

СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ

14-я Международной научной конференции

БИОКАТАЛИЗ-2026

«БИОКАТАЛИЗ. ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ»

Суздаль, Россия | 28 июня - 2 июля 2026 г.

Хроматографические системы серии Аксиома®

для очистки белков, пептидов и нуклеиновых кислот

СДЕЛАНО В РОССИИ • ПРОИЗВОДСТВО БИОХИММАК



Хроматографический препаративный комплекс низкого давления «Аксиома® Дебют» и хроматографические системы среднего давления «Аксиома® Стандарт 25» и «Аксиома® Стандарт 150» предназначены для проведения автоматизированной многоступенчатой очистки природных, синтетических и генно-инженерных субстанций методом жидкостной хроматографии в масштабе от лабораторного выделения до промышленного производства.

МОДЕЛЬ / ХАРАКТЕРИСТИКИ	АКСИОМА® ДЕБЮТ	АКСИОМА® СТАНДАРТ 25	АКСИОМА® СТАНДАРТ 150
Производительность	От миллиграммов до граммов		До десятков граммов
	• Перистальтический насос • Поток 0,1-25 мл/мин • Давление до 3 бар • Градиент низкого давления через клапанную группу • Входной кран селектор (до 6 линий) и 2 градиентных клапана • Ввод образца краном-инжектором или насосом • Миксер статический • УФ-детектор, 280 нм • Кондуктометр • Коллектор фракций на базе переключающего крана (6 линий • Компьютер со встроенным ПО «Мультихром-AXIOMA» • Возможность наработки в циклическом режиме	• 3 Плунжерных насоса • Поток 0,1-25 мл/мин • Давление до 150 бар • Градиент высокого давления из двух насосов – третий насос для подачи образца и буферных растворов • Ввод образца насосом или краном-инжектором • Миксер статический • УФ-детектор, 280 нм • Кондуктометр • Кран изменения направления потока в колонке • Встроенный коллектор фракций на базе переключающего крана (6 линий) • Входные клапаны (до 9 линий) • Компьютер со встроенным ПО «Мультихром-AXIOMA» • Возможность наработки в циклическом режиме	• 3 Плунжерных насоса • Поток 0,1-150 мл/мин • Давление до 50 бар • Градиент высокого давления из двух насосов – третий насос для подачи образца и буферных растворов • Ввод образца насосом или краном-инжектором • Миксер статический • УФ-детектор 280 нм • Кондуктометр • Кран изменения направления потока в колонке • Встроенный коллектор фракций на базе переключающего крана (6 линий) • Входные клапаны (до 9 линий) • Компьютер со встроенным ПО «Мультихром-AXIOMA» • Возможность наработки в циклическом режиме

Опционально: Спектрофотометр 200-400 или 200-600 нм, 2 канала детектирования; проточный pH-метр; стандартный коллектор фракций;

Для моделей Стандарт – устройство для автоматического выбора колонки (до пяти)

Широкий выбор сорбентов и колонок

Традиции. Опыт. Инновации

АО «БиоХимМак»

119192, Москва, Ломоносовский пр., д. 29, к. 1;

- **+7 (495) 647-27-40**;
- **pcr@biochemmack.ru**
- **www.biochemmack.ru**



СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ

14-ой Международной научной конференции «БИОКАТАЛИЗ. ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ» (БИОКАТАЛИЗ - 2026)

28 июня - 2 июля 2026 г.

г. Суздаль, Россия

14-ая Международная научная конференция «БИОКАТАЛИЗ. ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ» (БИОКАТАЛИЗ - 2026), Суздаль, 2026. – 350 с.

ISBN 978-5-6056411-0-0

Настоящие материалы Конференции созданы на основании информации, предоставленной участниками и одобренные организационным комитетом. Материалы публикуются в авторской версии. Организаторы не несут ответственности за неточности и упущения в названиях и адресах, представленных в данном сборнике.
Основная тематика конференции:

- Структура, каталитический механизм, генетическая инженерия ферментов, методы и достижения в конструировании белков. Модели ферментов (биозимы).
- Получение и применение биокатализаторов на основе иммобилизованных ферментов, мультиферментных систем и клеток микроорганизмов в пищевой промышленности, органическом синтезе, агробиотехнологии и экологии.
- Ферменты и эффекторы в медицине, иммунохимии, нейрохимии и геномике. Биокаталитические технологии в развитии физико-химических методов для биомедицинских исследований. Биосенсоры и биочипы. Цифровые технологии в биокатализе. Ферменты резистентности. Ферменты и новая энергетика. Космическая энзимология.

ISBN 978-5-6056411-0-0

9 785605 641100 >

Подписано в печать 22.06.2026. Тираж 200 экз.

Отпечатано: ООО «АДМИРАЛ ПРИНТ»,
Москва, ул. Барклая, д. 13 стр. 1

ОРГАНИЗАТОРЫ

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Российская академия наук

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

ФИЦ БИОТЕХНОЛОГИИ РАН

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

ИБХФ РАН

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН (ИБХФ РАН)

ПРИ ПОДДЕРЖКЕ

Ким Борис Борисович –
выпускник кафедры химической энзимологии
Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Медман Диана Яковлевна –
бывшая сотрудница кафедры химической энзимологии
Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Синицын Аркадий Пантелеймонович –
профессор кафедры химической энзимологии
Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

ЗОЛОТЫЕ СПОНСОРЫ

АО «БиоХимМак»

АО «НВО ИММУНОТЕХ»

СПОНСОР

ООО «ФЛУОЛАБ»

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Профессиональный организатор конгрессов
WWW.MESOL.RU

КОМИТЕТЫ

ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ КОМИТЕТ

Варфоломеев С.Д., чл.-корр. РАН – сопредседатель
Клячко Н.Л., профессор, д.х.н. – сопредседатель
Гачок И.В., к.х.н. – ученый секретарь

ЧЛЕНЫ ОРГАНИЗАЦИОННОГО КОМИТЕТА

Бачурин С.О., академик РАН

Габибов А.Г., академик РАН

Дзантиев Б.Б., профессор, д.х.н.

Егоров А.М., академик РАН

Ефременко Е.Н., профессор, д.б.н.

Карлов С.С., профессор, д.х.н.

Курочкин И.Н., профессор, д.х.н.

Лаврик О.И., академик РАН

Попов В.О., академик РАН

Савицкий А.П., профессор, д.х.н.

Синицын А.П., профессор, д.х.н.

Угарова Н.Н., профессор, д.х.н.

Федорчук В.В., к.х.н.

Хренова М.Г., профессор, д.х.н

Швядас В., профессор, д.х.н.

ПРОГРАММНЫЙ КОМИТЕТ

Ефременко Е.Н., профессор, д.б.н. – сопредседатель
Угарова Н.Н., профессор, д.х.н. – сопредседатель
Гачок И.В., к. х. н. – ученый секретарь

ЧЛЕНЫ ПРОГРАММНОГО КОМИТЕТА

Бачурин С.О., академик РАН

Дзантиев Б.Б., профессор, д.х.н.

Егоров А.М., академик РАН

Кершенгольц Б.М., профессор, д.б.н., академик АН РС(Я)

Клячко Н.Л., профессор, д.х.н.

Кудряшова Е.В., профессор, д.х.н.

Курочкин И.Н., профессор, д.х.н.

Лаврик О.И., академик РАН

Массон П., д. фарм.н. (State Doctorate in Pharmaceutical Sciences), член-корр. Национальной академии медицины Парижа, действительный член Национальной фармацевтической академии

Попов В.О., академик РАН

Савицкий А.П., профессор, д.х.н.

Синицын А.П., профессор, д.х.н.

Хренова М.Г., профессор, д.х.н

Швядас В., профессор, д.х.н.

Ilina A. 10, 12, 14
Аксенов А.С. 16
Алферов С.В. 17
Анашкин В.А. 19
Асланлы А.Г. 22
Атрошенко Д.Л. 25
Багаева Д.И. 27
Бачева А.В. 29
Бейлинсон Р.М. 31
Белинская Д.А. 34
Беспятых Ю.А. 37
Билан Д.С. 38
Боровикова И.И. 40
Варфоломеев С.Д. 42
Васильева А.Д. 45
Волков П.В. 47
Газарян И.Г. 49
Гайдамака С.Н. 51
Галкина Д.А. 54
Гасымова Э.И. 55
Гачок И.В. 58
Генденов Р.М. 61
Гершкович К.Б. 64
Гладченко М.А. 67
Глазунова М.Г. 70
Голенкина Е.А. 72
Головин А.В. 75
Гончаров Н.В. 76
Гребенникова О.В. 79
Гречишникова Е.Г. 81
Григоренко В.Г. 83
Дёмина О.В. 86
Дзантиев Б.Б. 88
Дизик В.С. 90
Дорощенко А.В. 93
Ежов А.А. 96
Еремин С.А. 99
Ерошенко Н.С. 101
Ефременко Е.Н. 102
Ефремова А.Д. 105
Жданов Д.Д. 107
Жердев А.В. 109
Завьялова Е.Г. 111
Зайцева Е.А. 114, 117
Зартдинова Р.Ф. 120
Зверева Е.А. 123

Злотников И.Д. 124
Калинина Е.В. 127
Касаткина С.И. 129
Кершенгольц Б.М. 131
Клячко Н.Л. 134
Коваленко Г.А. 136
Козырев Н.А. 139
Колесниченко А.В. 142
Кольтовер В.К. 144
Копнова Л.Р. 146
Копнова Т.Ю. 149
Корниенко Т.Е. 151
Краевский С.В. 153
Кратасюк В.А. 155
Кривошей А.В. 157
Крылов В.Б. 160
Крюкова О.В. 162, 164
Кудряшова Е.В. 167
Куликова Д.И. 169
Курочкин И.Н. 172
Курьяков В.Н. 174
Кушлинский Н.Е. 346
Лаврова Д.Г. 178
Лапаник А.Д. 180
Лебедева Ю.Л. 183
Левашов П.А. 185
Лендел А.М. 187
Ломакина Г.Ю. 190
Лыпенко И.Д. 193
Лягин И.В. 196
Максимова Ю.Г. 199
Мальцева П.Ю. 202
Маслова О.В. 204
Массон П. 207
Матвеева В.Г. 209
Махаева Г.Ф. 211
Мишин П.И. 214
Мосиевич Д.В. 343
Муронец В.И. 217
Мухаметова Л.И. 219
Насибова Н.Р. 222
Павлова Е.Ф. 224
Панина И.С. 226
Панфёров В.Г. 228
Парунова Ю.М. 230
Паширова Т.Н. 233

Пергушов Д.В. 235
Петровская Л.Е. 237
Плешков Д.Н. 239
Пометун А.А. 240
Понаморева О.Н. 242
Попова Е.В. 245
Прусаков К.А. 248
Родина Е.В. 250
Рубцова М.Ю. 252
Рудаков Н.С. 255
Савицкий А.П. 257
Самохвалов А.В. 258
Самушия А.Я. 260
Сафенкова И.В. 263
Селимзянова А.И. 265
Сенчурова С.И. 267
Сенько О.В. 269
Сергеев Е.П. 272
Серкова С.Ю. 274
Сиголаева Л.В. 276
Скуредина А.А. 278
Смирнов А.С. 281
Сокол М.Б. 283
Соколова А.В. 286
Степанов Н.А. 289
Сульман А.М. 291
Сюе Шися 293
Телепенина К.П. 296
Тихомирова В.Е. 298
Хренова М.Г. 301
Чепанова А.А. 302
Черкашин Е.А. 304
Черкашина А.С. 306
Черномаз И.С. 307, 309
Чиркина М.В. 312
Чудаков Д.Б. 315, 318
Чудин А.А. 321
Шайхутдинова З.М. 323
Шаройко В.В. 326
Шахматов И.В. 328
Швядас В.К. 330
Шевченко А.Р. 333
Шемякина А.О. 336
Шумянцева В.В. 339
Юрина Л.В. 340

NANOMAGNETIC PLATFORMS FOR ENZYME IMMOBILIZATION: ADVANCES IN MAGNETIC NANOBIOCATALYTIC SYSTEMS

Osiel Magnol Chávez-Álvaro [1], Nayra Ochoa-Viñals[1], Dania Alonso-Estrada[2], José Luis Martínez-Hernández[1], Rodolfo Ramos-González [3], Bertha Puente-Urbina[2], Elda Patricia Segura-Ceniceros[1], Anna Ilina[1*]

[1] Grupo de Investigación en Nanobiociencias, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Blvd. V. Carranza e Ing. J. Cárdenas V., CP. 25290, Saltillo, Coahuila, México.
[2] Centro de Investigación de Química Aplicada, Blvd. Enrique Reyna Hermosillo #140, CP. 25294, Saltillo, Coahuila, México.
[3] SECIHTI - Universidad Autónoma de Coahuila, Blvd. V. Carranza e Ing. J. Cárdenas V., CP. 25290, Saltillo, Coahuila, México.
annailina@uadec.edu.mx

The development of nanostructured magnetic supports has emerged as a promising strategy to improve enzyme stability, recovery, and reusability in biotechnological processes. The Nanobioscience Research Group at the Autonomous University of Coahuila (UAdeC, Mexico) has focused on designing multifunctional magnetic nanosystems based on chitosan-coated ferrite nanoparticles for enzyme immobilization and sustainable biocatalytic applications. These studies integrate nanobiotechnology, enzyme engineering, and biomass valorization to develop reusable, efficient catalytic platforms.

Magnetic nanoparticles coated with chitosan were synthesized primarily via a simple one-step coprecipitation method, yielding biocompatible supports with high surface area, superparamagnetic behavior, and abundant amino and hydroxyl groups suitable for covalent enzyme immobilization. Industrially relevant oxidoreductases and hydrolases, including lipases, cellulases, laccases, and invertases, were successfully immobilized on these nanostructured supports using glutaraldehyde- or glycidol-based activation strategies.

One of the first developed systems involved immobilizing *Aspergillus niger* lipase on chitosan-coated magnetic nanoparticles. The obtained biocatalysts demonstrated high catalytic activity, improved pH and thermal stability, excellent storage stability, and remarkable operational reuse, retaining more than 80% of activity after multiple hydrolytic cycles. The magnetic properties of the support enabled rapid separation of the immobilized enzyme using an external magnetic field, demonstrating its potential for continuous bioprocesses and industrial applications.

Subsequently, cellulases from *Trichoderma reesei* were immobilized on magnetic chitosan nanoparticles and evaluated for their ability to hydrolyze lignocellulosic biomass from *Agave atrovirens* residues. The immobilized cellulases exhibited enhanced thermal and storage stability, allowing repeated use in cellulose saccharification processes. Importantly, the developed nanobiocatalyst enabled efficient hydrolysis of agave lignocellulosic biomass, supporting its application in second-generation bioethanol production and agroindustrial residue valorization.

Another relevant contribution involved immobilizing *Trametes versicolor* laccase onto superparamagnetic nanoparticles to pretreat agave biomass prior to enzymatic saccharification. The immobilized enzyme showed high protein immobilization yield, preserved catalytic activity, and superior stability compared with the free enzyme. This study demonstrated the feasibility of applying magnetic nanobiocatalytic systems for lignin modification and biomass pretreatment in integrated biorefinery processes.

More recently, the Nanobioscience Research Group expanded the application of magnetic nanobiocatalytic systems toward affinity-based enzyme immobilization using glycosylated invertases. A lectin-mediated nanosystem based on Concanavalin A-functionalized chitosan-coated manganese ferrite nanoparticles ($MnFe_2O_4$–Ch–ConA) was developed for the selective immobilization of commercial invertase and extracellular invertase produced by *Rhodotorula toruloides*. The magnetic nanosystem exhibited high immobilization

yields, preserved catalytic activity, and significantly improved thermal, storage, and operational stability. The immobilized commercial invertase retained more than 95% activity after 30 reuse cycles, while the *R. toruloides* invertase maintained over 70% activity after 15 cycles. The study demonstrated that lectin-functionalized magnetic nanoparticles constitute a robust and reusable affinity platform for glycosylated enzymes, opening new opportunities for sustainable sucrose hydrolysis and agro-industrial biocatalytic applications.

Currently, studies are underway on immobilizing amylase onto chitosan-coated magnetite nanoparticles via periodate activation to develop novel magnetic nanobiocatalytic systems with enhanced stability and recovery for industrial bioprocess applications.

Overall, the research developed by the Nanobioscience Group at UAdeC demonstrates that magnetic nanobiocatalytic platforms represent versatile tools for enzyme stabilization, recovery, and process intensification. These systems combine nanotechnology and biocatalysis to generate sustainable solutions for industrial biotechnology, biomass conversion, enzyme reuse, and circular bioeconomy applications. The integration of magnetic separation technologies with enzyme and microbial immobilization opens new opportunities for advanced bioprocess engineering and scalable nanobiotechnological applications.

MAGNETIC-ASSISTED EXTRACTION AND SEPARATION OF BIOMOLECULES USING FUNCTIONALIZED MAGNETIC NANOSTRUCTURES

Daniel Ignacio Martínez-Dena [1], Nayra Ochoa-Viñals[1], Dania Alonso-Estrada[2], José Luis Martínez-Hernández[1], Rodolfo Ramos-González [3], Jesús Alfonso-Mercado[2], Mayela Govea Salas[1], Anna Ilina[1*]

[1]Grupo de Investigación en Nanobiociencias, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Blvd. V. Carranza e Ing. J. Cárdenas V., CP. 25290, Saltillo, Coahuila, México.
[2] Centro de Investigación de Química Aplicada, Blvd. Enrique Reyna Hermosillo #140, CP. 25294, Saltillo, Coahuila, México.
[3] SECIHTI - Universidad Autónoma de Coahuila, Blvd. V. Carranza e Ing. J. Cárdenas V., CP. 25290, Saltillo, Coahuila, México.
annailina@uadec.edu.mx

Magnetic-assisted extraction and separation technologies have emerged as innovative alternatives to conventional purification and recovery processes in biotechnology. The Nanobioscience Research Group at the Autonomous University of Coahuila (UAdeC, Mexico) has developed multifunctional magnetic nanostructures capable of selectively adsorbing, recovering, immobilizing, and extracting biomolecules through affinity interactions combined with magnetic separation. These studies integrate nanobiotechnology, magnetic functional materials, and bioseparation engineering for sustainable downstream bioprocessing applications.

One of the principal contributions of the group involved the development of chitosan–heparin functionalized magnetic nanoparticles for affinity recovery of *Aspergillus niger* lipase. The nanosystem was synthesized via coprecipitation and functionalized with heparin, an affinity ligand capable of selectively interacting with the enzyme. The magnetic recovery process enabled efficient lipase adsorption and magnetic separation under mild conditions while preserving enzymatic activity. The recovered enzyme retained catalytic activity, demonstrating the feasibility of magnetic affinity purification as an alternative to centrifugation and filtration.

The group also designed magnetic nanosystems functionalized with *Escherichia coli* DH5α cells to extract and concentrate bacteriophages. Chitosan-coated magnetite nanoparticles (C-MNP) were synthesized and subsequently functionalized with bacterial cells, enabling selective phage adsorption and rapid magnetic recovery from aqueous systems. The magnetic nano-bio complex improved phage recovery compared with conventional methods and enabled multiple reuse cycles without substantial loss of efficiency. This work demonstrated the potential of magnetic nanoplatforms for bioseparation of viral particles and environmental biotechnology applications.

Another important contribution involved the development of magnetic extraction systems for carotenoid recovery from *Rhodotorula toruloides*. Chitosan-coated manganese ferrite nanoparticles stimulated carotenoid production while simultaneously enabling magnetic biomass separation and metabolite recovery. The interaction between yeast cells and magnetic nanoparticles facilitated rapid magnetic precipitation of the biomass, simplifying downstream processing and opening opportunities for integrated fermentation–separation systems.

More recently, the group developed a highly innovative magnetic affinity platform based on casein-functionalized chitosan-coated manganese ferrite nanoparticles (Cas@CSMNP) for selective carotenoid extraction. The system combined the magnetic properties of $MnFe_2O_4$ nanoparticles with the affinity interactions provided by casein, enabling selective adsorption of carotenoids under ethanol-compatible conditions. Adsorption efficiencies reached 73.1% for β-carotene standards and 84.2% for *R. toruloides* carotenoid extracts after only 1 h of interaction. The platform demonstrated excellent biocompatibility and represents a promising solvent-saving strategy for the selective recovery and purification of carotenoids.

The Nanobioscience Group has also explored integrating magnetic separation with magnetic hyperthermia to enable controlled extraction of intracellular biomolecules. Manganese ferrite nanoparticles ($MnFe_2O_4$) were

applied as both immobilization supports and hyperthermia agents for *Rhodotorula toruloides*. Under alternating magnetic fields, localized heating promoted controlled cell disruption and enhanced carotenoid release while allowing simultaneous magnetic biomass recovery. Carotenoid extraction progressively increased after repeated hyperthermia cycles, demonstrating the feasibility of combining magnetic separation with controlled magnetic heating as an environmentally friendly extraction strategy.

Collectively, these studies demonstrate the versatility of magnetic nanostructures for biomolecule extraction, affinity purification, enzyme recovery, phage isolation, and selective metabolite separation. The approaches developed by the Nanobioscience Research Group establish a platform for sustainable downstream bioprocessing, integrating magnetic responsiveness, affinity interactions, and multifunctional nanobiotechnology into advanced bioseparation systems with applications in food biotechnology, biocatalysis, environmental biotechnology, and biomedicine.

EFFECT OF MAGNETIC NANOPARTICLES ON MICROBIAL METABOLITE PRODUCTION: WHOLE-CELL BIOCATALYSIS AND SURFACE ADHESION FERMENTATION

Bertha Guajardo-Paz[1], Nayra Ochoa-Viñals[1], Dania Alonso-Estrada[2], Rodolfo Ramos-González [3], Julia Cecilia Anguiano-Cabello[1], Rebeca Betacourt-Galindo[2], Roberto Arredondo-Valdés [1], Anna Ilina[1*]

[1]Grupo de Investigación en Nanobiociencias, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Blvd. V. Carranza e Ing. J. Cárdenas V., CP. 25290, Saltillo, Coahuila, México.
[2] Centro de Investigación de Química Aplicada, Blvd. Enrique Reyna Hermosillo #140, CP. 25294, Saltillo, Coahuila, México.
[3] SECIHTI - Universidad Autónoma de Coahuila, Blvd. V. Carranza e Ing. J. Cárdenas V., CP. 25290, Saltillo, Coahuila, México.
annailina@uadec.edu.mx

The interaction between microorganisms and magnetic nanoparticles has emerged as a promising strategy for enhancing whole-cell biocatalysis, microbial metabolite production, and biomass recovery. The Nanobioscience Research Group at the Autonomous University of Coahuila (UAdeC, Mexico) has developed a research line focused on the application of chitosan-coated manganese ferrite nanoparticles ($MnFe_2O_4$–Ch) as multifunctional nanoplatforms that stimulate microbial metabolism, promote cell immobilization, and improve biotechnological fermentation processes. These studies integrate nanobiotechnology, microbial catalysis, and magnetic-assisted fermentation within the framework of sustainable bioprocesses and circular bioeconomy.

