* 8, 105–121 (2013).
109. Shu, D., Shu, Y., Haque, F., Abdelmawla, S. & Guo, P. Thermodynamically stable RNA three-way junction for constructing multifunctional nanoparticles for delivery of therapeutics. *Nature Nanotech.* 6, 658–667 (2011).
110. Goodman, R. P. et al. Rapid chiral assembly of rigid DNA building blocks for molecular nanofabrication. *Science* 310, 1661–1665 (2005).
111. Xia, W. & Low, P. S. Folate-targeted therapies for cancer. *J. Med. Chem.* 53, 6811–6824 (2010).
112. Gindy, M. E., Leone, A. M. & Cunningham, J. J. Challenges in the

pharmaceutical development of lipid-based short interfering ribonucleic acid therapeutics. *Expert Opin. Drug Deliv.* 9, 171–182 (2012).

113. Chen, D. et al. Rapid discovery of potent miRNA-containing lipid nanoparticles

enabled by controlled microfluidic formulation. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 6948–6951 (2012).

114. Balashov, A. I. (2012) Formirovaniye mekhanizma ustoychivogo razvitiya farmatsevticheskoy otrasli: teoriya i metodologiya. SPb.: Izd-vo SPbGUEF. 160 s.

115. Buryak, N. B., Lukash, S. V. (2012). Problemy zbyrannya, transportuvannya ta utylizatsiyi tverdykh pobutovykh vidkhodiv v Ukrayini. *Naukovyy visnyk NLTU Ukrayiny*, 22(5), 82–90.

116. Vereshchahina, L. M., Baykova, S. A., Lohunova, A. YU. (2013). Sposib ochyshchennya stichnykh vod vid orhanichnykh rehovyn. Kyiv: Urozhay. 26 s

117. Жернаков В.В. До питання про правове розуміння свободи праці. // Актуальні проблеми сучасної науки в дослідженнях молодих вчених. Вип. 3 і 4. - Х.: «Основа», 1997.- 526 с.

118. Гандзюк М.П., Желібо Є.П., Халімовський М.О. Основи охорони праці: Підручник. 2-ге вид. - К.: Каравела, 2004. - 408 с.

119. Бандурка А.М. Охорона праці в діяльності ОВС України: Підручник. - Х.:

Вид-во Націон. ун-ту внутр. справ, 2003. - 288 с.

120. Прокопенко В.І. Трудове право України: Підручник. - Х.: Консум, 1998. - 480 с.

121. Венедиктов В.С. Трудовое право Украины (Общая часть). - Симферополь: «ДОЛЯ», 2004. - 164с.

122. Гончарова Г.С. Охорона праці: Текст лекції. - Х.: ХГІ «НУА», 1995.- 28с.

123. Болотіна Н.Б. Трудове право України: Підручник. 2-ге вид., стер. - К.: Вікар,

2004.- 725 с.

124. Щербина В.І. Теоретичні проблеми охоронної функції трудового права в умовах ринкових відносин: Монографія. - Дніпропетровськ: Академія митної служби України, 2004. - 211с.

125. Жедецкий В.Ц., Джигеирей В.С. Мельников А.В. Основы охраны труда. Учебник, изд. 2-е, дополненное. - Львов: Афиша, 2000. - 351 с.

126. Сивко В.Й. Правові та організаційні основи охорони праці в Україні: Навчальний посібник. - К.: Кондор, 2003. - 143 с.

127. Прокопенко В.І. Трудове право України: Підручник. Видання друге. - Х.: Консум, 2000. - 359 с.

128. Титаренко О. Безпечна праця - передусім. // Слобідський край. - 2004 - №80. - С.14.

129. Охорона праці в Україні. // Бюлетень законодавства і юридичної практики в Україні. - 1999. - №12: - С.8.

130. Матеріали до лекції. Модуль 2 : (текст) [Електронний ресурс]. – Режим доступу : <https://www.uzhnu.edu.ua/en/infocentre/get/23225>