Magnetic manganese ferrite nanoparticles coated with chitosan were synthesized via one-step coprecipitation, assisted by hydrothermal treatment, yielding biocompatible nanostructures with high magnetic responsiveness, colloidal stability, and functional amino groups that favor microorganism interaction. Structural characterization demonstrated spinel ferrite formation, superparamagnetic behavior, and hydrodynamic particle sizes suitable for microbial immobilization and magnetic recovery.

One of the group's principal contributions was the study of carotenoid production by *Rhodotorula toruloides* in the presence of chitosan-coated manganese ferrite nanoparticles. The interaction between nanoparticles and yeast cells promoted magnetic immobilization and stimulated carotenoid biosynthesis without negatively affecting cell viability. Carotenoid production increased significantly, reaching 256.2 ± 6.1 μg/g dry biomass in the presence of 2 mg/mL $MnFe_2O_4$–Ch nanoparticles. The results suggested that magnetic nanoparticles may induce physiological responses associated with oxidative stress adaptation and enhanced membrane permeability, thereby stimulating secondary metabolite production.

The group also developed surface-adhesion fermentation (SAF) systems assisted by magnetic nanoparticles for invertase production in *Rhodotorula toruloides*. The $MnFe_2O_4$–Ch nanoparticles promoted microorganism adhesion, facilitated magnetic biomass separation, and enabled biomass reuse during multiple fermentation cycles. The presence of magnetic nanoparticles increased invertase production by approximately 69% compared to conventional submerged fermentation, while the highest enzymatic activity reached 1.88 IU/mL under optimized conditions. Importantly, immobilized yeast maintained catalytic activity during reuse cycles, demonstrating the feasibility of magnetically assisted whole-cell biocatalysis.

Another relevant contribution involved the application of functionalized manganese ferrite nanoparticles in *Streptomyces griseus* fermentation to enhance antifungal metabolite production. Cell immobilization on magnetic nanoparticles was successfully demonstrated using adsorption isotherm models. The presence of functionalized magnetic nanoparticles stimulated the production of antifungal metabolites, achieving up to 91.5% inhibition of fungal radial growth in cell-free extracts obtained from nanoparticle-assisted fermen-

tations. These findings demonstrated that magnetic nanoparticles can modulate microbial metabolism and improve the production of bioactive compounds with agricultural applications.

Collectively, the studies developed by the Nanobioscience Group at UAdeC demonstrate that magnetic nanoparticles are not only passive supports for cell immobilization but also active modulators of microbial metabolism and whole-cell catalytic performance. The integration of magnetic-assisted fermentation, surface adhesion bioprocesses, and nanostructured biomaterials opens new opportunities for advanced whole-cell biocatalysis, metabolite overproduction, magnetic biomass recovery, and sustainable industrial biotechnology.

УДК 577:15

ДОСТИЖЕНИЯ В ОБЛАСТИ ПОЛУЧЕНИЯ И ИЗУЧЕНИЯ КСИЛООЛИГОСАХАРИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЕРМЕНТОВ

Аксенов А.С.[1], **Шевченко А.Р.**[1], **Акишин Д.А.**[1], **Каретова К.М.**[2], **Майорова К.А.**[1]

[1] *Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова, Архангельск, РФ*
[2] *Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, РФ*
a.s.aksenov@narfu.ru

Аннотация. Рассмотрены биокаталитические способы получения олигосахаридов из лигноцеллюлозного сырья. Отмечена особая роль продуктов ферментативного гидролиза гемицеллюлоз в биоэкономической модели лесного комплекса. Образующиеся ксилоолигосахариды в результате действия эндо-1,4-β-D-ксиланаз различных семейств и других ферментов обладают пребиотическим эффектом по отношению к целому ряду микроорганизмов. Предложены технологические решения применения стадий гидролитической деструкции ксилана в процессах переработки лигноцеллюлозного сырья

Ключевые слова: пребиотики, олигосахариды, эндоксиланазы.

Ксилоолигосахариды, полученные различными способами из ксилансодержащих ресурсов рассматриваются как эффективные пребиотики, которые могут быть метаболизированы бактериями кишечника. Наибольший рост интереса к данным молекулам возник из-за возможностей контролируемого гидролиза данного растительного полимера современными ферментными препаратами [1]. Однако, несмотря на наличие доступных ферментных препаратов ксиланаз, реализованные на практике биокаталитические технологии получения ксилоолигосахаридов из лигноцеллюлозных материалов весьма ограничены.

В работе приведены основные достижения в получении пребиотических препаратов растительного происхождения и их характеристика. Оптимизированы стадии ферментативного гидролиза промышленных целлюлозно-гемицеллюлозных древесных полуфабрикатов препаратами эндоксиланаз и другими карбогидразами и эндоглюканазами. Получены препараты ксилоолигосахаридов с высоким выходом. Показано, что ряд лактобактерий способны к росту на древесных олигосахаридах, что позволяет предложить последние в качестве компонента синбиотических препаратов.

На основании полученных результатов разработаны технологические решения по использованию стадии ферментативного гидролиза ксилана в составе древесных полуфабрикатов на предприятиях химико-лесного комплекса Российской Федерации.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 26-14-00455.

Список литературы

1. Puja B.K., Mallick S., Dey T., Chanda S., Ghosh S. Xylooligosaccharide recovery from sugarcane bagasse using β-xylosidase-less xylanase, BsXln1, produced by *Bacillus stercoris* DWS1: Characterization, antioxidant potential and influence on probiotics growth under anaerobic conditions. Int J Biol Macromol. 2025, 285:138307, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.138307.

УДК 544.478.3

БИОКАТАЛИЗАТОРЫ НА ОСНОВЕ ФЕРМЕНТНЫХ КАСКАДОВ БАКТЕРИЙ *GLUCONOBACTER OXYDANS* ДЛЯ БИОЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Алферов С.В.

ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», Тула, Россия
s.v.alferov@gmail.com

Аннотация. Показана возможность использования природных мембранных каскадов бактерий *Gluconobacter oxydans* в качестве биокатализаторов для биоэлектрохимических систем. Для формирования биоанодов использовали методы иммобилизации биоматериала путем сшивки глутаровым альдегидом и включение биокатализатора в электропроводящие гидрогели.

Ключевые слова: мембранные каскады, биоаноды, электропроводящие гидрогели, биокатализаторы.

Как известно, специфичность пути превращения индивидуального фермента предполагает окисление субстрата до какого-либо одного специфического продукта. Например, глюкозооксидаза катализирует частичное двухэлектронное окисление глюкозы в глюконолактон. Однако для биоэлектрохимических систем, таких как биотопливные элементы, перспективным является наиболее полное окисление субстратов с максимальным количеством генерируемых электронов. При полном окислении глюкозы до CO_2 и H_2O можно получить 24 электрона, однако для этого необходимо использовать каскад ферментов. В гликолитическом распаде глюкозы задействован ряд ферментов разных классов, что делает практически невозможным формирование такого электрода биотопливных элементов для полного окисления глюкозы. Возможность полного окисления глюкозы до CO_2 была показана с использованием каскада из шести PQQ-зависимых ферментов: глюкозо-, альдегид-, глюконат- и алкогольдегидрогеназы, альдолазы и оксалатоксидазы [1]. Фрагменты бактериальных мембран с локализованными ферментами могут действовать как естественные ферментативные каскады. Уксуснокислые бактерии рода *Gluconobacter* – это микроорганизмы с особой организацией ферментных систем. Окисление субстратов этими бактериями осуществляется мембраносвязанными дегидрогеназами, локализованными на внешней стороне цитоплазматической мембраны и содержащими пирролохинолинхинон в качестве кофактора [2, 3]. Индивидуальные ферменты, выделенные из уксуснокислых бактерий и целых бактериальных клеток, были использованы для разработки биосенсоров [4] и БТЭ [5]. Таким образом, мембранные фракции уксуснокислых бактерий можно рассматривать как природные мультиферментативные системные каскады для эффективного окисления сахаров, полиолов и спиртов в биоэлектрохимических системах.

Получение мембранных каскадов бактерий *Gluconobacter oxydans* проводили по модифицированной методике, представленной в работе [6]. Для формирования биоанодов использовали подходы для закрепления биокатализатора на поверхности электрода биотопливного элемента. Наиболее простой метод сшивки глутаровым альдегидом позволяет сшивать как свободные аминогруппы боковых заместителей, так сульфгидрильные группы цистеина. При этом на поверхности электрода образуется устойчивая пленка биокатализатора. Максимальный генерируемый потенциал биотопливного элемента при окислении глюкозы в режиме замкнутой цепи составил 238 ± 6 мВ, максимальная мощность 8,5 ± 0,3 мкВт, электрод оставался стабильным в течение 8 суток. Другим подходом иммобилизации биокатализатора являлось включение биоматериала в электропроводящие гидрогели. Для формирования таких гидрогелей использовали бычий сывороточный альбумин, поливиниловый спирт, сшитый N-винилпирролидоном и хитозан. Для придания электропроводящих свойств при образовании гидрогелей в систему вводились окисленные многостенные углеродные нанотрубки. Методом сканирующей

электронной микроскопии было показано образование стабильных полимероснованных композитов, содержащих каскады бактерий *Gluconobacter oxydans*. Наиболее перспективным композитом, с точки зрения биокаталитических свойств окисления глюкозы, в модели биотопливного элемента оказался композит на основе хитозана. При его образовании формируется однородная плотная структура с равномерным распределение нанотрубок в структуре композита. Максимальный генерируемый потенциал биотопливного элемента при окислении глюкозы в режиме замкнутой цепи составлял 175 ± 10 мВ, максимальная мощность 4,9 ± 0,4 мВт, электрод оставался стабильным по крайней мере 10 суток.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках ГЗ № FEWG-2024-0003 «Биокаталитические системы на основе клеток микроорганизмов, субклеточных структур и ферментов в сочетании с наноматериалами».

Список литературы

1. Xu, S. Enzymatic Biofuel Cell for Oxidation of Glucose to CO_2 / S. Xu, S. D. Minteer // ACS Catalysis. – 2012. – Vol. 2. – № 1. – P. 91-94.
2. Glucose oxidation and PQQ-dependent dehydrogenases in *Gluconobacter oxydans* / T. Hölscher, U. Schleyer, M. Merfort [и др.] // Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. – 2009. – Т. 16. – № 1-2. – С. 6-13.
3. Characterization of enzymes involved in the central metabolism of *Gluconobacter oxydans* / B. Rauch, J. Pahlke, P. Schweiger, U. Deppenmeier // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2010. – Т. 88. – № 3. – С. 711-718.
4. Membrane-bound dehydrogenases from *Gluconobacter* sp.: Interfacial electrochemistry and direct bioelectrocatalysis / J. Tkac, J. Svitel, I. Vostiar [et al.] // Bioelectrochemistry. – 2009. – Vol. 76. – Membrane-bound dehydrogenases from *Gluconobacter* sp. – № 1-2. – P. 53-62.
5. Bioanode for a microbial fuel cell based on *Gluconobacter oxydans* inummobilized into a polymer matrix / S. V. Alferov, P. R. Minaĭcheva, V. A. Arliapov [и др.] // Prikladnaia Biokhimiia I Mikrobiologiia. – 2014. – Т. 50. – № 6. – С. 570-577.
6. Polymer-Based Conductive Nanocomposites for the Development of Bioanodes Using Membrane-Bound Enzyme Systems of Bacteria Gluconobacter oxydans in Biofuel Cells / V. Fedina, D. Lavrova, T. Dyachkova [et al.] // Polymers. – 2023. – Vol. 15. – № 5. – P. 1296.

УДК 577.15

ДИНАМИКА СТРУКТУРЫ В КАТАЛИЗЕ И РЕГУЛЯЦИИ РАСТВОРИМОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ

Анашкин В.А., **Аксёнова В.А.**, **Байков А.А.**

НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Ленинские горы д. 1, стр. 40,
victor_anashkin@genebee.msu.ru

Аннотация. В докладе представлены результаты исследования структурного механизма регуляции нуклеотид-связывающей пирофосфатазы кинетическими и биоинформатическими методами. Представлена структурная модель, хорошо описывающая эффекты, наблюдаемые в стационарной кинетике.

Ключевые слова: аллостерическая регуляция, стационарная кинетика, моделирование структуры, молекулярная динамика.

Пирофосфат (PP_i) является побочным продуктом около 200 биосинтетических реакций, в которых нуклеозидтрифосфаты превращаются в PP_i и нуклеозидмонофосфаты [1]. Как продукт этих реакций, PP_i ингибирует многие из них и поэтому является важнейшим клеточным регулятором. Поскольку PP_i не вступает в метаболические процессы, его уровень регулируется в большинстве клеток посредством гидролиза до метаболизируемого фосфата под действием фермента – неорганической пирофосфатазы. Наиболее интересна регулируемая разновидность этого фермента (CBS-PPаза), которая имеет дополнительную регуляторную часть, образованную парой CBS-доменов и DRTGG-доменом, в виде вставки в один из каталитических доменов (DHH) (рис. 1). Активный центр находится между DHH- и DHHA2-доменами [2]. CBS-PPаза аллостерически активируется или ингибируется адениновыми моно- и динуклеотидами (AMP, ADP, ATP, диаденозинполифосфаты и др.). Эти лиганды связываются с CBS-доменами с наномолярной или микромолярной аффинностью, чаще всего с положительной кооперативностью [3,4]. Известно, что CBS-PPаза образует гомотетрамер [5], однако, его пространственная структура пока не поддается определению прямыми методами. Последнее затрудняет определение структурного механизма регуляции CBS-PPазы.

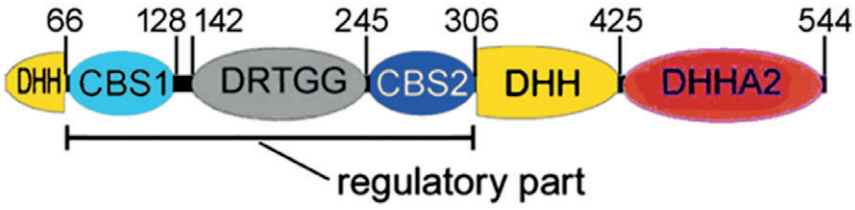


Рисунок 1. Топология субъединицы CBS-PPазы на примере фермента из *Desulfitobacterium hafnience* (Dh-CBS-PPаза).

Используя подходы стационарной кинетики (определение скоростей гидролиза и скоростей синтеза пирофосфата, а также доли комплекса фермент:пирофосфат в состоянии равновесия с фосфатом) при насыщающих концентрациях ингибитора AMP или активатора Ap_4A, в совокупности с биоинформатическими подходами (моделирование 3D-структуры с соответствующими лигандами и её релаксация методами молекулярной динамики), мы получили динамические модели структур тетрамера CBS-PPазы, связанной с AMP или Ap_4A (рис. 2), которые адекватно описывают эффекты регуляторных лигандов. Эти модели предполагают, что DHHA2-домен является ключевым звеном в передаче сигнала из регуляторного центра в активный. Связывание регуляторных лигандов изменяет расположение пар DHH-доменов (расстояние 2 на рис. 2B) и тем самым увеличивает (в случае активатора) или уменьшает

(в случае ингибитора) подвижность DHHA2-домена (вплоть до полной блокировки последней). Эта подвижность определяет изменчивость расстояния 1 на рис. 2B, которая необходима как для катализа гидролиза, так и синтеза пирофосфата. Сравнение поведения комплексов полноразмерной CBS-PPазы с AMP или Ap_4A методами стационарной кинетики и молекулярной динамики подтвердило механизм регуляции фермента, предложенный на основании структурного анализа.

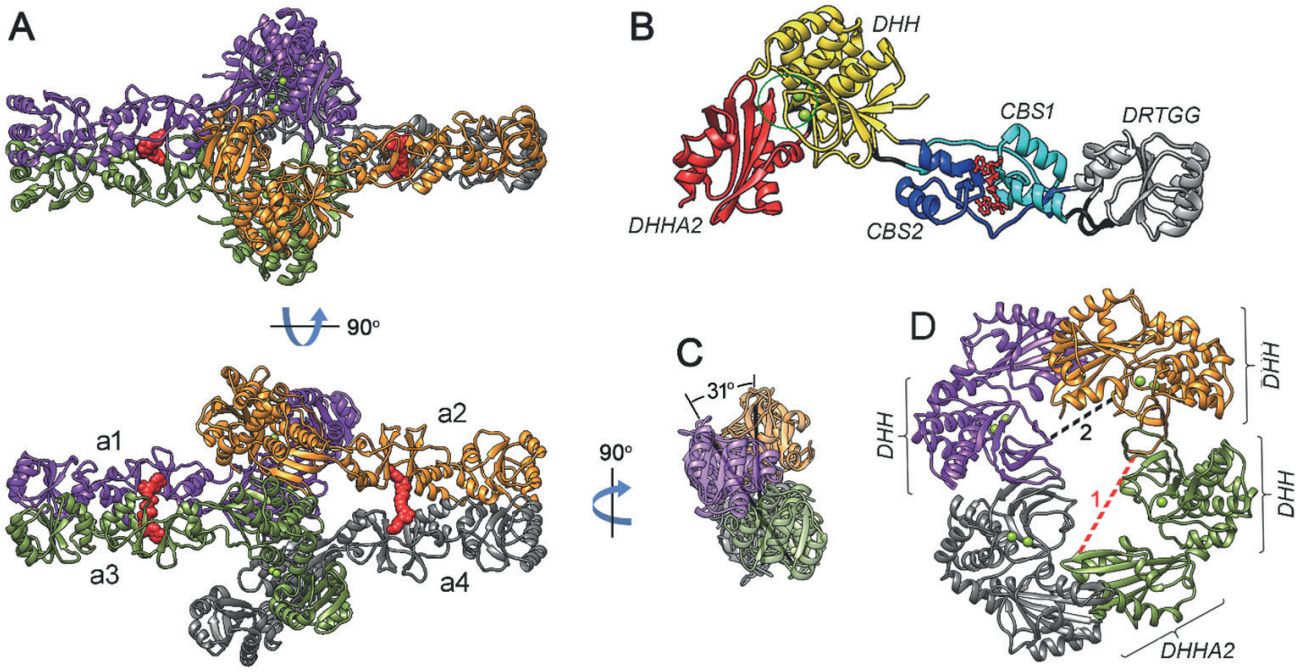


Рисунок 2. Модель 3D-структуры комплекса тетрамера Dh-CBS-PPазы с Ap_4A, полученная в программе Alphafold2 и релаксированная после молекулярной динамики. A) Субъединицы представлены в двух проекциях и окрашены в разные цвета, две связанные молекулы Ap_4A показаны в виде красных сфер. B) Субъединица, окрашенная серым цветом на панели A, в увеличенном виде. Домены окрашены в те же цвета, что и на рис. 1. Зеленым кругом отмечено расположение активного центра. C) Увеличенный вид сбоку тетрамера без каталитических доменов. Цвета субъединиц такие же, как на панели A. Линии соединяют атомы Cα остатков Met111, находящихся в β-тяжах двух взаимодействующих доменов CBS1 в двух регуляторных вставках. D) Увеличенный вид сбоку каталитических доменов без регуляторных доменов. Цвета субъединиц такие же, как на панели A. Домены обозначены в выбранных субъединицах. Расстояние между атомами Cα остатков Gly336 DHH-домена и Met444 DHHA2-домена субъединицы a3 (расстояние 1) обозначено красной пунктирной линией и характеризует открытость активного центра в этой субъединице; таких расстояний на тетрамер четыре. Расстояние между атомами Cα остатков Gly315 DHH-доменов, принадлежащих субъединицам a1 и a2 (расстояние 2), обозначено черной пунктирной линией и характеризует близость двух доменов DHH друг к другу; на один тетрамер приходится два таких расстояния.

Нуклеотид-связывающие CBS-домены входят в состав многих белков, в том числе имеющих медицинскую значимость. Данные, полученные для CBS-PPазы, способствуют выяснению их регуляторных механизмов и возможных путей влияния на них. Кроме того, они открывают возможность применения CBS-доменов для направленного дизайна белков с регулируемой функцией.

Работа выполнена в рамках госзадания № 121031300037-7 МГУ имени М.В. Ломоносова.

Список литературы

1. Heinonen, J.K. Biological role of inorganic pyrophosphate // Kluwer Academic Publishers, London, – 2001.
2. Ahn, S.; Milner, A.J.; Fütterer, K.; Konopka, M.; Ilias, M.; Young, T.W.; White, S.A. The “open” and “closed” structures of the type-C inorganic pyrophosphatases from *Bacillus subtilis* and *Streptococcus gordonii*

// J. Mol. Biol. – 2001. – V. 313. – P. 797–811.
3. Salminen, A.; Anashkin, V.A.; Lahti, M.; Tuominen, H.K., Lahti, R.; Baykov, A.A. Cystathionine ß-synthase (CBS) domains confer multiple forms of Mg^{2+}-dependent cooperativity to Family II pyrophosphatases // J. Biol. Chem. – 2014. – V. 289. – P. 22865–22876.
4. Anashkin, V.A.; Salminen, A.; Tuominen, H.K.; Lahti, R.; Baykov, A.A. Cystathionine β-synthase (CBS) domain-containing pyrophosphatase as a target for diadenosine polyphosphates in bacteria // J. Biol. Chem. – 2015. – V. 290. – P. 27594−27603.
5. Anashkin, V.A.; Salminen, A.; Orlov, V.N.; Lahti, R.; Baykov, A.A. The tetrameric structure of nucleotide-regulated pyrophosphatase and its modulation by deletion mutagenesis and ligand binding // Arch. Biochem. Biophys. – 2022. – V. 692. – No. 108537.

УДК 544:47

IN SILICO ДИЗАЙН БИОКАТАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ ФЕРМЕНТОВ И КОМПОЗИТОВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ДЛЯ ДЕГРАДАЦИИ ТОКСИНОВ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Асланлы А.Г., Домнин М.В., Теплова К.Р., Сорочинская С.А., Ефременко Е.Н.

Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
ayselaslanli@mail.ru

Аннотация. В данной работе в качестве перспективного подхода к решению проблемы связанной с так называемым «цветением водоёмов» в результате активного роста фототрофных микроорганизов, исследована возможность создания биокаталитических систем на основе ферментов, способных катализировать деградация токсинов микроводорослей, и композитов бактериальной целлюлозы (БЦ) с различными полимерами. Для этого были использованы *in silico* методы молекулярного докинга и мультимасштабного моделирования. Показано, что наиболее целесообразным для эффективной детоксификации сред, содержащих токсины микроводорослей, является разработка биокаталитических систем на основе протеолитических ферментов из клеток и композитных материалов на основе БЦ.

Ключевые слова: детоксификация, пептидные токсины, микроводоросли, бактериальная целлюлоза, молекулярное моделирование

Известно, что различные фототрофные микроорганизмы (микроводоросли и цианобактерии) в период их активного роста способны синтезировать токсичные вещества, к числу которых относятся циклические пептиды, алкалоиды, полиэфирные токсины, макролиды и другие молекулы, способные оказывать негативное воздействие на различные живые объекты [1]. С целью снижения рисков для здоровья населения, связанных с присутствием фототрофных микроорганизмов в водных объектах, Всемирная организация здравоохранения предложила ориентировочные нормативы для контроля наиболее распространенных токсинов, которые составляют не более 1,0 мкг/л [2]. На сегодняшний день в литературе имеются данные о возможности биологической деградации большинства токсичных метаболитов микроводорослей клетками различных бактерий и грибов [3]. Однако, несмотря на это, структурное разнообразие токсинов микроводорослей существенно затрудняет разработку универсальных методов их детоксификации. В связи с этим поиск отдельных ферментов, способных эффективно катализировать деградацию таких соединений требует анализа большого числа возможных комбинаций «фермент–токсин» [4]. В связи с этим особый интерес представляет использование компьютерного метода молекулярного докинга, который является доступным и эффективным инструментом, позволяющим в сравнительно короткие сроки моделировать связывание малых молекул с поверхностью ферментов на основе их трёхмерных структур и оценивать характеристики взаимодействий в получаемых моделях «фермент-токсин».

Одним из наиболее перспективных материалов для иммобилизации различных ферментов является бактериальная целлюлоза (БЦ). Уникальные свойства БЦ, такие как высокая степень кристалличности, развитая фибриллярная наноразмерная структура, биосовместимость и высокая механическая прочность, делают её идеальной основой для разработки полимерных композитов [5]. Разработка композитов требует глубокого понимания механизмов взаимодействия БЦ и полимеров на межмолекулярном уровне. Даже небольшие отличия в химической структуре полимера могут приводить к существенным различиям в структуре и свойствах получаемых композитов [6]. Поэтому системное изучение поведения БЦ–полимерных композитов требует не только экспериментов, но и продвинутых методов компьютерного моделирования, обеспечивающих анализ на разных структурных масштабах — от атомарного до макроскопического.

В данной работе для анализа каталитического потенциала ряда ферментов в процессах детоксификации токсинов микроводорослей пептидной природы, и для предсказания структурных и функциональных особенностей поведения смесей БЦ и различных полимеров при создании композитов были использованы методы молекулярного докинга и мульмасштабного моделирования, соответственно.

Полученные результаты молекулярного докинга позволили проанализировать возможные закономерности таких взаимодействий и отобрать наиболее перспективные пары «фермент–токсин». Сравнение значений аффинности (энергия связывания), площади контакта и геометрии расположения токсинов в активных центрах ферментов (расстояния и углы), рассчитанные с помощью молекулярного докинга для полученных моделей, позволило установить, что протеолитические ферменты из клеток *Streptomyces griseus* представляются наиболее перспективными для эффективной гидролитической деградации токсинов микроводорослей с пептидной структурой.

Моделирование взаимодействий БЦ и полимеров (полимолочной кислоты (ПМК) или поливинилового спирта (ПВС)) для предсказания структурных и функциональных особенностей поведения их смесей проводилось в рамках мезоскопического метода диссипативной динамики частиц (ДДЧ) [7,8]. Для начала с использованием литературных значений параметров растворимости Хансена (δ) были рассчитаны параметры Флори-Хаггинса (χ) для композитов БЦ/ПВС и БЦ/ПМК. Параметр χ характеризует свободную энергию смешивания компонентов: чем ниже значение χ, тем выше термодинамическое сродство между полимерами. (Таблица 1).

Таблица 1. Значения отдельных компонентов параметров растворимости Хансена: δ_d (дисперсионный), δ_p (поляризационный), и δ_h (водородных связей) исследованных полимеров и рассчитанные значения параметра Флори–Хаггинса (χ).

Полимер	δ_d, МПа^{0,5}	δ_p, МПа^{0,5}	δ_h, МПа^{0,5}	χ
БЦ	8.3	8.0	13.9	-
ПМК	17	8.3	28.4	3.93
ПВС	15	17.2	17.8	1.75

Далее в рамках метода ДДЧ было рассмотрено взаимодействие БЦ с ПМК или ПВС в водной среде в зависимости от степени их совместимости. Было показано, что с увеличением совместимости между БЦ и полимерами увеличивается площадь контакта между двумя фазами. Система БЦ/ПВС продемонстрировала однородное распределение, указывающее на сильное межмолекулярное взаимодействие. В системе БЦ/ПМК, наоборот, наблюдалось частичное фазовое расслоение полимеров, что свидетельствует об их ограниченной совместимости.

Таким образом, в результате проведенного *in silico* исследования было выявлено, что разработка биокаталитических систем на основе протеолитических ферментов из клеток *Streptomyces griseus* и композитов БЦ/ПВС является наиболее целесообразным для эффективной детоксификации водных сред, содержащих пептидные токсины микроводорослей.

Исследование было выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 25-44-01003).

Список литературы

1. Zingone, A., Escalera, L., Aligizaki, K., Fernández-Tejedor, M., Ismael, A., Montresor, M., Mozetič, P., Taş, S., Totti, C. Toxic marine microalgae and noxious blooms in the Mediterranean Sea: A contribution to the Global HAB Status Report //Harmful algae. – 2021. – Vol. 102. – P. 101843.

2. World Health Organization et al. Management of cyanobacteria in drinking-water supplies: Information for regulators and water suppliers. – 2024.

3. Mohamed Z., Alamri S., Hashem M. Simultaneous biodegradation of harmful Cylindrospermopsis raciborskii and cylindrospermopsin toxin in batch culture by single Bacillus strain //Environmental Science and Pollution Research. – 2022. – Vol. 29. – No. 4. – P. 5153-5161.
4. Kordahi M. A., Ayoub G. M., Zayyat R. M. A critical review of current research on cyanobacterial cells and associated toxins in aquatic environments: Occurrence, impact, and treatment methods //Journal of Environmental Chemical Engineering. – 2024. – Vol. 12. – No. 5. – P. 113931.
5. Moon R. J. et al. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites //Chemical society reviews. – 2011. – Vol. 40. – No. 7. – P. 3941-3994.
6. Li Z., Xia W. Coarse-grained modeling of nanocellulose network towards understanding the mechanical performance //Extreme Mechanics Letters. – 2020. – Vol. 40. – P. 100942.
7. Venkatram, S., Kim, C., Chandrasekaran, A., Ramprasad, R. Critical assessment of the Hildebrand and Hansen solubility parameters for polymers //Journal of chemical information and modeling. – 2019. – Vol. 59. – No. 10. – P. 4188-4194.
8. Procházka, K., Limpouchová, Z., Štěpánek, M., Šindelka, K., Lísal, M. DPD modelling of the self-and co-assembly of polymers and polyelectrolytes in aqueous media: Impact on polymer science //Polymers. – 2022. – Vol. 14. – No. 3. – P. 404.

УДК 577.152.1

ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ ДРОЖЖЕЙ: ОТ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО РАЗНООБРАЗИЯ К БИОАНАЛИТИКЕ И БИОКАТАЛИЗУ

Атрошенко Д.Л.[1,2,3], Шеломов М.Д.[1], Сергеев Е.П.[1,2], Власова М.А.[1], Чубарь Т.А.[1], Савин С.С.[1]

[1] Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
[2] ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва, РФ
[3] Российский университет дружбы народов, г. Москва, РФ
atrdenis@gmail.com

Аннотация. В работе рассмотрены два направления прикладного использования оксидаз D-аминокислот: биоаналитическая детекция D-аминокислот и биокаталитическая конверсия цефалоспорина С. Показано, что дрожжевая OpaDAAO1 из *Ogataea parapolymorpha* является перспективным ферментом для определения D-аминокислот благодаря высокой каталитической активности в отношении D-Ala и широкому спектру субстратной специфичности. Также был получен и иммобилизован многоточечный мутант TvDAAO из *Trigonopsis variabilis* с повышенной активностью, термостабильностью и устойчивостью к H_2O_2, пригодный для многократной биоконверсии цефалоспорина С.

Ключевые слова: оксидаза D-аминокислот, D-аланин, цефалоспорин С, биоаналитика.

Оксидазы D-аминокислот (DAAO, EC 1.4.3.3) являются FAD-зависимыми ферментами, катализирующими окислительное дезаминирование D-аминокислот с образованием соответствующих 2-оксокислот, аммиака и пероксида водорода. Благодаря высокой энантиоселективности и образованию H_2O_2 эти ферменты представляют интерес как для создания биоаналитических систем определения D-аминокислот [1], так и для препаративного биокатализа, включая биотрансформацию β-лактамных антибиотиков.

Целью работы было изучение функционального разнообразия DAAO-подобных ферментов дрожжей *Ogataea parapolymorpha* DL-1, оценка возможности использования OpaDAAO1 для детекции D-аминокислот, а также создание эффективного и стабильного биокатализатора на основе мутантной DAAO из *Trigonopsis variabilis* для конверсии цефалоспорина С.

В геноме *O. parapolymorpha* с использованием биоинформатических подходов были выявлены шесть DAAO-подобных ферментов: OpaDAAO1–OpaDAAO5 и OpaDASPO [2]. Рекомбинантные ферменты были получены в клетках E. coli и охарактеризованы по субстратной специфичности, pH-профилям активности и стабильности. Показано, что ферменты OpaDAAO обладают выраженной функциональной дивергенцией: отдельные представители семейства различаются по предпочтительным субстратам и каталитической эффективности. Среди них OpaDAAO1 представляет особый интерес для биоаналитического применения, поскольку сочетает высокую активность в отношении D-Ala с достаточно широким спектром субстратной специфичности.

В работе была проведена оценка возможности использования OpaDAAO1 в качестве ферментного компонента системы детекции D-аминокислот. OpaDAAO1 обладает одной из наиболее высоких известных каталитических констант в реакции с D-Ala, который является одним из основных маркеров D-аминокислот в биологических и пищевых образцах. При этом фермент окисляет большинство исследованных D-аминокислот, что позволяет рассматривать его не только для определения D-Ala, но и как перспективную основу для оценки суммарного содержания D-аминокислот.

Для биоаналитического применения была использована реакция OpaDAAO1 в сочетании с пероксидазной системой детекции H_2O_2. Такой подход позволяет переводить окисление D-аминокислот в оптический или флуоресцентный сигнал и потенциально может быть использован для экспресс-

анализа D-аминокислот в пищевых и биологических образцах. Таким образом, OpaDAAO1 может рассматриваться как ферментная основа для разработки чувствительных методов определения как отдельных маркерных D-аминокислот, так и их общего уровня.

Параллельно была проведена инженерия DAAO из *T. variabilis* — фермента, традиционно рассматриваемого как один из перспективных биокатализаторов для окислительной дезаминации цефалоспорина С [3]. Полученный многоточечный мутантный вариант TvDAAO E32R/F33D/F54S/C108F/M156L/C298N обладал улучшенными прикладными свойствами: каталитическая константа в реакции с цефалоспорином С была увеличена примерно в 4 раза, устойчивость к окислительной инактивации H_2O_2 — примерно в 8 раз, а термостабильность — примерно в 20 раз по сравнению с ферментом дикого типа. Для повышения эксплуатационной стабильности фермент был иммобилизован на анионообменном носителе Sepabeads EC-QA. Полученный иммобилизованный препарат мутантной TvDAAO сохранял высокую операционную активность в условиях повторного использования и обеспечивал не менее 95% конверсии цефалоспорина С в течение 10 последовательных циклов использования.

Таким образом, работа демонстрирует два взаимодополняющих направления использования DAAO. С одной стороны, поиск и характеристика новых дрожжевых ферментов OpaDAAO раскрывают ранее недооцененное функциональное разнообразие DAAO-подобных оксидаз и создают основу для разработки новых биоаналитических систем определения D-аминокислот. С другой стороны, направленная инженерия и иммобилизация TvDAAO позволяют получить устойчивый иммобилизованный биокатализатор для препаративной биотрансформации цефалоспорина С. Совокупно эти результаты показывают, что DAAO являются перспективной ферментной платформой как для чувствительной детекции D-аминокислот, так и для промышленно значимого биокатализа.

Список литературы

1. Atroshenko D.L., Savin S.S., Oretskaya T.S., Tishkov V.I. Application of D-Amino Acid Oxidase (DAAO) in Bioanalytics // Biochemistry (Moscow). – 2026. – Vol. 91. – Suppl. 1. – P. S84–S97. – doi: 10.1134/S0006297925604393.

2. Atroshenko D.L., Golovina D.I., Sergeev E.P., Shelomov M.D., Elcheninov A.G., Kublanov I.V., Chubar T.A., Pometun A.A., Savin S.S., Tishkov V.I. Bioinformatics-Structural Approach to the Search for New D-Amino Acid Oxidases // Acta Naturae. – 2022. – Vol. 14. – No. 4. – P. 57–68. – doi: 10.32607/actanaturae.11812.

3. Atroshenko D.L., Shelomov M.D., Zarubina S.A., Negru N.Y., Golubev I.V., Savin S.S., Tishkov V.I. Multipoint TvDAAO Mutants for Cephalosporin C Bioconversion // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – Vol. 20. – No. 18. – Art. 4412. – doi: 10.3390/ijms20184412.

УДК 577.15

ПОИСК И ХАРАКТЕРИСТИКА АЛЬТЕРНАТИВНЫХ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗ *MYCOBACTERIUM SMEGMATIS*, КОМПЕНСИРУЮЩИХ ПОТЕРЮ CPMTA ПРИ МЕТИЛИРОВАНИИ КОПРОПОРФИРИНА

Багаева Д.И., Демина Г.Р., Агафонов М.О., Савицкий А.П., Капрельянц А.С., Шлеева М.О.

ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва, РФ
bagaeva115@mail.ru

Аннотация. У микобактерий переход в покоящееся состояние сопровождается образованием тетраметилового эфира копропорфирина (ТМК) с помощью метилтрансферазы CPmtA. Делеция гена этого фермента не приводит к отсутствию данного метаболита. Поиск гомологов с помощью BLAST и последующая экспрессия рекомбинантных белков в *E. coli* подтвердили наличие альтернативных метилтрансфераз.

Ключевые слова: метилтрансферазы, *Mycobacterium smegmatis*, копропорфирин.

У микобактерий переход в покоящееся состояние сопровождается синтезом тетраметилового эфира копропорфирина (ТМК), который катализируется метилтрансферазой MSMEG_0614 (CPmtA) из *Mycobacterium smegmatis* [1]. Ранее предполагалось, что CPmtA является единственным ферментом этого метаболического пути.

Для проверки этой гипотезы нами был сконструирован мутантный штамм *M. smegmatis* с делецией гена MSMEG_0614 методом двухэтапного аллельного обмена [2]. Анализ содержания порфиринов в клетках мутантного штамма методом ВЭЖХ не выявил полного отсутствия ТМК. Так, в оптимальных условиях роста штамм с делецией MSMEG_0614 показал статистически значимое снижение уровня ТМК по сравнению с контрольным штаммом (в 2,5 раза), однако ТМК оставался детектируемым. При этом в условиях перехода в состояние покоя разница в уровнях ТМК между двумя штаммами была несущественной. Этот неожиданный результат свидетельствовал о существовании у микобактерий альтернативных ферментов с перекрывающейся функцией.

Для идентификации гомологичных ферментов был проведен поиск генов в геноме *M. smegmatis* с помощью программы BLAST. В результате было выявлено несколько генов с уровнем гомологии более 45%. Соответствующие гены были амплифицированы и экспрессированы в гетерологичной системе *E. coli* BL21 (DE3). Далее была проведена оценка способности лизатов рекомбинантных штаммов *E. coli* метилировать копропорфирин III с последующим анализом продуктов реакции методом ВЭЖХ. Результаты показали, что обнаруженные гомологи CPmtA (MSMEG_1480, MSMEG_1482, MSMEG_1888) также способны метилировать копропорфирин III с образованием ТМК.

Таким образом, отсутствие полной потери ТМК у мутанта с делецией гена *CPmtA* убедительно демонстрирует о наличии у *M. smegmatis* альтернативных ферментов с перекрывающейся функцией. Обнаруженные гомологи CPmtA компенсируют потерю основного фермента, что открывает новые перспективы для изучения регуляции метаболизма порфиринов в покоящихся клетках микобактерий.

Работа поддержана грантом РНФ № 24-15-00221.

Список литературы

1. Bagaeva D.I., Demina G.R., Panina I.S., Krylov N.A., Khrenova M.G., Agaphonov M.O., Savitsky A.P., Efremov R.G., Kaprelyants A.S., Shleeva M.O. Methyltransferase CPmtA drives dormancy-associated synthesis of coproporphyrin III tetramethyl ether via a “carousel” mechanism in *Mycobacterium smegmatis* // International Journal of Biological Macromolecules. – 2026. – Vol. 358. – P. 151714.

2. Parish T., Stoker, N. G. Use of a flexible cassette method to generate a double unmarked *Mycobacterium tuberculosis* tlyA plcABC mutant by gene replacement // Microbiology (Reading, England). – 2000. – Vol. 146 (Pt. 8). – P. 1969-1975.

УДК 577.122.2

ПОИСК СОЕДИНЕНИЙ, МОДУЛИРУЮЩИХ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ ПУТИ, НАРУШЕННЫЕ ПРИ ЭКСПРЕССИИ ХАНТИНГТИНА В МОДЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ N2A

Бачева А.В., Готманова Н.Н., Абдуллина В.Р., Райкова О.А.

Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
bachevaav@my.msu.ru

Аннотация. В докладе представлена информация об исследовании действия различных природных соединений на активность выделенной протеасомы, на состояние клеток Neuro2a, как нативных, так и генно-модифицированных для экспрессии нормального либо склонного к агрегации мутантного белка хантингтина. Показано улучшение внутриклеточного метаболизма в присутствии некоторых полифенолов в низких концентрациях.

Ключевые слова: протеолиз, полифенолы, болезнь Хантингтона, активность, клеточный метаболизм.

Поиску нейропротекторных соединений посвящено множество работ за последние десятилетия [1]. Особое внимание уделяется полифенолам [2, 3], олигосахаридам [4] и их производным [5], тритерпеновым [6] и желчным кислотам [7], изохинолиновым алкалоидам [8] а также сульфорафану [9, 10] и креатину [11]. Большинство исследований заключается в проверке действий единичных конкретных соединений либо в изучении действия нескольких соединений на конкретный молекулярный механизм, в то время как многие нейропатологии, относящиеся к протеинопатиям, характеризуются разнообразными нарушениями клеточного метаболизма. Для быстрого первичного скрининга наборов или библиотек соединений требуется относительно простая клеточная модель и отработанные методики проверки действия соединений на разные внутриклеточные пути.

Нами разработана новая клеточная модель болезни Хантингтона (БХ) на основе нейробластомы Neuro2a со стабильной экспрессией полноразмерных форм нормального или мутантного хантингтина (N2a-HttQ15/Q138) [12]. В данной работе мы изучили влияние группы соединений на выживаемость, состояние систем протеолиза, и на уровень окислительного стресса в клетках Neuro2a, экспрессирующих нативный или мутантный хантингтин. В группу соединений входили более 10 природных веществ различных классов. Для первоначального тестирования действия соединений на протеолиз использовали 20S протеасому, выделенную из печени мыши. Рассчитаны эффективные концентрации EC50 действия этих веществ на 20S протеасому. Далее некоторые из выбранных соединений тестировались на нативных либо модельных клетках Neuro2a. На клетках N2a-HttQ15/Q138 была проведена оценка выживаемости клеток в отсутствии и присутствии веществ с помощью МТТ-теста. Также оценивалось изменение внутриклеточной каспазо-, трипсин- и химотрипсин-подобной активности протеасомы с помощью пептидных субстратов (Z-LLE-AMC, Ac-RLR-AMC, Suc-LLVY-AMC, соответственно). Оценено накопление агрегатов белка хантингтина в клетках и исследовано состояние системы аутофагии по изменению содержания белка LC3 методом Вестерн-блот. Показано, что дигидрокверцетин по-разному действует на разные типы активности протеасомы и способствует увеличению количества белка LC3. Трегалоза активирует трипсино- и каспазо-подобную активность протеасомы и приводит к росту количества LC3, но заметно усиливает окислительный стресс. Арбутин и дигидрокверцетин способствуют активации процессов аутофагии в клетках N2a-HttQ138, а также снижают уровень окислительного стресса. Арбутин является ингибитором всех трех типов активности очищенной протеасомы, при этом в низких концентрациях усиливает внутриклеточную пептидазную активность, способствует увеличению количества белка LC3 и уменьшению количества агрегатов мутантного хантингтина и является перспективным агентом для терапии болезни Хантингтона.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 25-24-00260.

Список литературы

1. Bagli E., Goussia A., Moschos M.M., Agnantis N., Kitsos G. Natural Compounds and Neuroprotection: Mechanisms of Action and Novel Delivery Systems // In Vivo. – 2016. – Vol. 30. – P. 535–548.
2. Grabska-Kobyłecka I., Szpakowski P., Król A., et al. Polyphenols and their impact on the prevention of neurodegenerative diseases and development // Nutrients. – 2023. – Vol. 15. – No. 15. – Art. e3454.
3. Dajas F., Abin-Carriquiry J.A., Arredondo F., et al. Quercetin in brain diseases: Potential and limits // Neurochemistry International. – 2015. – Vol. 89. – P. 140-148.
4. Sevriev B, Dimitrova S, Kehayova G, Dragomanova S. Trehalose: Neuroprotective Effects and Mechanisms - An Updated Review // NeuroSci. – 2024 – Vol. 5. – No. 4. – P. 429-444.
5. Zhou L., Tan F., Zhang X., Yanhua L., Yin W. Neuroprotection and mechanisms of ginsenosides in nervous system diseases: Progress and perspectives // IUBMB Life. – 2024. – Vol. 76. – No. 11. – P. 862-882.
6. Prados M.E., Correa-Sáez A., Unciti-Broceta J. D., et al. Betulinic acid hydroxamate is neuroprotective and induces protein phosphatase 2a-dependent hif-1α stabilization and post-transcriptional dephosphorylation of prolyl hydrolase 2 // Neurotherapeutics. – 2021. – Vol. 18. – No. 3. – P. 1849-1861.
7. Wang L., Yijiao L., Fei W., Jincheng G., Lin L., Baohua H. Tauroursodeoxycholic acid exerts neuroprotective effects in epilepsy via suppression of ferroptosis // Journal of Integrative Neuroscience. – 2026 – Vol. 25. – No. 1. – Art. E47186.
8. Begh M. Z. A., Amin M. A., Shatu M. M., et al. Unraveling Berberine's Molecular Mechanisms in Neuroprotection Against Neurodegeneration // Chemistry and Biodiversity. – 2025 – Art. e202500170.
9. Otoo R. A., Allen A. R. Sulforaphane's multifaceted potential: From neuroprotection to anticancer action // Molecules. – 2023 – Vol. 28. – No. 19. – Art. e6902.
10. Wu N., Zepeng L., Renfu D., et al. Sulforaphane: An emerging star in neuroprotection and neurological disease prevention // Biochemical Pharmacology. – 2025 – Art. e116797.
11. Avgerinos K.I., Spyrou N., Bougioukas K.I., Kapogiannis D. Effects of creatine supplementation on cognitive function of healthy individuals: A systematic review of randomized controlled trials // Experimental Gerontology. – 2018. – Vol. 108. – P. 166-173.
12. Gotmanova N.N., Bobik T.V., Ezhov A.A., et al. Neuronal cell line expressing full-length mutant huntingtin displays alteration of proteasome activity // BioRxiv. – 2026. – 699723. doi: 10.64898/2026.01.15.699723

УДК 543.94

ОПРЕДЕЛЕНИЕ 5-ГИДРОКСИИНДОЛ-3-УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ КАК БИОМАРКЕРА НЕЙРОЭНДОКРИННЫХ ОПУХОЛЕЙ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИМИ БИОСЕНСОРАМИ

Бейлинсон Р.М., Лопатко Н.Ю., Перескокова Е.В., Медянцева Э.П., Улахович Н.А.

Казанский федеральный (Приволжский) университет,
Химический институт им. А.М.Бутлерова, г.Казань, Россия
rvarlamo@mail.com

Аннотация: Разработаны новые амперометрические тирозиназные биосенсоры на основе печатных графитовых электродов модифицированные углеродными наноматериалами, а также нанокомпозитами на их основе с наночастицами золота для определения 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ГИУК). Установлено, что 5-ГИУК оказывает влияние на активность тирозиназы в концентрационном диапазоне от 1×10^{-11} до 1×10^{-6} М, с нижней границей определяемых концентраций 5×10^{-12} М. Предложенные биосенсоры апробированы для определения 5-ГИУК в урине предположительно здорового человека.

Ключевые слова: 5-ГИУК, тирозиназный биосенсор, многостенные углеродные нанотрубки, восстановленный оксид графена, наночастицы золота.

5-ГИУК - основной метаболит серотонина, а также маркер нейроэндокринных опухолей, которые объединяют группу довольно редких эпителиальных новообразований, но при этом представляют повышенную опасность, поскольку прогрессируют такие опухоли зачастую бессимптомно, и частота их выявления и распространенность постоянно увеличиваются на протяжении последних десятилетий. Нейроэндокринные опухоли развиваются в клетках эндокринной системы в различных частях организма, но наиболее распространенными областями локализации являются органы желудочно-кишечного тракта, поджелудочной железы и легких. Таким образом, увеличение содержания мочевой 5-ГИУК сигнализирует о раковых процессах, а значительное снижение этого параметра в спинномозговой жидкости коррелирует с такими психическими заболеваниями, как депрессия, болезнь Альцгеймера и даже склонность к суициду. В настоящее время значительное внимание уделяется разработке сенсорных устройств, которые позволяют проводить экспрессное определение маркеров заболеваний в полевых условиях и не требуют высококвалифицированного персонала [1].

Целью работы является разработка амперометрических тирозиназных биосенсоров, модифицированных различными структурированными наноматериалами и композитами на их основе для оценки содержания 5-ГИУК в биологических жидкостях.

Основой предлагаемых нами биосенсоров служила конструкция электродов «3 в 1», полученные на полимерной подложке методом печатных технологий [2]. В качестве модификаторов использовали восстановленный оксид графена (ВОГ), многостенные углеродные нанотрубки (МУНТ) и нанокомпозиты с этими углеродными наноматериалами и наночастицами золота (НЧ Au).

Из литературных данных известно, что в присутствии фермента тирозиназы фенол подвергается окислению, в результате чего через промежуточный продукт (гидрохинон) образуется о-бензохинон при потенциале 300 мВ. В области 650 мВ наблюдается дополнительный пик, который можно отнести к процессу окисления фенола до о-хинона. Поскольку этот пик хорошо выражен, именно его использовали в качестве аналитического сигнала [2].

Изучение действия 5-ГИУК на биочувствительную часть амперометрического биосенсора показало, что в ее присутствии наблюдается уменьшение аналитического сигнала в диапазоне концентраций от 1×10^{-9} - 1×10^{-6} моль/л. Максимальная степень ингибирования при действии на фермент – субстратную систему фенол-тирозиназа составляет для 5-ГИУК 75.0 % в изученной области концентрации (табл 1).

Таблица 1. Аналитические характеристики определения 5-ГИУК биосенсорами на основе тирозиназы (n=5, P=0.95)

Область рабочих концентраций, моль/л	Уравнение градуировочной зависимости, $I^* = (A \pm \delta) \times (-\lg C) + (B \pm \delta)$			$c_н$, моль/л
	$(A \pm \delta)$	$(B \pm \delta)$	R	
Тирозиназный биосенсор				
1×10^{-9} - 1×10^{-6}	-10.2±0.7	132±5	0.8783	6×10^{-10}
Тирозиназный биосенсор, модифицированный МУНТ и НЧ Au				
1×10^{-11} - 1×10^{-6}	-13.5±0.3	166±5	0.9784	3×10^{-12}
Тирозиназный биосенсор, модифицированный ВОГ и НЧ Au				
1×10^{-11} - 1×10^{-6}	-17.3±0.4	200±7	0.9663	2×10^{-12}

$I^{*=}(I_p/I_o)\times100$, где I_p – ток в присутствии ингибитора, I_o – ток в отсутствии ингибитора.

Одним из направлений развития биосенсорных технологий является использование наноструктурированных углеродных материалов в качестве модификаторов поверхности электродов, а также различных металлических наночастиц, что позволяет улучшить их аналитические возможности. В данной работе мы использовали МУНТ, ВОГ и НЧ Au.

Изучение действия 5-ГИУК на модифицированные углеродными наноматериалами биосенсоры показало, что в этом случае наблюдается эффект активации, вероятно, вследствие изменения морфологии поверхности электрода, область рабочих концентраций при этом составила 1×10^{-10} - 1×10^{-6} моль/л,. При исследовании действия 5-ГИУК на биосенсоры, модифицированные нанокомпозитами с наночастицами золота наблюдаются процессы ингибирования, при этом диапазон определяемых концентраций увеличился от 1×10^{-11} до 1×10^{-6} моль/л, снизилась нижняя граница определяемых концентраций, а также улучшился коэффициент чувствительности (табл.1).

Изучение кинетических параметров при действии 5-ГИУК на каталитическую активность тирозиназы является ключевым шагом для понимания взаимодействия эффектора с иммобилизованным ферментом на поверхности биосенсора.

Результаты кинетических исследований изменения каталитической активности иммобилизованного фермента в присутствии 5-ГИУК представлены в таблице 2.

Таблица 2. Кинетические параметры реакции тирозиназного превращения фенола в присутствии 5-ГИУК, С фенола = 1×10^{-3}, pH = 9.0, n= 3.

Концентрация 5-ГИУК, моль/л	$K_m\times10^5$, моль/л	$V_{max}\times10^3$, моль/л×с	Соотношение параметров K_m и V_{max}	Тип процесса	K_i моль$^{-1}$/ K_a моль$^{-1}$
Тирозиназный биосенсор					
10^{-6}	3.1±0.2 3.4±0.3	7.7±0.4 7.5±0.3	$K'_m > K_m$ $V'_{max} < V_{max}$	Двухпараметрически согласованное ингибирование	(7.5±0.6) $\times10^{-6}$
Тирозиназный биосенсор (модификация УНТ)					

10^{-8}	8.4±0.4 2.7±0.3	2.8±0.3 5.6±0.4	$K'_m < K_m$ $V'_{max} > V_{max}$	Двухпараметрическая согласованная активация	(1.9±0.7) $\times 10^{-9}$
Тирозиназный биосенсор (модификация ВОГ)					
10^{-6}	1.1±0.1 2.1±0.2	1.1±0.2 2.0±0.3	$K'_m > K_m$ $V'_{max} > V_{max}$	Двухпараметрическая рассогласованная активация	(3.3±0.4) $\times 10^{-9}$
Тирозиназный биосенсор (модификация УНТ и НЧ Au)					
10^{-8}	2.4±0.3 1.4±0.2	3.2±0.2 2.1±0.1	$K'_m < K_m$ $V'_{max} < V_{max}$	Двухпараметрически рассогласованное ингибирование	(2.3±0.2) $\times 10^{-9}$
Тирозиназный биосенсор (модификация ВОГ и НЧ Au)					
10^{-6}	1.6±0.2 6.7±0.3	5.4±0.4 2.6±0.3	$K'_m > K_m$ $V'_{max} < V_{max}$	Двухпараметрически согласованное ингибирование	(1.3±0.3) $\times 10^{-7}$

Разработанные биосенсоры были использованы для определения 5-ГИУК в урине взрослого предположительно здорового человека. Определено, что в рабочей области потенциалов компоненты мочи не проявляют электрохимической активности. Так как диапазон определяемых концентраций составляет 10^{-11}-10^{-6} М, то для работы с образцом урины с более высоким содержанием 5 ГИУК, необходимо было разбавить образец урины в 1000 раз. Определенная нами концентрация 5-ГИУК в моче взрослого предположительно здорового человека с помощью амперометрического тирозиназного биосенсора модифицированным нанокомпозитом ВОГ/НЧ Au, составила (1.16±0.02) $\times 10^{-2}$ М, что соответствует норме.

Список литературы

1. Делекторская, В. В. Нейроэндокринные опухоли пищеварительной системы: морфологические и молекулярные особенности // Успехи молекулярной онкологии. - 2015. - №1. URL: https://cyberleninka.ru/article/n/neyroendokrinnye-opuholi-pischevaritelnoy-sistemy-morfologicheskiei-molekulyarnye-osobennosti (дата обращения: 25.10.2024).

2. Лопатко Н.Ю. Определение плесневого гриба Aspergillus niger амперометрическими тирозиназными биосенсорами модифицированными наноматериалами в биомедицинских объектах и сельскохозяйственной продукции / Н.Ю. Лопатко, Р.М. Бейлинсон, О.Е. Малоземова, Е.В. Халдеева, Н.А. Улахович // Заводская лаборатория. Диагностика материалов.-2026.-Т.92.-№2. DOI: https://doi.org/10.26896/1028-6861-2026-92-2-5-11

УДК 577.325.2:616-074

ЭСТЕРАЗНЫЙ ПРОФИЛЬ: СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Белинская Д.А.[1], **Гончаров Н.В.** [1,2]

[1] *ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, РФ*

[2] *Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, РФ*

daria.belinskaya@iephb.ru

Аннотация. В докладе представлена информация о структурно-функциональных особенностях эстераз крови человека и их диагностическом потенциале. Обоснована перспективность интегральной оценки эстеразного профиля по сравнению с анализом уровня и активности отдельных эстераз. Приведены результаты собственных исследований, демонстрирующие диагностическую значимость эстеразного профиля для прогноза летального исхода при COVID-19 и оценки тяжести хронической органофосфатной патологии.

Ключевые слова: эстеразы, субстратная специфичность, ферментный промискуитет, диагностика.

Эстеразный профиль – это набор белков плазмы крови, обладающих эстеразной активностью. Смежное понятие – эстеразный статус – это совокупность эстеразной активности плазмы, форменных элементов крови, эндотелия и других клеток организма в соответствии с его генетическими и эпигенетическими особенностями. Впервые понятие эстеразного статуса было предложено группой Г.Ф. Махаевой в 2004 году [1]. Кровь является средой для многих биологически активных соединений, субстратов и продуктов метаболизма, и в наибольшей степени отражает изменения, происходящие в организме, поэтому эстеразный профиль может претендовать на роль одного из диагностических маркеров.

Эстеразы крови принадлежат к нескольким эволюционно не связанным структурным семействам, что обусловливает различия в субстратной специфичности, механизмах катализа и чувствительности к ингибиторам. Холинэстеразы (ChE) ацетилхолинэстераза (AChE) и бутирилхолинэстераза (BChE) – классические представители суперсемейства α/β-гидролаз с каталитической триадой Ser-His-Glu. Один ген AChE кодирует три белка, два из которых являются мажорными: тетрамерный белок нейрональных и нейромышечных синапсов и заякоренный в мембране эритроцитов димер [2]. Основная функция синаптической AChE – гидролиз ацетилхолина и, как следствие, прекращение передачи нервного импульса, тогда как функции AChE эритроцитов все еще малопонятны. BChE циркулирует в плазме в высокой концентрации (≈5 мг/л) и демонстрирует широкую субстратную специфичность. Одним из эндогенных субстратов BChE является октаноил-грелин, также BChE может участвовать в гидролизе липидов [3]. Карбоксилэстеразы (CES) принадлежат к семейству α/β-гидролаз, но имеют более крупный по сравнению с ChE активный центр. В плазме человека концентрация CES крайне низка (≈0.5 мг/л), что существенно отличает человека от грызунов, у которых уровень CES в крови на два порядка выше. Характерной чертой CES является ярко выраженный промискуитет, т.е. очень широкая субстратная специфичность [4].

Параоксоназа 1 (PON1) – представитель семейства шестилопастных β-пропеллерных гидролаз. Ее активность зависит от двух ионов Ca^{2+}, а каталитическая диада His-His обеспечивает гидролиз лактонов, арилэфиров и органофосфатов. PON1 циркулирует в составе ЛПВП, ее концентрация в плазме человека составляет примерно 50 мг/л. Основная физиологическая функция PON1 – гидролиз эндогенных лактонов, тогда как параоксоназная активность фермента является промискуитетной [5]. Нейротоксическая эстераза (NTE) идентифицирована как пататин-подобная фосфолипаза PNPLA6 с каталитической диадой Ser-Asp. Она локализована в эндоплазматическом ретикулуме многих клеток, среди которых нейроны, лимфоциты, тромбоциты и эндотелиальные клетки. Ее основная функция – гидролиз фосфатидилхолина и лизофосфатидилхолина, что важно для поддержания липидного гомеоста-

за мембран и целостности аксонов. PNPLA6, действуя как фосфолипаза B, регулирует мобилизацию холина из фосфатидилхолина и последующий оборот холина для регенерации фосфатидилхолина в клетках пигментного эпителия сетчатки [6]. Карбоангидраза (CA) – цинксодержащая внутриклеточная лиаза, обладающая промискуитетной эстеразной активностью в отношении нитрофенилацетата и кумаринов. В эритроцитах она представлена изоформами CAI и CAII, причем CAII обеспечивает до 95% общей активности [7].

Сывороточный альбумин человека (HSA) – мажорный белок плазмы (40–50 г/л), который наряду со связывающей функцией обладает также гидролитической активностью. Псевдоэстеразная активность реализуется в сайте Sudlow II и представляет собой необратимое ацилирование Tyr411, сопровождающееся выходом в раствор одного продукта гидролиза. Этот процесс носит стехиометрический характер: ацилирование Tyr411 происходит в течение первых минут инкубации с субстратом, тогда как последующее деацилирование крайне медленно (период полуоборота около 60 часов) и не может считаться каталитическим [8]. Истинно эстеразная активность альбумина, в отличие от псевдоэстеразной, предполагает образование фермент-субстратного комплекса с последующим распадом на исходный белок и продукты реакции. Результаты наших спектроскопических и вычислительных экспериментов указывают на то, что за этот тип активности отвечает сайт Sudlow I, где каталитическим остатком выступает Tyr150, а His242 выполняет функцию оксианионного центра [9–11]. Удельная активность альбумина по отношению к нитрофенилацетату и органофосфатам значительно ниже, чем у холинэстераз, однако его высокая концентрация в плазме (на 4 порядка превышающая уровень BChE) делает этот белок полноценным компонентом эстеразного профиля.

За последние годы сформирована обширная доказательная база, свидетельствующая о диагностическом и прогностическом потенциале показателей активности эстераз плазмы крови. Однако исследования, посвященные поиску новых диагностических маркеров, как правило, фокусируются на отдельных ферментах (чаще на BChE или PON1) в контексте конкретных заболеваний. Комплексный одновременный анализ активности и концентрации ключевых эстераз плазмы для получения интегрального «эстеразного профиля» пациента практически еще никем не проводился. Недооценен вклад альбумина в эстеразную активность плазмы, отсутствуют стандартизованные и доступные для рутинной клинической лаборатории методы определения активности каждого компонента эстеразного профиля, не разработаны алгоритмы интерпретации сочетанных изменений в эстеразном профиле.

В наших пилотных исследованиях оценена взаимосвязь эстеразного профиля плазмы с биохимическими показателями у выживших и умерших пациентов с COVID-19. Значимые отличия между группами выявлены для альбумина, мочевины, тропонина, прокальцитонина, фактора Виллебранда, креатинкиназы (CK) и BChE. Уровень альбумина у выживших и умерших был ниже соответственно на 18 и 27% относительно контроля, что подчеркивает его решающую роль в исходе заболевания. Не выявлено значимых отличий концентрации CRP, активности альбумина и PON1. Расчет диагностических индексов показал, что наиболее простой индекс [Urea]×10/[ALB] обладает высокой дискриминационной способностью (AUC=0.94). Индекс (CK×[Urea])/[ALB] обладает максимальной прогностической значимостью (OR = 144). Важно, что предлагаемые индексы доступны для лабораторий с минимальным оснащением. Что касается патологий неинфекционной природы, в нашем исследовании пациентов с хронической профпатологией (ПП), обусловленной воздействием органофосфатов, выявлено снижение активности BChE и повышение эстеразной активности альбумина на 29% при нормальной концентрации белка. Корреляционный анализ показал взаимосвязь между истинно эстеразной активностью альбумина в сайте Sudlow I и уровнем арахидоновой кислоты. Полученные данные позволяют предположить, что у пациентов с ПП важнейшим цитотоксическим фактором для эндотелия являются неэтерифицированные жирные кислоты.

В совокупности представленные данные указывают на перспективность перехода от оценки отдельных эстераз к интегральному анализу эстеразного профиля как функционального мультимаркерного инструмента, способного повысить точность диагностики, стратификации риска и прогноза развития различных патологических состояний. Эволюция методов машинного обучения и анализа больших данных открывает реальную возможность для обработки многомерной информации эстеразного профиля.

Работа выполнена в рамках Госзадания ИЭФБ РАН № 075-00264-26-00

Список литературы

1. Соколовская Л.Г. и соавт. Семейство биосенсорных анализаторов для оценки «эстеразного статуса» организма // Химическая и биологическая безопасность. – 2004. – № 1-2 (13-14). – С. 21–31
2. Rachinsky T.L., Camp S., Li Y., Ekström T.J., Newton M., Taylor P. Molecular cloning of mouse acetylcholinesterase: tissue distribution of alternatively spliced mRNA species // Neuron. – 1990. – Vol. 5. – No. 3. – P. 317–327.
3. Gok M. et al. Butyrylcholinesterase in lipid metabolism: A new outlook // J Neurochem. – 2024. – Vol. 168. – No. 4. – P. 381–385.
4. Satoh T., Hosokawa M. Structure, function and regulation of carboxylesterases // Chem Biol Interact. – 2006. – Vol. 162. – No. 3. – P. 195–211.
5. Mackness M., Mackness B. Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles // Gene. – 2015. – Vol. 567. – No. 1. – P. 12–21.
6. Ono T. et al. PNPLA6 regulates retinal homeostasis by choline through phospholipid turnover // Nat Commun. – 2025. – Vol. 16. – No. 1. – P. 2221.
7. Gould S.M., Tawfik D.S. Directed evolution of the promiscuous esterase activity of carbonic anhydrase II // Biochemistry. – 2005. – Vol. 44. – No. 14. – P. 5444–5452.
8. Lockridge O. et al. Pseudo-esterase activity of human albumin: slow turnover on tyrosine 411 and stable acetylation of 82 residues including 59 lysines // J Biol Chem. – 2008. – Vol. 283. – No. 33. – P. 22582–22590.
9. Belinskaia D.A. et al. Esterase Activity of Serum Albumin Studied by 1H NMR Spectroscopy and Molecular Modelling // Int J Mol Sci. – 2021. – Vol. 22. – No. 19. – P. 10593
10. Belinskaia D.A. et al. Modulation of Albumin Esterase Activity by Warfarin and Diazepam // Int J Mol Sci. – 2024. – Vol. 25. – No. 21. – P. 11543.
11. Belinskaia D.A. et al. Structure-Dependent Mechanism of Organophosphate Release from Albumin and Butyrylcholinesterase Adducts When Exposed to Fluoride Ion: A Comprehensive In Silico Study // Int J Mol Sci. – 2023. – Vol. 24. – No. 19. – P. 14819.

РАЗРАБОТКА ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ЗОНДОВ И МОДИФИКАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ МИКРОФЛЮИДНОГО ФОТОННО-КРИСТАЛЛИЧЕСКОГО БИОСЕНСОРА ДЛЯ ТИПИРОВАНИЯ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Беспятых Ю.А.[1], **Ширшиков Ф.В.**[1], **Сизова С.В.**[2], **Шакуров Р.И.**[2], **Басманов Д.В.**[2]

[1] *Лаборатория молекулярной медицины ЦММиД ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России*
[2] *Лаборатория прикладных биомедицинских систем ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России*

Туберкулез представляет собой инфекционное заболевание человека, возбудителем которого являются бактерии нескольких вариантов вида *Mycobacterium tuberculosis* (МТБ). Актуальной задачей для мирового здравоохранения является быстрая диагностика МТБ, позволяющая не только идентифицировать возбудителя, но и определить потенциальный спектр его лекарственной устойчивости. Большие перспективы и возможности в этом направлении открывают оптические безмаркерные биосенсоры, обладающие высокой чувствительностью и широко применяемые для изучения кинетики связывания молекул-мишеней в реальном времени. Цель исследования заключалась в оптимизации структуры поверхности микрофлюидного безмаркерного биосенсора на поверхностных оптических волнах в одномерном фотонном кристалле (ОФК) и подборе зондов-мишеней для детекции МТБ.

Поверхность ОФК предварительно модифицировалась следующим образом: предварительная отмывка водой и этанолом, обработка низкотемпературной плазмой азота (Diener, Германия), функционализация раствором (3-аминопропил)триэтоксисилана и формирование покрытия из декстранов с различными молекулярными массами и функциональными группами. Сорбционная емкость модифицированной таким образом поверхности ОФК оценивалась по модельному белку — бычьему сывороточному альбумину (0.1 мг/мл), и олигонуклеотидам.

В ходе работы предложена оригинальная методика дизайна олигонуклеотидных зондов, показавшая свою применимость при детекции одноцепочечных ДНК-мишеней в водном растворе при комнатной температуре. Наиболее эффективным с точки зрения высокой сорбционной емкости и прироста сигнала связывания ДНК-мишеней оказалось покрытие фотонного кристалла слоем высокомолекулярного эпоксидированного декстрана молекулярной массой 500 кДа. Разработанная методика модификации поверхности перспективна для дальнейшего использования в диагностических тест-системах.

УДК 577:29

БИОСЕНСОРЫ ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ ВЫСОКОРЕАКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ГАЛОГЕНОВ И СЕРЫ В МОДЕЛЯХ *IN VIVO*

Билан Д.С.[1, 2, 3]

[1] ФГБУН ГНЦ РФ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва, РФ
[2] ФГБУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий» ФМБА России, г. Москва, РФ
[3] ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, г. Москва, РФ
d.s.bilan@ibch.ru

Аннотация. В докладе представлена информация о разработках и применениях генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров для регистрации динамики активных форм галогенов и серы. Показана эффективность новых инструментов в исследованиях динамики указанных соединений в биологических системах разного уровня сложности: от клеточных органелл клеток в культуре до тканей трансгенных организмов.

Ключевые слова: флуоресценция, биосенсоры, гипогалогенные кислоты, пер/полисульфиды.

Флуоресцентные белки совершили прорыв в области визуализации биологических процессов в живых целостных системах. Доставка гена таких белков с выбором определенных типов промоторов и сигнальных последовательностей позволяет визуализировать конкретные типы клеток и даже их внутриклеточные компартменты как на уровне единичных клеток в культуре, так и в тканях трансгенных организмов. Однако флуоресцентные белки могут служить не только в качестве метки, но в качестве флуоресцентного модуля для биосенсора белковой природы. В таком биосенсоре флуоресцентный белок встроен в структуру сенсорного домена, как правило, фактора транскрипции, выполняющего роль природного сенсора определенного внутриклеточного параметра. Фактор транскрипции связывает определенный лиганд или подвергается специфической модификации в результате химической реакции с аналитом, в результате чего происходят конформационные изменения структуры, влияя на способность фактора связывать ДНК, что и регулирует транскрипционный ответ. Если в структуру такого природного сенсорного белка интегрировать флуоресцентный домен, то такие конформационные перестройки можно детектировать. Таким образом, генетически кодируемые флуоресцентные биосенсоры представляют собой химерные белки, состоящие из сенсорных и флуоресцентных модулей. Функционирование такого биосенсора основано на конформационных взаимодействиях: сенсорная часть взаимодействует с определенным параметром, меняет конформацию, что вызывает конформационные изменения и встроенного флуоресцентного белка, меняя микроокружение его хромофора, что сказывается на спектральных характеристиках. Динамика флуоресцентного сигнала отражает динамику состояния сенсорной части и конкретного анализируемого параметра. Особую популярность биосенсоры на базе флуоресцентных белков получили в области редокс-биологии, позволяя визуализировать в режиме реального времени динамику крайне короткоживущих во внутриклеточной среде соединений, среди которых представители активных форм кислорода, серы, азота, галогенов.

Наша команда занимается разработкой и новыми применениями генетически кодируемых инструментов для исследований редокс-процессов. Недавно были получены несколько новых типов биосенсоров. На основе бактериального белка NemR из *E.coli* были получены версии сенсора для регистрации динамики продуктов галогенирующего стресса – важных медиаторов воспалительных процессов. Сенсор позволяет исследовать динамику галогенирующего стресса в фагоцитирующих нейтрофилах и нейтрофил-подобных клетках. Также получена коллекция трансгенных рыб *Danio rerio* с экспрессией генов данного типа сенсора в различных тканях, что позволяет проводить исследования динамики гипогалогенных кислот и их производных в тканях *in vivo* при моделировании разных типов

воспалительных реакций. Созданные модели могут также выступать в качестве универсальной биологической платформы для поиска и тестирования новых подходов противовоспалительной терапии. Другой биосенсор был разработан на основе фактора транскрипции BigR из *X.fastidiosa* и позволяет регистрировать в живых системах органические и неорганические пер/полисульфиды, роль которых очень разнообразна в регуляции многих внутриклеточных процессов в норме и при развитии различных патологий.

Генетически кодируемые биосенсоры могут быть применены для *in vivo* исследований в тканях лабораторных млекопитающих. В наших исследованиях гены интересующих типов биосенсоров мы доставляем в ткани мозга грызунов (мыши, крысы) с помощью вирусной системы доставки. Последующая регистрация флуоресцентного сигнала в глубоких структурах мозга осуществляется *in vivo* через имплантированные оптические зонды. С помощью подхода оптоволоконного нейроинтерфейса может быть исследована динамика различных редокс-процессов при моделировании острых и хронических заболеваний нервной системы (ишемический инсульт головного мозга, болезни Паркинсона, Альцгеймера).

При поддержке грантов РНФ № 25-15-00548 и № 23-75-30023.

УДК 577.21

УТОЧНЕНИЕ ОЦЕНКИ ПАТОГЕННОСТИ МИССЕНС-ВАРИАНТОВ КИНАЗНОГО ДОМЕНА ACVRL1 МЕТОДОМ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ МОЛЕКУЛЫ АТФ

Боровикова И.И.[1], Упоров И.В.[2], Охрименко Г.С.[1], Замятин В.И.[1], Попцова М.С.[1], Данковцева Е.Н.[3], Затейщиков Д.А.[3]

[1] ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Россия,
[2] ФГОУ ВПО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»,
[3] ГБУЗ «ГКБ № 29 им. Н.Э. Баумана ДЗМ», Москва, Россия
borovikova_irina@bk.ru

Аннотация. Представлен подход к уточнению патогенности миссенс-вариантов гена ACVRL1 на основе количественного анализа изменений свободной энергии связывания АТФ. С использованием метода молекулярной динамики показано, что ряд аминокислотных замен приводит к статистически значимым изменениям аффинности белка к лиганду, что может служить функциональным критерием их классификации.

Ключевые слова: ACVRL1, молекулярная динамика, миссенс-варианты, свободная энергия, АТФ

Одной из ключевых проблем современной медицинской генетики является интерпретация миссенс-вариантов, значительная часть которых классифицируется как варианты неопределённого клинического значения (VUS). Применение критериев ACMG/AMP нередко оказывается недостаточным для их однозначной классификации [1].

Ген ACVRL1 кодирует рецепторную серин/треониновую киназу, участвующую в сигнальном пути TGF-β. Нарушения в области связывания АТФ могут существенно влиять на активность белка, такие нарушения возможно исследовать с использованием методов молекулярного моделирования [2, 3]. Патогенные варианты гена ACVRL1 ассоциированы с развитием таких заболеваний, как легочная гипертензия, наследственная геморрагическая телеангиэктазия [4, 5].

Молекулярно-динамическое моделирование проводилось с использованием пакета AMBER [6]. Свободная энергия связывания рассчитывалась методом Пуассона–Больцмана [7].

В работе проанализированы миссенс-варианты кармана связывания АТФ ACVRL1: известные патогенные и вероятно-патогенные замены (n=20), замены неизвестной значимости (n=32), in silico сгенерированные возможные замены кармана связывания АТФ (n=12), а также замена, обнаруженная у пациента с легочной гипертензией. Были построены модели нативного и мутантных белков в комплексе с АТФ, оценена свободная энергия связывания.

Показано, что ряд замен приводит к статистически значимым изменениям свободной энергии связывания. Значимое изменение эффективности связывания показано для 90% известных патогенных и вероятно-патогенных замен, 63% замен неизвестной значимости, 75% in silico замен. Выявлены варианты как с повышенной, так и с пониженной аффинностью к АТФ.

Таким образом, количественная оценка связывания АТФ может использоваться как дополнительный функциональный критерий при интерпретации миссенс-вариантов.

Список литературы

1. Richards S. et al. (2015) Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology, *Genet Med*, **17**(5):405–424.
2. Agnew C. et al. (2021) Structural basis for ALK2/BMPR2 receptor complex signaling through kinase domain oligomerization, *Nat Commun*, **12**(1):4950.

3. Chen Y.J., Li P.Y., Yang C.N. (2021) Molecular dynamics study of enhanced autophosphorylation by S904F mutation of the RET kinase domain, *J Struct Biol*, **213**(4):107799.
4. Mathavan A. et al. (2023) Pulmonary hypertension in hereditary hemorrhagic telangiectasia: A clinical review, *Pulm Circ*, **13**(4):e12301.
5. Eichstaedt C.A. et al. (2023) Genetic counselling and testing in pulmonary arterial hypertension: a consensus statement on behalf of the International Consortium for Genetic Studies in PAH, *Eur Respir J*, **61**(2).
6. Case D.A. et al. (2023) AmberTools, *J Chem Inf Model*, **63**(20):6183–6191.
7. Miller B.R. et al. (2012) MMPBSA.py: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations, *J Chem Theory Comput*, **8**(9):3314–3321.

УДК 544.4+544-931.2

СОВРЕМЕННАЯ ХИМИЧЕСКАЯ КИНЕТИКА В БИОКАТАЛИЗЕ

Варфоломеев С.Д. [1,2]

[1] Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Химический факультет
[2] Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, г. Москва, РФ
sdvarf@bk.ru

Аннотация. Представлены современные методы описания и анализа химической кинетики сложных динамических процессов.

Ключевые слова: химическая кинетика, биокинетика, ферментативный катализ, суперкомпьютерные технологии, расчёт констант

Химическая кинетика как раздел физической химии возникла в конце XIX столетия благодаря нескольким выдающимся исследователям, прежде всего Я.Х. Вант-Гоффа и С.А. Аррениуса. Введение понятия скорости химической реакции, которую можно было измерять экспериментально, и демонстрации того факта, что скорость реакции зависит от концентрации реагента и подчиняется закону действующих масс, создало основы и возможности исследования механизмов химических реакций. Исследование механизма химической трансформации вещества подразумевает идентификацию и описание отдельных этапов процесса, получение характеристик промежуточных соединений и оценку времени их жизни, описание переходного состояния каждой элементарной стадии, то есть геометрии атомов и энергетического перехода из одного состояния в другое. Многие десятилетия такого рода описания можно было получить лишь для самых простых систем. Ограничения определялись возможностями экспериментальных методов и, при протекании многокомпонентных реакций, существенными сложностями математического описания процесса в силу появления в системе дифференциальных уравнений нелинейных членов. Экспериментаторы стремятся линеаризовать системы уравнений путем фиксации постоянными тех или иных переменных. Теоретики с большими трудностями продирались через аналитическое математическое описание нелинейных систем уравнений.

Существенным шагом вперёд в переходе кинетическому описанию и сложных систем являются работы Н.Н. Семёнова по исследованию разветвлённых цепных реакций [1]. В своих работах Н.Н. Семёнов оперировал в большей части аналитическими методами описания динамики процесса. Однако, в 50–60х годах прошлого столетия развитие методов численного решения и анализа систем дифференциальных уравнений и использования электронно-вычислительной техники качественно изменило ситуацию и сделало возможным адекватное количественное описание кинетики химических реакций любой степени сложности.

Существенный вклад в развитие химической кинетики как науки о скоростях и механизмах химических процессов внесло изучение ферментов в силу большой востребованности биокатализа в теоретическом и практико-технологическом плане.

Развитие интереса к химическим процессам в живых системах обусловило развитие специализированной области химической кинетики, которую условно можно назвать “биокинетика” [2–4]. Кинетическими элементами биосистем являются ферменты, при этом существенное развитие получили экспериментальные и теоретические методы исследования ферментативного катализа [5]. В рамках развития кинетического подхода были решены задачи изучения лабильных промежуточных соединений, кинетики ферментативных реакций в открытых гетерогенных системах, включая иммобилизованные ферменты, описания кинетического поведения ферментов в полиферментных цепях, кинетики электроно-транспортных процессов, описания кинетических закономерностей инактивации ферментов и ферментных систем. Кинетические методы исследования механизмов процессов оказались весьма плодотворными в анализе роста и эволюции микробных популяций [6], развития

патологических процессов [7], в исследовании метаболизма и динамики действия лекарственных препаратов [8, 9].

Принципиально важной и достаточно сложной в современной химической кинетике представляется решение обратных задач – определение параметров процессов (констант скорости элементарных стадий) из анализа экспериментальных данных. В этой области невозможно переоценить вклад профессора С.И. Спивака [10,11]. Метод Канторовича-Спивака дал возможность оценить диапазон параметров (констант скорости), что качественно изменил ситуацию и обеспечил объективное описание динамики процесса.

В настоящее время химическая кинетика переживает новый революционный скачок. Эта революция основывается на использовании высокопроизводительных вычислений (суперкомпьютерные технологии) и дает возможности априорного (*ab initio*) описания динамики сложных процессов с абсолютно теоретическим "вычислением" констант скоростей процессов. Наиболее ярким примером в этой области являются исследования механизмов ферментативных реакций. Методы молекулярной механики и молекулярной динамики в совокупности с методами квантово-химического описания элементарных стадий позволяют построить энергетический профиль каталитического цикла процесса по координате реакции, идентифицировать структуры промежуточных соединений и переходных состояний, оценить величины энергетических барьеров в терминах свободной энергии и, как следствие, вычислить константы скорости всех элементарных стадий [12].

Суперкомпьютерная технология является основой проведенных нами исследований ряда ключевых ферментов центральной нервной системы человека, таких как ацетилхолинэстераза, N-ацетиласпартат гидролаза, N-ацетилглутамиласпартат гидролаза и других ферментов. Использование молекулярно-механических и квантово-механических вычислительных процедур на основе суперкомпьютерных технологий позволяет получить полное описание молекулярных механизмов катализа. Результатом является кинетическое описание синаптических контактов как основы записи и хранения информации в мозге человека, описание ферментного протонного синапса как информационного триггера, создание информационного нейрообраза как основы молекулярной памяти.

Сферы применения экспериментальных и теоретических методов химической кинетики непрерывно расширяются и создают возможности понимания наиболее сложных задач современного естествознания, таких как происхождение жизни [13], кинетика химических реакций в мозге человека [14–16], молекулярные основы когнитивности и природы сознания [17].

Работа выполнена в рамках гранта РНФ №23-13-00011-17.

Список литературы

1. Семёнов Н.Н. Избранные труды. Т.1. Кн.1.Цепные реакции - М.: Наука, 2004.- 392 с.
2. Эмануэль Н.М., Березин И.В., Варфоломеев С.Д. [ред.] Химическая и биологическая кинетика - М.: Изд-во МГУ, 1983. - 296 с.
3. Варфоломеев С.Д. [ред]. Современные проблемы биокинетики - М.: Изд. МГУ - 1987.- 256 с.
4. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика: Практический курс - М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. - 720 с.
5. Варфоломеев С.Д. Химическая энзимология. Учебник - М.: Научный мир, 2019 .-- 544 с.
6. Варфоломеев С.Д., Калюжный С.В. Биотехнология. Кинетические основы микробиологических процессов: Учебное пособие для биологических и химических специальных вузов. - М.: Высш. Школа, 1990. - 295 с.
7. Варфоломеев С.Д. Динамика неустойчивости. Кинетическое моделирование и методы управления. - М.: Научный мир, 2021. - 282 с.
8. Варфоломеев С.Д., Мевх А.Т. Простагландины - молекулярные биорегуляторы. - М.: Изд-во МГУ, 1985. - 307 с.
9. Зайцев С.В., Ярыгин К.Н., Варфоломеев С.Д. Наркомания. Нейропептид-морфиновые рецепторы. - М.: Изд-во МГУ, 1993. - 256 с.
10. Спивак С.И., Губайдуллин И. М., Вайман Е. В. Обратные задачи химической кинетики: учебное пособие. - Уфа: РИО БашГУ, 2003. - 110 с.

11. Исмагилова А.С., Спивак С.И. Обратные задачи химической кинетики. - LAP LAMBERT Academic Publishing . 2013.- 124 с.
12. Варфоломеев С.Д., Немухин А.В., Хренова М.Г., Григоренко Б.Л. Энергетические профили каталитического цикла ферментативных реакций и факторы, определяющие эффективности ферментативного катализа // Изв. Академии наук, Сер. хим. – 2023 – Т.72. - №3 – С.617-623.
13. Varfolomeev S.D., Gachok I.V. Thermocycle and evolutionary combinatorics of macromolecules: The basis of primary processes of the origin of life // Geochem. International. - 2021.- Vol.59.- №11.- P.1083–1089. - doi.org/10.1134/S0016702921110100
14. Варфоломеев С.Д., Быков В.И., Цыбенова С.Б. Кинетика химических процессов в мозге человека. Холинергический синапс – механизмы функционирования и методы управления. // Докл. Акад. наук. - 2020.- Т. 492.- С.305–309. - doi.org/10.1134/S1607672920030126
15. Варфоломеев С.Д., Семенова Н.А., Быков В.И., Цыбенова С.Б. Кинетика химических процессов в мозге человека. Триггер-эффект и автостабилизация N-ацетиласпарагиновой кислоты // Докл. Акад. наук. - 2019.- Т. 484. - С. 441–446. - doi.org/10.1134/S0012501619020039
16. Варфоломеев С.Д., Семенова Н.А., Быков В.И., Цыбенова С.Б. Кинетика химических процессов в мозге человека. Моделирование BOLD-сигнала при ф-МРТ исследовании // Докл. Акад. наук. - 2019. - Т.488. - С. 39–43. - doi.org/10.1134/S0012501619090057
17. Варфоломеев С.Д. Молекулярные основы интеллекта. - Изд-во МГУ, 2025. - 487 с.

УДК 543.424.2:57.083.3

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ГАЛАКТОМАННАНА ASPERGILLUS С ГКР-ДЕТЕКЦИЕЙ

Васильева А.Д.[1], Юрина Л.В.[1], Евтушенко Е.Г.[2], Гаврилина Е.С.[1], Крылов В.Б.[3], Нифантьев Н.Э.[3], Курочкин И.Н.[1,2]

[1] Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, г. Москва, РФ
[2] Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
[3] Институт органической химии имени Н.Д. Зелинского, г. Москва, РФ
alexandra.d.vasilyeva@gmail.com

Аннотация. В докладе представлена информация об исследовании применимости разработанного высокочувствительного и селективного протокола ИФА, использующего детекцию сигнала методом ГКР, для определения галактоманнана Aspergillus в смывах с поверхности слизистой оболочки трахеи и бронхов, полученных с помощью процедуры бронхоальвеолярного лаважа. Продемонстрирована сопоставимость результатов определения галактоманнана с помощью коммерческого набора «GalMAg-ИФА» и разработанного анализа.

Ключевые слова: гигантское комбинационное рассеяние (ГКР); ИФА; галактоманнан; бронхоальвеолярный лаваж; инвазивный аспергиллез легких.

Инвазивный аспергиллез (ИА) является опасной грибковой инфекцией с высокой смертностью. Одним из ключевых факторов своевременной диагностики ИА является использование подхода, основанного на обнаружении галактоманнана (ГМ), полисахарида клеточной стенки возбудителя [1]. Существующие тест-системы для определения ГМ методом иммуноферментного анализа (ИФА) используют колориметрический метод регистрации. Перспективным направлением является смена способа регистрации продукта, генерируемого пероксидазной меткой в ИФА, в частности применение методики на основе спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) и золей наночастиц серебра для высокочувствительного измерения продукта ферментативного окисления о-фенилендиамина (оФД). Ранее на модельных образцах культурального ГМ, была продемонстрирована совместимость этой методики регистрации со стандартными процедурами ИФА в микропланшетном формате [2].

Применение разработанного ранее протокола ИФА с ГКР-детекцией к анализу образцов БАЛ потребовало внесения в него минорных модификаций: снижения до 50 мкл объема подготовленного образца, вносимого в лунку планшета, и снижения концентрации конъюгата проявляющих антител с пероксидазой хрена. Для подтверждения аналитических характеристик модифицированного протокола была получена калибровочная зависимость с использованием образцов с известными концентрациями культурального ГМ (16 – 10800 пг/мл). Аналитическим сигналом являлась интенсивность полосы 733 $см^{-1}$, соответствующей ДАФ - продукту ферментативной реакции. Предел обнаружения ГМ составил 53 пг/мл с рабочим диапазоном до 10,8 нг/мл.

Десять образцов БАЛ были проанализированы с помощью набора реагентов «GalMAg-ИФА». В соответствии с протоколом производителя набора 4 образца были отнесены к отрицательным (индекс позитивности (ИП) = 0,64, 0,69, 0,74 и 0,78), 6 – к положительным (ИП = 1,38, 1,97, 2,46, 5,64, 11,8 и 15,9). Эти же 10 образцов были проанализированы при помощи ИФА с ГКР-детекцией, по 2 независимых повтора в 2 дня для оценки внутрилабораторного коэффициента вариации, который составил 15% для отрицательных образцов и 9% для положительных. В связи с тем, что зависимость результатов ИФА с ГКР-детекцией от измеренного ИП является нелинейной, для каждого из 4 повторов был рассчитан коэффициент корреляции Спирмана, составивший 0,93, 0,95, 0,95 и 0,93 с $p = 1{,}1\times10^{-4}$, $2{,}3\times10^{-5}$, $2{,}3\times10^{-5}$ и $1{,}1\times10^{-4}$ соответственно.

Для оценки возможности интерпретации результата анализа на основании единичного измерения образца методом ИФА с ГКР-детекцией, был проанализирован весь пул интенсивностей на полосе

733 $см^{-1}$ отрицательных и положительных образцов. Для отрицательных образцов медиана составила 167 имп., минимум и максимум – 118 и 271 имп. соответственно. Медиана результатов положительных образцов – 1861 имп. с минимальным и максимальным значениями 829 и 3137 имп.

Рассмотрение результатов всех измерений образцов БАЛ методом ИФА с ГКР-регистрацией позволяет предварительно (вследствие небольшой выборки) заключить, что классификация образца как положительного/отрицательного возможна на основании одного измерения при использовании порога в диапазоне от 271 имп. (максимальный сигнал отрицательных образцов) до 829 имп. (минимальный сигнал положительных образцов) [3].

Преимуществами регистрации методом ГКР по сравнению с хромогенной детекцией являются снижение предела обнаружения ГМ и повышение чувствительности в области ИП до 2, что в будущем может позволить более точно определить порог разграничения положительных и отрицательных результатов.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (FFZR-2024-0005, соглашение No 075-00422-24-02 от 28.05.2024; FFZZ-2024-0004, соглашение No 075-03-2024-401/3 от 30.05.2024).

Список литературы

1. Dagenais T.R., Keller N.P. Pathogenesis of Aspergillus fumigatus in Invasive Aspergillosis // Clinical Microbiology Reviews. – 2009. – Vol. 22. – No. 3. – P. 447-465.

2. Vasilyeva A.D., Yurina L.V., Evtushenko E.G., et al. Increasing the Sensitivity of Aspergillus Galactomannan ELISA Using Silver Nanoparticle-Based Surface-Enhanced Raman Spectroscopy // Sensors. – 2025. – Vol. 25. – No. 14. – P. 4376.

3. Юрина Л.В., Васильева А.Д., Евтушенко Е.Г., Гаврилина Е.С., Крылов В.Б., Басманов Д.В., Нифантьев Н.Э., Курочкин И.Н. Иммуноферментный анализ галактоманнана с ГКР-детекцией в образцах бронхоальвеолярного лаважа // Клиническая практика. – 2025. – Т. 16. – №4. – С. 54-62.

БИФУНКЦИОНАЛЬНАЯ β-КСИЛОЗИДАЗА МИКРОМИЦЕТА *PENICILLIUM VERRUCULOSUM*: ГИДРОЛИЗ КСИЛАНСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ И СИНТЕЗ КСИЛООЛИГОСАХАРИДОВ

Волков П.В., **Семенова М.В.**

ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

Аннотация. В докладе представлены результаты исследования направленные на увеличение глубины конверсии ксилансодержащего растительного сырья новыми рекомбинантными ферментными препаратами с увеличенным содержанием β-ксилозидазы. Показана эффективность гидролиза багассы и кукурузных кочерыжек, фактически являющихся невостребованными отходами пищевых производств. Помимо этого, в результате детального изучения биохимических параметров β-ксилозидазы выявлено свойство трансксилозилирвания, позволяющее подшивать высвобождающуюся в результате гидролиза ксилозу и синтезировать таким образом ксилоогигосахариды.

Ключевые слова: ферментные препараты, гидролиз, ксилоолигосахариды, активность, трансксилозилирование.

Ферментативный гидролиз перспективного ксилансодержащего растительного сырья, такого как кукурузные кочерыжки и багасса, является ключевым этапом биотехнологий получения сахаров второго поколения. Эффективная деполимеризация гемицеллюлоз, прежде всего ксиланов, необходима для повышения выхода сахаров и их последующей биоконверсии в целевые продукты.

Одним из лимитирующих факторов гидролиза гемицеллюлоз является недостаточное содержание β-ксилозидаз (βXLD) в составе ферментных комплексов. Это приводит к накоплению ксилоолигосахаридов (КОС), ингибирующих активность эндоксиланаз и других гемицеллюлаз, что снижает общую эффективность процесса [1].

Методами биоинформатики в геноме промышленного гриба *Penicillium verruculosum* был идентифицирован ген, кодирующий ранее не охарактеризованную β-ксилозидазу (rPvβXLD, 796 аминокислотных остатков, ~86 кДа). Для получения фермента была сконструирована генетическая конструкция, в которой ген *βxld* (2391 п.н.) находился под контролем индуцибельного промотора *cbh1*.

В результате трансформации реципиента *P.verruculosum* F-3972D получены штаммы с сверхэкспрессией rPvβXLD (до 140 ед/мл). На основе отобранных продуцентов были получены четыре ферментных препарата (ФП), которые в прикладных испытаниях при гидролизе отходов переработки отходов кукурузы обеспечили увеличение выхода сахаров на 30–64% по сравнению с препаратами исходного штамма и коммерческими аналогами. При ферментативном осахаривании предобработанной багассы (отходы сахарного тростника), характеризующейся примерно вдвое меньшим содержанием ксиланов по сравнению с кукурузными кочерыжками, использование ФП rPvβXLD приводило к увеличению выхода сахаров на 19%.

Помимо высокой гидролитической активности, детальное физико-химическое исследование rPvβXLD выявило выраженную трансксилозилирующую активность, характерную для ферментов семейства гликозидгидролаз 3 (GH3) [2]. Это свойство представляет практический интерес, поскольку открывает перспективы направленного синтеза функциональных КОС, в том числе обладающих пребиотическими свойствами.

Полученные результаты демонстрируют высокий потенциал использования рекомбинантных штаммов *P.verruculosum* для создания эффективных ферментных комплексов с повышенным содержанием rPvβXLD, что способствует снижению ингибирования гидролиза и увеличению выхода редуцирующих сахаров из лигноцеллюлозного сырья.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ (Регистрационный номер: 126030218233-1)

Список литературы
1. Li Q, Jiang Y, Tong X, Zhao L, Pei J. Co-production of Xylooligosaccharides and Xylose From Poplar Sawdust by Recombinant Endo-1,4-β-Xylanase and β-Xylosidase Mixture Hydrolysis. Front Bioeng Biotechnol. 2021 Feb 1;8:637397. doi: 10.3389/fbioe.2020.637397. PMID: 33598452; PMCID: PMC7882696.
2. Eneyskaya EV, Ivanen DR, Bobrov KS, Isaeva-Ivanova LS, Shabalin KA, Savel'ev AN, Golubev AM, Kulminskaya AA. Biochemical and kinetic analysis of the GH3 family beta-xylosidase from Aspergillus awamori X-100. Arch Biochem Biophys. 2007 Jan 15;457(2):225-34. doi: 10.1016/j.abb.2006.10.024. Epub 2006 Nov 9. PMID: 17145041.

УДК 577.29

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР BACH1 – НОВАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ ТЕРАПИИ РАКА И НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ

Хушпульян Д.М., Клычева К.В., Силкина М.О., Захарянц А.А., Разумовская А.В., Газарян И.Г., Никулин С.В.

Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», г. Москва, РФ
igazaryan@gmail.com

Аннотация. В докладе представлены результаты исследования низкомолекулярных ингибиторов транскрипционного фактора Bach1 методом сравнительного транскриптомного анализа. Идентифицированы 70 генов быстрого отклика, специфичных для низкомолекулярных ингибиторов транскрипционного фактора Bach1. Показано, что ингибиторы Bach1 из группы бензимидазолов-бензотиазолов обладают как нейропротекторной, так и противораковой активностью.

Ключевые слова: ингибиторы, Bach1, Bach2, Nrf2, гемоксигеназа

В последнюю декаду значительный интерес в качестве новой фармакологической мишени вызывает транскрипционный фактор Bach1 (BTB domain and CNC homology 1), играющий регулирующую роль в аэробном метаболизме, гомеостазе гема, клеточном цикле, старении клеток, и в ответе на окислительный стресс. Наличие BTB домена позволяет данному фактору образовывать гетеродимеры с другими транскрипционными факторами и взаимодействовать с ДНК, приводя к репрессии генов. В частности, взаимодействие с Maf белками происходит на MARE-элементе генов, активируемых транскрипционным фактором Nrf2, приводя к репрессии Nrf2-регулируемых генов. Ген гемоксигеназы-1 (HMOX1) – классический пример гена, регулируемого конкуренцией Nrf2 и Bach1 - рассматривается как один из цитопротекторов, регулирующих внутриклеточный уровень гема за счет его окисления кислородом.

Белковая стабильность Bach1 регулируется связыванием гема в С-концевом домене, приводя к конформационному изменению Bach1, выходу из ядра, убиквитинированию и протеасомной деградации. Взаимозависимость окислительного стресса, регуляции метаболизма железа и гема, и активности транскрипционных факторов Nrf2 и Bach1 находится в центре внимания как фундаментальных, так и прикладных исследований в области нейродегенерации и онкологии [1]. Повышенная экспрессия Bach1 выявлена в различных типах рака и наблюдается как в опухолях в целом, так и в стволовых раковых клетках, что позволяет рассматривать его как маркер злокачественности опухолей, поскольку Bach1 активирует инвазию и метастазирование. В настоящее время Bach1 рассматривается как «пан-онкоген» [2], а генетическое ингибирование Bach1 часто выдвигается как способ противораковой терапии. Ограничения генетического метода ингибирования экспрессии Bach1 очевидны, и для реальной терапии рака требуется разработка специфических низкомолекулярных ингибиторов Bach1, что является непростой задачей из-за отсутствия расшифрованной кристаллической структуры гем-сенсорного домена. В настоящее время широко используются лишь миметики гема – различные варианты порфиринов кобальта, цинка и олова, которые не являются специфичными ингибиторами Bach1 и ингибируют многие гем-зависимые белки и ферменты, включая, собственно, гемоксигеназу.

Единственным хорошо охарактеризованным ингибитором Bach1 является соединение HPPE, разработанное компанией High Point Pharmaceuticals (США), и которое, как было нами показано методом сравнительного транскриптомного анализа [3], действует аналогично протопорфиринам цинка и олова – известным ингибиторам Bach1. Структура HPPE и ее варианты как индукторы HMOX1 защищены двумя патентами США, полученными в 2014 (WO2011103018A8) и 2020 году (US10766888B1). Соединения представляют собой структурную комбинацию бензимидазола и бензотиазола, связанных через NH группу и стерически имитирующих половину молекулы гема. Структура HPPE не исключает его прямого взаимодействия как с гемоксигеназой, так и гем-сенсорными белками вообще. Система скрининга, использованная авторами обоих патентов США, а именно – индукция белка и мРНК

гемоксигеназы-1 - привела к разработке ингибиторов Bach1, обладающих побочной Nrf2-активирующей способностью, механизм возникновения которой неизвестен. Для протекции нормальных тканей от окислительного стресса ингибирование Bach1, совмещенное с активацией Nrf2, приносит несомненную пользу, как в режиме предварительного администрирования, так и после повреждения [4].

Благодаря выполненному нами анализу зависимости «структура-функция» для Nrf2-активирующей способности вышеупомянутых ингибиторов Bach1 [5], были синтезированы новые варианты ингибиторов, которые позволили установить как механизм возникновения эффекта активации Nrf2 у соединений данной группы, так и получить структурные аналоги, не обладающие такой побочной активностью. Транскриптомный анализ одного из новых ингибиторов Bach1 показал, что его действие связано с активацией программ ответа на анфолдинг белка и синтеза шаперонов, по-видимому, вследствие дополнительного действия на гем-регулируемую ингибиторную киназу HRI. Сравнение с исходным коммерческим ингибитором HPPE, обладающим двойной активностью – по Bach1 и по Nrf2, подтвердило, что новый ингибитор Bach1 вообще не активирует сигнальные пути, связанные с антиоксидантной программой. При этом все остальные сигнальные пути, выявленные ранее для HPPE – такие как гликолиз, гипоксия, метаболизм гема, гомеостаз цинка, апоптоз, сигналинг через TNFa и TGFb рецепторы, PERK и KRAS киназные пути, иммунный ответ, - были активированы. Подавлялось деление клетки и экспрессия митохондриальных генов.

Анализ дифференциально-экспрессируемых генов под действием нового ингибитора Bach1 показал, что 52 из 68 выявленных мишеней содержат сайт связывания Bach1 по литературным данным, а два гена - Bach2, из чего можно сделать вывод, что новый ингибитор действует и на Bach2. Количество дифференциально экспрессированных генов с уровнем активации экспрессии более 1.5 составляет около 160 для рака предстательной железы и 115 для рака толстой кишки. Но с уровнем экспрессии 2.0 их значительно меньше. Для репрессированных генов это число составляет всего несколько десятков для рака предстательной железы и менее одного десятка для рака толстой кишки. В целом, короткое время инкубации позволило увидеть прямые мишени действия нового ингибитора Bach1. В какой мере дифференциально экспрессируемые гены активированы за счет деградации Bach1 под действием нового ингибитора, а не за счет запуска программы ответа на дефицит гема через HRI киназу, усиленной ингибированием Bach1, является открытым вопросом, требующим дополнительных исследований в рамках данного проекта.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 25-15-00494, https://rscf.ru/project/25-15-00494/

Список литературы

1. Hu D. et al. Transcription factor BACH1 in cancer: roles, mechanisms, and prospects for targeted therapy // Biomark Res. – 2024. – Vol. 12. No. 1. – Art. 21.
2. Liu Z. et al. Uncovering BTB and CNC Homology1 (BACH1) as a Novel Cancer Therapeutic Target // Frontiers Genetics. - 2022. - Vol. 13. – Art. 920911
3. Hushpulian D.M. et al. Functional analysis of bipartite NRF2 activators that overcome feedback regulation for age-related chronic diseases // Redox Biology. – 2025. – Vol. 86. – Art. 103794.
4. Ahuja M. et al. (2021). Bach1 derepression is neuroprotective in a mouse model of Parkinson's disease // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2021. – Vol. 118. –No. 45. – Art. e2111643118
5. Hushpulian, D. M., Kaidery, N. A., Dutta, D., Sharma, S. M., Gazaryan, I., and Thomas, B. Emerging small molecule inhibitors of Bach1 as therapeutic agents: Rationale, recent advances, and future perspectives // BioEssays. – 2024. Vol. 46. – No.1. – Art. e2300176

УДК 628.544:579.66

ПОЛУЧЕНИЕ БИОГАЗА В ПРОЦЕССЕ РЕГЕНЕРАЦИИ КИЗЕЛЬГУРОВОГО ШЛАМА

Гайдамака С.Н.[1], Гладченко М.А.[1], Маслова О.В.[1], Корнилова А.А.[2]

[1] Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г.Москва, РФ
[2] Физический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г.Москва, РФ
s.gaidamaka@gmail.com

Аннотация. Предложен новый комбинированный ресурсосберегающий подход к регенерации кизельгурового шлама – многотоннажного отхода предприятий пищевой промышленности. При его реализации за 4 часа путем химической предобработки кизельгурового шлама с крахмало-паточного производства 1%-ным раствором $NaHCO_3$ при 40°С и трехкратной промывки кизельгура водой обеспечивается извлечение до 75% органических веществ в жидкую фракцию. Последующая биокаталитическая трансформация полученной жидкой фракции с 64,4 гХПК/л в анаэробном биореакторе с восходящим потоком мезофильного ила (UASB) обеспечивает получение биогаза с содержанием метана 80%. Эффективность удаления ХПК составляет 93%, эффективностью по биогазу – 91%. Термическая обработка твердого остатка очищенного от органических компонентов кизельгура при 550°С (с применением биогаза) обеспечивает получение до 100% регенерированного кизельгура.

Ключевые слова: отработанный кизельгур, анаэробная ферментация, биогаз, UASB-реактор, крахмало-паточное производство, гибридный процесс.

В настоящее время остро стоит проблема поиска решений для наиболее рациональной переработки отходов и расширения областей применения возобновляемого сырья. Кизельгур представляет собой осадочную горную породу, состоящую из останков диатомовых водорослей. Из-за высокой сорбционной емкости и отсутствия токсичности кизельгур активно применяется в пищевой промышленности в составе фильтров на этапе осветления напитков [1]. На производство 4,55 л готового пива расходуется примерно 175 г кизельгура [2]. Постепенно природные источники кизельгура истощаются, все актуальней становятся вопросы, касающиеся поиска решений для эффективной регенерации отходов кизельгура [3]. В данном ключе наиболее распространенным подходом к регенерации кизельгура является его термическая обработка при высоких температурах [4]. В псевдоожиженном слое за счет сжигания природного газа при температуре 550°С обеспечивается полное удаление воды и органических составляющих из частиц кизельгура [5].

С целью повышения ресурсосбережения промышленной технологии переработки отходов кизельгура в ходе данного исследования к реализации предложена альтернативная энерго- и ресурсосберегающая экологичная гибридная схема регенерации кизельгура, предполагающая частичную замену расходуемого на стадии обжига отработанного кизельгура природного газа на биогаз, который, в свою очередь, может быть получен в результате биокаталитической трансформации органических веществ, предварительно извлеченных из отработанного кизельгура.

Для получения биогаза в ходе переработки отходов кизельгура предложено ввести в процесс термической регенерации кизельгура двух предварительных дополнительных стадий, обеспечивающих извлечение органических компонентов из отходов кизельгура и их биотрансформацию с получением биогаза в проточном биореакторе. Для изучения возможностей повышения эффективности регенерации шлама кизельгура на стадии извлечения органических веществ предложено использование доступного химического агента – раствора гидрокарбоната натрия, так как известно, что при щелочных значениях pH органические вещества активнее переходят в водную среду и не осаждаются повторно на поверхности, улучшается термическая стабильность образцов кизельгура, а также улучшается со-

стояние его пор [6]. Комбинирование стадий с применением химических агентов и биокатализаторов в целом является актуальным и перспективным направлением развития современной прикладной биотехнологии и биокатализа [7-10].

В результате в лабораторных условиях был реализован новый подхода к регенерации кизульгурового шлама, использовавшегося на стадии фильтрации паточных сиропов, с исходным содержанием органических веществ 521 гОВ/кг влажного исх. сырья**.** Выдерживание шлама в 1%-м растворе $NaHCO_3$ при 40°С и соотношения массы кизельгура к объему экстрагирующего агента 1:4 за 1 час обеспечивает извлечение 47% органических веществ (ОВ) в жидкую фракцию. Дополнительная 3-х кратная промывка кизельгура водой в соотношении 1:2 обеспечивает общую эффективность извлечения ОВ – 75%. Биотрансформация объединенной жидкой фракции на основе $NaHCO_3$ и промывных вод с общей концентрацией ОВ от 55,3 до 64,4 гХПК/л, разбавленной в 3 раза водой, в проточном UASB реакторе обеспечивает получение биогаза с содержанием метана 75%, при этом эффектвность удаления ХПК – 94%, эффективность метаногенеза по биогазу и метану – 92 и 95%, соответственно. Применение биогаза может сократить расход природного газа на завершающем этапе - термической обработке кизельгура, для его 100%-ной регенерации.

Установлены условия, которые при минимальных затратах энергии и реагентов обеспечивают высокие показатели извлечения ОВ в жидкую фракцию:

1. Температурный режим. С целью экономии энергетических и временных ресурсов процесс очистки кизельгурового шлама от ОВ целесообразно проводить при 40^0С в течение 1 часа.
2. Концентрация химического агента и соотношение компонентов. Вода без добавления гидрокарбоната натрия не подходит для применения в качестве экстрагирующего агента (эффективность очистки не более 28%). Для проведения экстракции ОВ из кизельгурового шлама целесообразным является использование раствора $NaHCO_3$ в концентрации 1% и соотношения массы кизельгура к объему экстрагирующего агента - 1:4, при этом обеспечивается эффективность извлечения ОВ – 47%.
3. Количество и кратность дополнительных промывок водой. Для достижения высоких показателей очистки рекомендовано выполнение 3-х кратной дополнительной промывки водой кизельгура в соотношении 1:2. Первая дополнительная промывка твердой фракции кизельгура, полученной после его выдерживания в 1%-ном растворе $NaHCO_3$, позволила увеличить эффективность очистки кизельгура дополнительно на 20%, вторая и третья – еще на 4% каждая.

Предложенный и продемонстрированный на практике гибридный подход, подразумевающий последовательную физико-химическую и биокаталитическую обработку отходов кизельгура, может использоваться исследователями в области регенерации кизельгуровых шламов с высоким содержанием органических веществ, а также для практической реализации на пищевых производствах.

Исследование выполнено в рамках государственного задания МГУ имени М.В.Ломоносова, регистрационный номер 121041500039-8.

Список литературы

1. Гладченко М. А. и др. Комбинированный подход к регенерации кизельгурового шлама с получением биогаза //Экологические системы и приборы. – 2024. – №. 5. – С. 34-46.

2. Mattar H. et al. Nitrocellulose: structure, synthesis, characterization, and applications. Water Energy Food Environ J Int J 1 (3): 1–15 [Электронный ресурс].

3. Аксенов М. М., Дубровская О. В. Современные технологии рациональной переработки отходов пивоваренного производства //Пиво и напитки. – 2019. – №. 3. – С. 44-47.

4. Иванова О. В., Гатауллина Г. Н., Козулина Е. О. Очистка нефтесодержащих стоков на основе сорбентов из растительного сырья //Всероссийская научно-техническая конференция с международным участием «Оборудование пищевых производств в XXI веке». – 2020. – С. 79-82.

5. Глотова И. А. и др. Разработка подходов к организации процесса регенерации кизельгура в условиях пивоваренного предприятия //Технологии и товароведение сельскохозяйственной продукции. – 2020. – №. 1. – С. 88-91.

6. Tsai W. T., Hsien K. J., Lai C. W. Chemical activation of spent diatomaceous earth by alkaline etching in the preparation of mesoporous adsorbents //Industrial & engineering chemistry research. – 2004. – Т. 43. – №. 23. – С. 7513-7520.
7. Gaydamaka S. et al. Application of the hybrid chemical-biocatalytic approach for conversion of nitrocellulose-containing sewage sludge //Processes. – 2023. – Т. 11. – №. 7. – С. 2017.
8. Маслова О. В. и др. Биокатализ в деградации синтетических полимеров //Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. – 2024. – Т. 65. – №. 2. – С. 161-168.
9. Маслова О. В., Сенько О. В., Ефременко Е. Н. Отходы гибридного процесса десульфуризации жидких углеводородов как сырьевой ресурс для получения биогаза //Возобновляемые источники энергии и приоритеты научно-технологического развития энергетики России: сборник докладов Школы молодых ученых. – 2022. – С. 115-117.
10. Гладченко М. А. и др. Технические решения для модернизации стадий физико-химической и биокаталитической очистки сточных вод мясокомбината //Инженерная физика. – 2025. – №. 5. – С. 21-35.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ВАКЦИННЫХ АДЪВАНТОВ НА ОСНОВЕ СКВАЛЕНА МЕТОДОМ СВЕТОДИНАМИЧЕСКОГО РАССЕЯНИЯ

Галкина Д.А., Зверева В.И., Джавахян М.А., Маркарян А.А.

Российский университет медицины Миздрава России, Научно-исследовательский институт Фармации им. К.М. Лакина, кафедра медицинской и фармацевтической химии, Россия, Москва
skretti@hotmail.com

Вакцины нового поколения требуют разработки безопасных адъювантов. Например, адъюванты на основе сквалена получили широкое распространение в медицине, благодаря своей эффективности и безопасности, что являются хорошей альтернативой существующим адъювантам на основе алюминия или кальция. Скваленовые адъюванты представляют собой эмульсию «масло в воде» с нанодисперсным распределением [1]. Белковый компонент вакцины при смешивании со скваленовым адъювантом инкапсулируется, то есть оказывается окружённым «масляной» оболочкой. Таким образом, капли сквалена представляют собой высокоэффективную систему доставки белковой части вакцины, благодаря чему белок, инкапсулированный внутри масляной капли, высвобождается постепенно в кровоток и ткани организма, что предотвращает его преждевременное протеолитическое расщепление и обеспечивает пролонгированную выработку иммунного ответа. Несмотря на широкое применение скваленовых адъювантов, контроль их качества ограничен лишь общими фармакопейными статьями (ОФС) «Вакцины и анатоксины», «Лекарственные формы для парентерального применения» и «Эмульсии». Однако существующий контроль по показателю «размер частиц» в эмульсиях устанавливает высокие референсные значение (не более 5 мкм), что может не подходить для контроля качества нанопрепаратов.

Цель работы – исследовать размерное распределение и стабильность вакцинного адъюванта на основе сквалена методом динамического рассеяния света (DLS - dynamic light scattering).

В работе использовали коммерческий адъювант на основе сквалена. Для определения размера частиц дисперсной фазы и ζ-потенциала использовали анализатор светодинамического рассеяния. В качестве растворителя использовали высокоомную воду (18,2 МОм·см).

Полученные спектры адъюванта на основе сквалена, представляли собой стабильную коллоидную систему с нанораспределением. Стабильность адъюванта охарактеризована высокими значениями электрокинетического потенциала (ζ >30 мВ).

Список литературы

1. O'Donnell, JS, Isaacs, A, Jakob, V, at. al. Characterization and comparison of novel adjuvants for a prefusion clamped MERS vaccine. *Front Immunol*, 2022 Sep 2;13.

УДК 622.276:679.6

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ И КОМПЛЕКСНЫЕ ПОДХОДЫ К ПОВЫШЕНИЮ НЕФТЕОТДАЧИ В УСЛОВИЯХ КАСПИЙСКОГО РЕГИОНА

Гасымова Э.И.

Факультет химических технологий Азербайджанского государственного университета нефти и промышленности, г. Баку, Азербайджан
elnure.gasimova.ilham.2025@asoiu.edu.az

Аннотация. В данной работе рассматривается роль микробиологических и биотехнологических подходов к повышению эффективности добычи нефти из пластов. Подчеркнута актуальность внедрения третичных методов увеличения нефтеотдачи (EOR). для сложных и выработанных месторождений в странах Каспийского региона и СНГ (в частности, Азербайджана). Отмечается, что современный тренд перехода к комплексным системам, сочетающим микробиологические, физико-химические и адсорбционные методы, является экологически безопасным и экономически эффективным направлением, требующим дальнейшей оптимизации под конкретные геологические условия.

Ключевые слова: нефтеотдача, микробиологические методы, enhanced oil recovery (EOR), Каспийский регион, биотехнологии

Нефтяная промышленность остаётся ключевым сектором экономики стран Каспийского региона и государств СНГ, включая Азербайджан, Казахстан и Россию. История нефтяной промышленности Азербайджана берет свое начало еще в XIX веке, когда началась первая коммерческая добыча нефти на Бибиэйбатском месторождении. Последующее открытие таких нефтяных платформ, как Гунашли, Чираг и Азери, только укрепило позиции страны как экспортера нефти и газа, положительно повлияв на промышленное развитие и национальную экономику [1]. Однако, такое развитие также привело к сильной зависимости экономических секторов в Азербайджане от нефтяной промышленности [2], что создаёт риски экономической нестабильности, в условиях постепенного истощения традиционных месторождений и снижения коэффициента нефтеотдачи. Так, по данным Национальной ассоциации нефтегазовых сервисных компаний, коэффициент извлечения нефти в Баку снизился примерно на 5% (~1,1 млн тонн) за 2025 год [3].

Используемые на сегодняшний день традиционные методы нефтедобычи позволяет извлекать лишь 20-30% нефти из пластов и, следовательно, являются неэффективными. В связи с этим возрастает необходимость внедрения эффективных и экологически устойчивых технологий добычи. Особое внимание уделяется третичным методам увеличения нефтеотдачи (Enhanced Oil Recovery, EOR), среди которых перспективное место занимают микробиологические и биотехнологические подходы [4]. В отличие от традиционных методов, микробиологические технологии направлены на модификацию физико-химических свойств пластовой системы за счёт протекающих *in situ* биокаталитических процессов. В рамках данных подходов используются комплексные биологические механизмы, включающие синтез поверхностно-активных веществ, образование газов, изменение реологических свойств флюидов и формирование биополимерных структур [4,5]. Такие процессы способствуют снижению межфазного натяжения, увеличению подвижности нефти и перераспределению потоков в поровом пространстве коллектора.

Особую актуальность данные технологии приобретают для месторождений Каспийского бассейна, характеризующихся высокой степенью выработанности, сложной геологической структурой и наличием трудноизвлекаемых запасов. В ряде исследований показано, что применение микробиологических методов может существенно повысить эффективность разработки месторождений за счёт улучшения фильтрационно-ёмкостных характеристик пласта и увеличения коэффициента нефтеотдачи [4,6].

Современные тенденции развития данного направления связаны с переходом от использования отдельных биологических агентов к комплексным системам, включающим сочетание микробиологических, физико-химических и адсорбционных методов. В частности, интеграция биокаталитических процессов с пористыми носителями и каталитическими материалами открывает новые возможности для повышения эффективности воздействия на пласт [4,6]. Сравнительная характеристика методов повышения нефтеотдачи представлена в таблице 1 [4,7,8].

Таблица 1. Сравнение методов повышения нефтеотдачи (EOR)

Подход	Механизм	Преимущества	Ограничения
Физический	Введение пара, горячей воды или инициирование внутрипластового горения для снижения вязкости нефти	Эффективны для тяжёлой нефти. Создают дополнительное давление. Наиболее коммерчески отработанный.	Теплопотери. Высокие затраты воды и топлива. Выбросы CO_2.
Химический	Закачка ПАВ, полимеров и щелочей для снижения натяжения и улучшения вытеснения	Извлечение нефти из пор. Улучшение охвата пласта.	Высокая стоимость реагентов. Адсорбция веществ породой. Чувствительность к условиям.
Микробиологический	Использование биополимеров, газов, кислот, ферментов для изменения свойств нефти и проницаемости породы in situ	Экономичность. Экологическая безопасность. Возможность in situ воздействия.	Зависимость от условий пласта. Медленный эффект.
Комбинированный	Сочетание нескольких технологий для создания синергетического эффекта	Компенсация недостатков отдельных методов.	Сложность реализации. Риск несовместимости реагентов.

Как видно из таблицы 1, микробиологические методы обладают рядом преимуществ, включая экологическую безопасность и экономическую эффективность. Таким образом, микробиологические и комплексные подходы представляют собой перспективное направление развития технологий увеличения нефтеотдачи, особенно актуальное для нефтедобывающих регионов Каспийского бассейна и стран СНГ. Их дальнейшее развитие связано с оптимизацией условий реализации процессов, повышением устойчивости биокаталитических систем и адаптацией технологий к конкретным геолого-промысловым условиям.

Список литературы

1. History of development of oil industry [Электронный ресурс]. – Опубл. 20.10.2025. – URL: https://minenergy.gov.az/en/neft/neft-senayesinin-inkisaf-tarixi (дата обращения: 03.03.2026).

2. Сулейманов Г.С., Кулиев Д.К. Инновационные механизмы повышения эффективности нефтедобычи // SOCAR Proceedings. – 2023. – Special Issue № 1. – С. 1–5.
3. Crude oil production declines rapidly in Azerbaijan / Baku Research Institute [Электронный ресурс]. – 17.11.2025. – URL: https://bakuresearchinstitute.org/en/crude-oil-production-declines-rapidly-in-azerbaijan/ (дата обращения: 03.03.2026).
4. Mohammadi M.H., Yernazarova A.K., Joia R. An overview of oil recovery techniques: from primary to enhanced oil recovery methods // Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology. – 2024. – Vol. 3, Issue 1. – P. 291–301.
5. Al-Bahry S.N., Joshi S., Youssef N.H. et al. Biosurfactant production by Bacillus subtilis B30 and its application in enhancing oil recovery // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2014. – Vol. 114. – P. 324–333.
6. Гасымлы А.М., Абдуев А.А., Рзаева С.Д., Гусейнова Х.Г., Рза-заде А.А. Применение микробиологического метода воздействия на месторождении Бибиэйбат // Научные труды НИПИ «Нефтегаз». – 2011.
7. Karimov D., Toktarbay Z. Enhanced oil recovery: techniques, strategies, and advances // ES Materials and Manufacturing. – 2024. – Vol. 23. – P. 1005.
8. Tunio S.Q., Tunio A.H., Ghirano N.A., El Adawy Z.M. Comparison of different enhanced oil recovery techniques for better oil productivity // International Journal of Applied Science and Technology. – 2011. – Vol. 1, No. 5. – P. 143–147.

УДК 54.03; 54.04

СОВРЕМЕННЫЕ НАУЧНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ В РАБОТАХ МОЛОДЫХ УЧЁНЫХ МЕЖДУНАРОДНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ ЛОМОНОСОВ 2026, В ПОДСЕКЦИИ ХИМИЯ ЖИВЫХ СИСТЕМ, НАНОБИОМАТЕРИАЛЫ И НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ

Гачок И.В., **Еремеев Н.Л.**

Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
ivgachok@gmail.com

Аннотация. Подведены организационные и научные итоги работы подсекции «Химия живых систем, нанобиматериалы и нанобиотехнологии» в рамках Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2026» (секция «Химия»). Отмечены основные направления научных исследований, развиваемых в научных центрах с участием молодых специалистов.

Ключевые слова: катализ, ферменты, носители, медицина, анализ

С 10 по 24 апреля на химическом факультете МГУ имени М.В. Ломоносова прошла ежегодная Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2026» (секция «Химия»). Конференция проходила в рамках 16 подсекций, соответствующих современным направлениям химии.

На подсекцию «Химия живых систем, нанобиоматериалы и нанобиотехнологии» (https://lomonosov2026.chem.msu.ru/lifenanobio/) поступило 80 заявок от молодых исследователей. Жюри подсекции составляли преподаватели и сотрудники кафедры химической энзимологии и кафедры химии природных соединений, председатель – заведующий.кафедрой химической энзимологии химического факультета, д.х.н., профессор Н.Л. Клячко, секретарь – ст.н.с., к.х.н. И.В. Гачок. Работа подсекции проводилась в очном режиме с возможностью дистанционного подключения. Это позволило заслушать доклады ряда иногородних участников, которые по разным причинам не смогли приехать в Москву. Большой интерес у студентов вызвали и две проблемные лекции - «Диагностика инфекционных заболеваний - первый шаг в борьбе с эпидемиями. Современные тенденции развития молекулярной диагностики» А.Н. Черкашиной (к.х.н., зав.лаб. ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора) и «Фаготерапия антибиотикоустойчивых патогенов: решение проблемы или путаница?» К.А. Мирошникова (чл-корр. РАН, д.х.н., профессор, зав.лаб. Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). Результатом работы подсекции стал сборник трудов, который опубликован на сайте секции

Большинство участников представляли Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова – химический факультет, факультет наук о материалах, факультет биоинженерии и биоинформатики, биотехнологический факультет, а также научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского. Широко были представлены и другие московские университеты: Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Московский политехнический университет, Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Московский государственный технический университет имени Н.Э. Баумана, Университет науки и технологий МИСИС, Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Центральный университет. Были сделаны доклады молодыми учёными из Сколковского института науки и технологий (Центр био- и медицинских технологий), НИЦ «Курчатовский институт», Московского физико-технического института. Иногородние

участники представляли Национальный исследовательский университет ИТМО (Санкт-Петербург), Тульский государственный университет, Ивановский государственный химико-технологический университет, Казанский федеральный университет, Югорский государственный университет (Ханты-Мансийск), Самаркандский государственный университет имени Шарофа Рашидова (Самарканд, Республика Узбекистан), Фуданский университет (Шанхай, Китай).

Работы молодых учёных были выполнены в академических институтах и федеральных медицинских организациях. В их числе Институт биохимии имени А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Институт синтетических полимерных материалов имени Н.С. Ениколопова РАН, Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН, Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени Ю.М. Лопухина, Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА, Институт биомедицины (МБФ), ФГБУ НМИЦ АГП имени В.И. Кулакова МЗ РФЭ Ханты-Мансийской государственной медицинской академии.

Тематики докладов можно условно разделить на несколько основных направлений. Это можно сделать именно условно, поскольку в большинстве своем представленные работы имели междисциплинарный характер.

Биохимические аспекты. Точечными мутациями в капсидном белке p24 ВИЧ-1 было показано, что активация внутриклеточного каскада cGAS-STING объясняется увеличением кДНК в ходе обратной транскрипции нарушением транспорта капсида в ядро. Замена сайтов ацетилирования интегразы ВИЧ-1 (K258, K264, K266 и K273) на аргинины не оказывало влияния на эффективность обратной трансляции, тогда как интенсивность интеграции и постинтеграционной репарации достоверно снижалась. Анализ ауто-иммунопептидома носителей аллели HLAII DRB1, ассоциированной с системной красной волчанкой (СКВ), с высокой вероятностью указал на роль фрагмента белка стамина 2 в качестве СКВ-ассоциированного антигена.

Трансплантология. Добавление секретома мезенхимальных стволовых клеток к электроспиннинговым скаффолдам из поликапролактона позволило улучшить характеристики регенерации костной ткани. При изучении цитотоксичности моделей 3D-биорезорбируемых скаффолдов для трансплантантов молочной железы было показано преимущество полилактогликолида перед карбоксиметилцеллюлозой.

Биоинформатический анализ. Выдвинуто предположение, что ген HPODL_00678 кодирует ранее неизвестную 6mA ДНК-метилтранферазу в дрожжах *O.parapolymorpha*. Комплексная характеристика длинной некодирующей РНК CHOL позволяет рассматривать ее как потенциальный маркер миелопролиферативных заболеваний. Предложена стратегия поиска метаболических маркеров действия противоопухолевого препарата в моделях рака молочной железы с использованием многокомпонентного анализа метаболитов.

Разработка новых подходов и методов в биохимии и медицине. Показано, что термодинамические параметры фазовых переходов липосомальных форм L-аспарагиназы коррелируют с их биокаталитической эффективностью действия. Обоснованы подходы к выделению всех фенотипов протеасом человека для сравнительного анализа их каталитических свойств. Антипролиферативный G-квадруплексный ДНК-аптамер bi-(AID-1-T), связывающийся с нуклеолином (мембранный белок опухолевых клеток), может быть использован для детекции глиобластомы.

Генная инженерия. Сайт-насыщающий мутагенез флуоресцентного белка TagRFP позволил получить мутанты с пониженной иммуногенностью. Показано, что замены P23A и P26A практически не влияют на активность уридинфосфорилазы из *Shewanella oneidensis* MR-1, в то время как замена P227A резко снижает активность белка. Обнаружено, полиаминоксидазы термотолерантных дрожжей обладают разной специфичностью действия по отношению к неацилированным и ацилированным полиаминам, что весьма перспективно для разработки метода их раздельного определения.

Аналитические приложения. Разработаны методики для определения кортикостерона и перфтороктановой кислоты методом поляризационно-флуоресцентного анализа. Изучено влияние размера и морфологии наночастиц золота на эффективность иммунохроматографических методов, оптимизирован синтез

конъюгатов наночастиц с биомолекулами, предложен прототип иммунохроматографического теста для одновременного определения глутаматдегидрогиназы и токсинов А и В *Clostridioides difficile*. Продемонстрирована применимость метода интерферометрии бислоев для выбора эффективно связывающихся с биомолекулами аптамеров, на базе отобранных лигандов проведены аптамерный микропланшетный анализ афлатоксина В1 и детекция клеток глиобластомы флуоресцентными ДНК-аптамерами. Отработаны методики: выделения мРНК из биологических жидкостей с использованием аффинных сорбентов, определения живых микроорганизмов в кисломолочных продуктах биолюминесцентным методом, выделения раковых экзосом с использованием функционализированных микропузырей, синтеза спектрально различимых микросфер на основе квантовых точек для проточной цитометрии.

Большое внимание было уделено системам доставки лекарственных препаратов. В качестве потенциальных носителей рассматривались твердые липидные наночастицы, внеклеточные везикулы, хитозан, кремний-органические полимеры, олигомеры циклодекстринов, липосомы, сополимеры молочной и гликолевой кислот, поливиниловый спирт, ватерит. Во всех случаях проводилась либо модификация методики включения действующего вещества, либо модификация самого носителя для улучшения свойств конечного препарата.

Итоги конференции Ломоносов 2026, в подсекции Химия живых систем, нанобиоматериалы и нанобиотехнологии показали разнообразие научных задач, представленных молодыми участниками из различных научных организаций, высокий уровень их подготовки. Выполненные исследования имели научную и практическую значимость.

Работа подготовлена в рамках выполнения государственного задания МГУ им. М.В. Ломоносова № 121041500039-8.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОДХОДОВ К ПРЕОДОЛЕНИЮ УСТОЙЧИВОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К β-ЛАКТАМНЫМ АНТИБИОТИКАМ

Генденов Р.М. [1], **Маряшина Е.А.** [1], **Козырев Н.А.** [2], **Лопухов А.В.** [2], **Клячко Н.Л.** [2]

[1] МГУ имени М.В. Ломоносова, Биотехнологический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 51.
[2] МГУ им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, кафедра Химической энзимологии, 119991, Москва, Ленинские Горы, д.1, стр. 11Б.
roman.gendenov@gmail.com

Аннотация. В докладе представлена информация об исследовании антибактериальной терапии при росте устойчивости микроорганизмов к антибиотикам. Изучено совместное действие грамицидина С и меропенема, влияние ингибитора металло-β-лактамаз и эффективность липосомальной системы доставки антибиотика и/или ингибитора. Показано, что применение комбинированного действия антибиотиков и ингибитора приводит к снижению минимальной подавляющей концентрации (МПК).

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, меропенем, грамицидин С, ингибитор, системы доставки.

Актуальность работы обусловлена ростом устойчивости патогенных микроорганизмов к антибиотикам, что снижает эффективность антибактериальной терапии и повышает вероятность тяжелых инфекционных осложнений. Особое значение имеют микроорганизмы группы ESKAPE (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter spp.*), характеризующиеся повышенной устойчивостью к противомикробным препаратам. Одним из ключевых механизмов резистентности является экспрессия генов β-лактамаз, в том числе металло-β-лактамаз, подавляющих действие β-лактамных антибиотиков [1]. В связи с этим возрастает необходимость разработки новых подходов к повышению эффективности действия антибактериальных препаратов. Перспективным направлением являются комбинированные подходы, позволяющие повысить эффективность существующих антибиотиков, снизить терапевтическую дозу и преодолеть резистентность. В отличие от поиска новых молекул, такие подходы требуют меньших временных и экономических затрат.

Целью работы является оценка влияния ингибитора LCTA-4059 (см. рисунок 1) на активность металло-β-лактамаз и совместного действия меропенема и грамицидина С, а также исследование возможности снижения МПК антибиотика в отношении *Escherichia coli* BL21(DE3) при помощи систем доставки.

Работа проводилась на клетках *E. coli* BL21(DE3) с индукцией IPTG для контролируемой продукции металло-β-лактамазы. МПК определяли методом последовательного разведения антибиотика в питательной среде с последующим внесением *E. coli* BL21(DE3). МПК фиксировали как минимальную концентрацию антибиотика, при которой не наблюдался рост бактерий. Данный параметр выбран, поскольку в настоящее время является стандартизированным показателем, отражающим эффективность антибиотика против бактериальных штаммов [2]. Изучались концентрации ингибитора в диапазоне от 1 до 200 нМ. Дополнительно анализировалось действие ингибитора, включенного в липосомальные системы доставки. Состав липосом: DPPC, холестерол, DSPE-PEG2000-COOH в мольном соотношении 1,87:1:0,15.

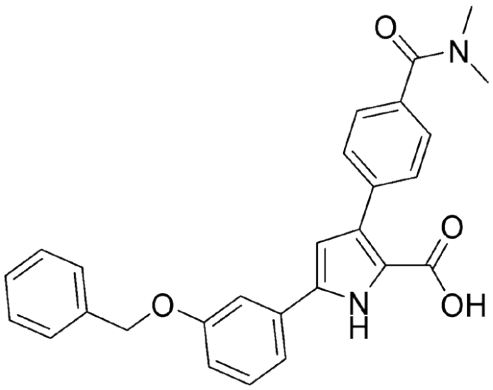


Рисунок 1. Структурная формула LCTA-4059

Добавление ингибитора LCTA-4059 приводило к снижению МПК меропенема с 16 до 0,5 мкг/мл, что указывает на эффективное подавление активности металло-β-лактамазы. Показано, что МПК меропенема в комбинации с грамицидином С снижается, что позволяет уменьшать эффективные концентрации антибиотиков и повышать антибактериальную активность. Синергетический эффект, возможно, связан с различием механизмов действия: меропенем подавляет синтез клеточной стенки, грамицидин С нарушает целостность цитоплазматической мембраны. Установлено, что включение ингибитора в липосомы сохраняло его активность, однако не приводило к усилению ингибирующего эффекта (см. таблицу 1).

Таблица 1. Влияние включения ингибитора LCTA-4059 в липосомы на МПК (мкг/мл.) меропенема в отношении *Escherichia coli* BL21(DE3). Состав липосом: DPPC, холестерол, DSPE-PEG2000-COOH в мольном соотношении 1,87:1:0,15.

Концентрация ингибитора, нМ	МПК меропенема, ингибитор не включенный в липосомы, мкг/мл.	МПК меропенема, ингибитор включенный в липосомы, мкг/мл.
6,25	<1	<1
3,13	<1	2
1,56	2	2
0,78	2	4
0,39	4	4
0,2	4	4
0	8	8

Таким образом, было показано, что ингибитор металло-β-лактамаз и совместное применение грамицидина С и меропенема снижают МПК антибиотика. Липосомальная форма доставки сохраняет биологическую активность ингибитора, но не повышает эффективность действия. Полученные данные свидетельствуют о перспективе комбинированных подходов для преодоления устойчивости микроорганизмов к β-лактамным антибиотикам.

Данное исследование частично финансировалось Российским научным фондом (грант 22-13-00261П), государственной темой МГУ (121041500039-8 и 123032300028-0) и Программой развития МГУ (покупка приборов).

Список литературы

1. Pendleton, J. N., Gorman, S. P., & Gilmore, B. F. (2013). Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 11(3), 297–308.
2. Kowalska-Krochmal, B.; Dudek-Wicher, R. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens* 2021, 10, 165.

УДК 616-006.61

УРОВЕНЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФРАГМЕНТОВ IgG В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КАК МАРКЕР РАКА ЛЕГКОГО, ПИЩЕВОДА И ЖЕЛУДКА

Гершкович К.Б.[1], Гоуфман Е.И.[2], Тихонова Н.Б.[2], Кушлинский Н.Е.[3], Низяева Н.В.[2], Алексанкин А.П.[2], Степанова И.И.[2], Степанов А.А.[2]

[1]Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, г. Москва, РФ;
[2]Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского, г. Москва, РФ
[3]НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, г. Москва, РФ
gkb-09@mail.ru

Аннотация. Проведено исследование уровня продуктов протеолиза IgG плазмином в сыворотке крови с применением разработанного нами ранее ИФА-теста с целью демонстрации возможности ранней неинвазивноой диагностики онкозаболеваний. В качестве детектора использована тяжелая цепь плазмина, иммобилизованная на дне планшета. Продемонстрированы высокие чувствительность и специфичность метода, превосходящие показатели известных тестов, при раке легкого пищевода и желудка.

Ключевые слова: плазмин, протеолиз IgG, ИФА, диагностика онкозаболеваний.

Согласно статистике во всем мире происходит неуклонный рост количества онкологических заболеваний. Рак легких, пищевода и желудка входят в число 10 самых распространенных онкозаболеваний. Одной из главных причин высокой смертности является поздняя диагностика опухолей из-за бессимптомного начала патологии. Использование гастроскопии и биопсии для ранней диагностики, скрининговых тестов не всегда возможно. Применяемые традиционные опухолевые маркеры не обладают достаточной специфичностью и чувствительностью [1]. Разрабатываемые новые биомаркеры сложны в получении, а направленные на идентификацию протеолитических фрагментов белков в качестве потенциальных онкомаркеров еще не стандартизированы для клинического анализа и далеко не всегда доступны из-за ресурсов [2]. Несмотря на поиск протеолитических фрагментов белков, циркулирующих в кровотоке, еще не создана панель онкомаркеров для ранней и улучшения специфической диагностики онкозаболеваний.

В окружении злокачественной опухоли повышена активность протеаз и их активаторов. Центральное место занимает плазмин (Pm) – один из ключевых ферментов гемостаза и онкогенеза. Pm образуется из циркулирующего в кровотоке плазминогена (Pg) под действием активаторов тканевого и урокиназного типов, и содержит в тяжелой цепи лизин-связывающие центры (LBS). Pm участвует в деградации экстрацеллюлярного матрикса и базальной мембраны, что способствует развитию кровеносной системы в микроокружении опухоли, улучшению ее кровоснабжения, инвазии и метастазированию.

В присутствии Pm может происходить специфический протеолиз одного из основных белков плазмы крови – иммуноглобулина G (IgG) с образованием фрагментов с доступным С-концевым лизином (IgG-Lys), которые могут связываться с плазминогеном [3,4,5]. Нахождение IgG в зоне повышенной активности Pm может привести к усилению его протеолиза в микроокружении опухоли и выходу IgG-Lys в кровоток.

При исследовании рака предстательной железы методом ИФА нами был обнаружен в сыворотке крови больных повышенный уровень IgG, способных связаться с Pg, иммобилизованном на планшете, по сравнению со здоровыми донорами. Показано, что циркулирующие IgG-Lys могут связываться как с плазминогеном, так и с тяжелой цепью плазмина (Pg-H) через их LBS [5,6]. Результаты ИФА оценивали спектрофотометрически по значениям оптической плотности образцов при 450 нм (A_{450}). Величина A_{450} на планшетах с Pg-H была ~ в 2,8 раза выше, чем с Pg. На основании ROC-анализа значений

A_{450} чувствительность и специфичность составили 93% и 95 %, соответственно, что значительно выше эффективности общепринятого теста с PSA (простата-специфический антиген).

В результате ***был предложен метод*** ИФА с высокой чувствительностью и специфичностью для диагностики рака простаты. Применение этого теста позволило впервые дифференцировать рак и доброкачественную гиперплазию предстательной железы (ДГПЖ) с чувствительностью 93% и специфичностью 76 %, что невозможно в тесте с PSA.

Настоящая работа посвящена анализу уровней протеолитических продуктов деградации IgG в сыворотке крови онкологических пациентов при разной локализации опухоли (легкие, пищевод, желудок) в сравнении со здоровыми донорами. Обсуждаются недавние результаты ИФА, полученные в 3 независимых сериях экспериментов.

Цель работы: продемонстрировать возможность ранней неинвазивноой диагностики онкозаболеваний методом ИФА с Pg-H в качестве детектора и фрагментами IgG с доступным С-концевым лизином (IgG-Lys) в качестве онкомаркеров независимо от места локализации опухоли.

Объектом исследования были сыворотки крови онкологических пациентов на различных стадиях заболевания и сыворотки крови здоровых доноров. Проведено 3 независимых серии экспериментов с локализацией опухолей в легких, пищеводе и желудке. Пациенты и доноры обследовались в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Все выполняемые процедуры были проведены в соответствии с этическими нормами (2019,2021), а участники исследования дали свое информационное согласие. Клинический диагноз у всех пациентов был подтвержден при морфологическом исследовании опухоли и соответствовал Международной гистологической классификации (ВОЗ, 2019). Образцы сыворотки крови больных и здоровых доноров получали стандартным методом до лечения больных, замораживали и хранили до проведения исследования.

Гистологические типы опухолей разной локализации: легкие (аденокарцинома 37%, плоскоклеточный рак 47%), пищевод (аденокарцинома 13%, плоскоклеточный рак 87%), желудок (аденокарцинома 84%, плоскоклеточный рак %).

Получение тяжелой цепи Pm (**Pg-H**). Pg выделяли из плазмы донорской крови человека аффинной хроматографией на Lys-Sepharose 4B при 4°C по методу Deutsch D.G., Mertz E.T. в присутствии апротинина с модификациями [5]. Тяжелую цепь плазмина получали из Pg его активацией урокиназой (EC 3.4.21.31) в условиях, исключающих автолиз, с последующим восстановлением S-S-связей между цепями, их ацилированием и отделением Pg-H от других компонентов аффинной хроматографией на Lys-Sepharose 4B [5]. Чистоту препаратов оценивали методом SDS-электрофореза в 12% ПААГ.

Иммуноферментный анализ сывороток крови пациентов и здоровых доноров проводили, как описано выше [6,7] с Pg-H, сорбированной на дне лунок 96-луночного планшета SPL Maxibind (SPL, Korea), в качестве детектора циркулирующих фрагментов IgG-Lys (потенциальных онкомаркеров) с небольшими модификациями: использован PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1,8 mM KH_2PO_4; pH 7,4) и окрашивание тетраметилбензидином (ТМБ) 15 мин при 37°C. После остановки реакции 2M H_2SO_4 регистрировали A_{450} исследуемых образцов, используя многоканальный спектрофотометр.

Уровень фрагментов IgG-Lys, связавшихся с Pg-H, выражали в виде коэффициента IgG-LysK, равного отношению значения A_{450} образца сыворотки в ИФА к значению A_{450} cut-off, полученному с помощью ROC-анализа. IgG-LysK более 1 считали положительным значением, а менее 1 – отрицательным. Рассчитывали медианы и квартили, так как распределение исследуемых величин отличалось от распределения Гаусса. Для оценки информативности уровня фрагментов IgG-**Lys** проводили ROC-анализ.

Результаты. Методом ИФА показано, что медианы IgG-LysK в сыворотках крови больных раком легкого, пищевода и желудка значимо выше, чем в группе здоровых доноров. У пациентов с доброкачественными новообразованиями легкого также наблюдали тенденцию к повышению IgG-Lys. В сыворотке крови больных раком легкого не выявлено связи IgG-LysK с размером опухоли, наличием метастазов и стадией заболевания. ROC-анализ уровней IgG-Lys при раке легкого, пищевода и желудка показал высокую чувствительность и специфичность: (83%,91%), (91%,85%) и (68%,85%), соответственно. Обсуждаются причины ложноотрицательных значений IgG-LysK. Оценены некоторые показатели гемостаза.

Заключение. Продемонстрирована возможность применения метода ИФА, основанного на протеолитической активности злокачественной опухоли, для диагностики рака легкого, пищевода и желудка, Высокая чувствительность позволяет использовать Тест как неинвазивный для ранней диагностики рака. Однако, он не пригоден для дифференциации подтипов опухолей и дифференциальной диагностики онкологических заболеваний в целом.

Работа выполнена в рамках тем Госзаданий: № гос. регистрации: 125020601631-3. (ИБХФ) и Рег. № ГЗ: 126030418293-3; FURG-2026-0023 (РНЦХ).

Список литературы

1. Yang Y, Huang X, Zhou L, et al. Clinical use of tumor biomarkers in prediction for prognosis and chemotherapeutic effect in esophageal squamous cell carcinoma // BMC Cancer. – 2019. – Vol.19. – No.1. – P.526. – 525.
2. Sameen Zafar, Amna Hafeez, Hania Shah, Iqra Mutiullah et al. Emerging biomarkers for early cancer detection and diagnosis: challenges, innovations, and clinical perspectives // European Journal of Medical Research. – 2025. – Vol.30. – P.760–793.
3. Harpel P.C., Sullivan R., Chang T.S. Binding and activation of plasminogen on immobilized immunoglobulin G. Identification of the plasmin-derived Fab as the plasminogen-binding fragment // J. Biol. Chem. – 1989. – Vol. 264. – No.1. – P. 616–624.
4. Brezski R.J., Jordan R.E. Cleavage of IgGs by proteases associated with invasive diseases: an evasion tactic against host immunity? // MAbs. – 2010. – Vol. 2, – No. 3. – P. 212–220.
5. Aisina R, Mukhametova L, Gershkovich K, et al. Effect of specific cleavage of immunoglobulin G by plasmin on the binding and activation of plasminogen // J. Bioorgan Chem. 2018; – Vol. 44.–№ 2. – P. 210–216.
6. Гоуфман Е.И., Яковлев В.Н., Тихонова Н.Б., Матевосян К.Ш, Болтовская М.Н., Айсина Р.Б., Мухаметова Л.И, Гершкович К.Б Увеличение концентрации продуктов деградации IgG в циркуляции при раке предстательной железы // Бюллетень экспериментальной биологии и медицин. – 2018, – Том 166. – № 1. – С. 598 -– 602.
7. Lokshin A., Mikhaleva L.M., Goufman E.I., Boltovskaya M.N., Tikhonova N.B., Stepanova I.I., Stepanov A.A. et al. // Proteolyzed Variant of IgG with Free C-Terminal Lysine as a Biomarker of Prostate Cancer // Biology. – 2021. – Vol.10, – No.8. – P.817–827.

УДК 663.1;504

ВНЕДРЕНИЕ ДВУХСТУПЕНЧАТОГО БИОКАТАЛИТИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ПЕРЕРАБОТКИ ОТХОДОВ СПИРТОВЫХ ПРОИЗВОДСТВ

Гладченко М.А.[1], Гайдамака С.Н.[1], Маслова О.В.[1], Корнилова А.А.[2]

[1] Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г.Москва, РФ
[2] Физический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г.Москва, РФ
gladmarina@yandex.ru

Аннотация. На примере действующего предприятия сформулирован и реализован на практике подход, подразумевающий внедрение двухступенчатого биокаталитического процесса переработки отходов спиртовой барды при проведении корректировки и внедрения проектного инженерного решения и вывода производственного процесса переработки отходов спиртового производства на целевые значения основных показателей. Достигнуть целевого результата удалось путем замены исходно предложенного по коммерческому проекту анаэробного мезофильного (35 °С) реактора на двухступенчатый процесс анаэробного сбраживания спиртовой барды, включавший биореакторы периодического действия (SBR), функционирующие по принципу контакт процесса, перед подачей на вторую стадию - аэробной конверсии, включающей процессы нитри-денитрификации.

Ключевые слова: спиртовая барда, анаэробные процессы, биокатализатор, биогаз, гибридные процессы.

Ежегодный мировой рост объемов производств, связанных с получением и применением этилового спирта, составляет 5-10% [1]. Требования законодательства обязывают промышленные предприятия выполнять мероприятия по утилизации/переработке отходов [2].

Спиртовая барда - сток (отход) после производства спирта из мелассы. Она представляет собой высококонцентрированную сточную воду с высокими значениями ХПК (до 70 - 100 г/л) и общего азота (до 3,5 г/л), температурой 80 - 90°С. На заводе при производстве 30000 л спирта за сутки вырабатывается до 350000 л барды. Для минимизации экологической нагрузки промышленную спиртовую барду подвергают переработке [3], для этого используются комбинированные подходы, основанные на сочетании физических и химических методов, а также привлечении биокатализаторов [4]**.** Разработка и внедрение новых гибридных (физических, химических и биологических) подходов в ходе переработки отходов является актуальным, так как позволяет повышать эффективность глубокой переработки, получать безопасные для окружающей среды продукты [5-7].

На этапе биотехнологической переработки спиртовой барды ключевую роль играет значение показателя химического потребления кислорода (ХПК). Исходно барда содержит 70 - 100 г/л ХПК и до 3,5 г/л общего азота. На рынке широко представлены готовые инженерные решения по переработке спиртовой барды с получением биогаза. Переработка спиртовой барды с привлечением биокатализаторов обычно осуществляется при последовательном сочетании двух режимов - анаэробного и аэробного. При расширении производственных мощностей и ужесточении нормативов по целевым показателям процессов очистки может потребоваться корректировка существующих решений по утилизации отходов. Актуальным является поиск возможностей для быстрой корректировки коммерческих готовых проектных инженерных решений с учетом особенностей реального производства и вывода производственных процессов на целевые показатели.

На примере действующих очистных сооружений спиртового производства предложен и реализован подход к внедрению двухступенчатого биокаталитического процесса переработки отходов на этапе совмещения коммерческого проектного решения по модернизации системы переработки барды с уже действующей на предприятии системой очистки. Согласно исходному проектному решению по модер-

низации на первой (анаэробной) стадии переработку спиртовой барды предполагалось осуществлять в UASB реакторах с разведением спиртовой барды артезианской водой в соотношении 1:1,5, что соответствовало бы снижению исходной концентрации общего азота до 1,3 г/л, и должно было обеспечить получение гранулированного ила. Однако, на практике соотношение добавляемой к барде воды составило 3:1. При таких условиях в UASB реакторе ил гранулировался плохо и вымывался из реакторов, производительность реакторов составляла всего половину проектной мощности и не позволяла перерабатывать весь объем поступающих с производства стоков барды.

На этапе совмещения действующего спиртового производства и готового коммерческого проектного решения по анаэробной переработке спиртовой барды в биогаз (1-ая стадия) следовало выявить лимитирующие факторы и предложить возможности корректировки исходного проектного инженерного решения для снижения нагрузки по ХПК на аэробные очистные сооружения (2-ая стадия), уменьшения общего расхода сбрасываемых стоков, уменьшения потребления артезианской воды.

В ходе решения поставленных задач была проведена инженерная реконструкция проектного решения, заключающаяся в добавлении отстойника, куда после анаэробной ступени собирался сток и осуществлялся рецикл оседающего ила и воды. Данное решение позволило принимать весь промышленный сток, а расход разбавляющей воды сократить в 3 раза до соотношения барда-вода 1:1. Дальнейшее уменьшение расхода разбавляющей воды за счет рецикла уже приводило к нестабильности процесса анаэробной очистки. Эффективность удаления ХПК по завершению анаэробной стадии составляла 55 - 60% при целевом показателе не менее 70%.

В результате проведенных экспериментальных исследований показано, что отказ от одноступенчатого UASB реактора и внедрение двухступенчатой схемы сбраживания спиртовой барды в условиях SBR реактора позволяет повысить эффективность очистки сток спиртового завода по ХПК с 55 - 60% до 75 - 85%, и при этом полностью отказаться от использования артезианской воды для первоначального разбавления стока [4].

Для запуска 1-ой ступени очистки можно использовать как мезофильный ил существующего процесса переработки спиртовой барды, так и термофильный ил со станции сбраживания осадков городских сточных вод. При этом адаптация термофильного ила к субстрату и температурному режиму происходит быстрей.

Наиболее трудно разлагаемыми веществами в исходной барде являются азотсодержащие соединения. Для их глубокого гидролиза требуется длительный период адаптации ила как на 1-ой, так и, особенно, на 2-ой ступени сбраживания.

Для коррекции pH исходной барды в сторону щелочных значений и снижения температуры перед загрузкой в анаэробный реактор до 65 °С может использоваться в качестве разбавителя очищенный сток после 2-ой ступени очистки в процентном соотношении 35% - 40% от общего объема.

По сравнению с исходно предлагаемым коммерческим проектным инженерным решением по анаэробной переработке спиртовой барды в UASB реакторе предлагаемый 2-х ступенчатый по температурному режиму процесс с SBR реактором, адаптированным илом и с отсутствием разбавления барды артезианской водой позволяет повысить эффективность процесса по снижению ХПК на 15 - 30%, при этом сократить объем стока, поступающего на дальнейшую очистку до 40%.

Исследование выполнено в рамках государственного задания МГУ имени М.В.Ломоносова, регистрационный номер 121041500039-8.

Список литературы

1. Кононенко В. В. и др. О производстве и перспективах применения этилового спирта в России // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2018. – №. 2. – С. 44-47.

2. Федеральный закон от 22.11.1995 № 171-ФЗ «О государственном регулировании производства и оборота этилового спирта, алкогольной и спиртосодержащей продукции и об ограничении потребления (распития) алкогольной продукции».

3. Евдокимов Н. С., Каленчук А. А., Даньшина В. В. Влияние концентрации мелассы на морфометрию клеток дрожжей, выход биомассы и степень очистки спиртовой барды //Вестник Пермского

национального исследовательского политехнического университета. Химическая технология и биотехнология. 2023. №. 2. С. 111-128.
4. Гладченко М. А. и др. Разработка двухступенчатого процесса анаэробной переработки спиртовой барды на действующих очистных сооружениях спиртового производства //Инженерная физика. – 2024. – №. 8. – С. 15-27.
5. Гладченко М. А. и др. Перспективы развития подходов к переработке отходов, содержащих нитроцеллюлозу //Экологические системы и приборы. – 2026. – №. 1. – С. 3-21.
6. Гайдамака С. Н. и др. Биоконверсия лигнинсодержащей биомассы в водород в условиях кислотогенеза: исследование оптимизации процесса //Альтернативная энергетика и экология (ISJAEE). – 2025. – №. 7. – С. 28-45.
7. Гладченко М. А. и др. Технические решения для модернизации стадий физико-химической и биокаталитической очистки сточных вод мясокомбината //Инженерная физика. – 2025. – №. 5. – С. 21-35.

УДК 543.544-414.6

РАЗРАБОТКА АФФИННОГО СОРБЕНТА ДЛЯ ОЧИСТКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ МРНК ОТ ДВУЦЕПОЧЕЧНЫХ РНК ПРИМЕСЕЙ

Глазунова М.Г.[1], Мелихова Т.Д. [2], Шошина Н.С. [2], Шарабрин С.В.[3], Кисаков Д.Н.[3], Комякова А.М.[1,2], Терешин М.Н.[2], Иванов И.В.[1], Степаненко В.Н. [2]

[1] ФГБОУ ВО МИРЭА – Российский технологический университет, г. Москва, РФ
[2] ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), г. Москва, РФ
[3] ФБУН ГНЦ ВБ Вектор Роспотребнадзора, г. Новосибирск, РФ
glazmg23@gmail.com

Аннотация. В работе представлен ферментативный способ получения аффинного сорбента для очистки мРНК от иммуногенных примесей двуцепочечной РНК. В качестве лиганда использован рекомбинантный белок, содержащий домены связывания дцРНК, ковалентно иммобилизированный на модифицированную агарозную матрицу реакцией транспептидации Сортазой А. Испытания на модельной смеси подтвердили селективное связывание примесной дцРНК, устойчивость сорбента к стандартным процедурам санации.

Ключевые слова: мРНК, дцРНК, хроматография, сортаза А, дцРНК-связывающий домен.

При производстве мРНК-препаратов основным побочным продуктом транскрипции мРНК *in vitro* являются высокореактогенные молекулы дцРНК, которые приводят к снижению эффективности терапевтических молекул РНК [1]. Большинство использующихся на данный момент методов downstream направлены на многофункциональную очистку мРНК от посторонних примесей таких как белки, ДНК и короткие фрагменты РНК, которая не является эффективной в очистке смеси от трудноотделяемых фрагментов дцРНК [2,3]. Для решения этой проблемы используются ОФ ВЭЖХ и очистка на целлюлозе, однако эти методы являются менее предпочтительными для современного производства из-за своих ограничений. Перспективным технологическим решением очистки терапевтических РНК от иммуногенных примесей является использование аффинных сорбентов. В результате нашего исследования разработан высокоспецифичный к дцРНК сорбент, получаемый путем ферментативной иммобилизации рекомбинантного белкового лиганда, связывающего дцРНК, на модифицированную агарозную матрицу. Используемый рекомбинантный белок DRBM (DRBM – англ. Double-stranded RNA Binding Motif) содержит два домена, связывающие дцРНК, и специфическую последовательность LPXTG (где X – любая аминокислота). Биоконъюгация лиганда опосредована Ca^{2+}-зависимой сортазой А, которая распознает эту аминокислотную последовательность и расщепляет ее между остатками треонина и глицина с образованием промежуточного комплекса фермент-субстрат через тиоэфирную связь между треонином субстрата и цистеином активного сайта фермента (Субстрат-LPXT-сортаза А). Затем эта связь подвергается нуклеофильной атаке аминогруппы олигоглицина, которым модифицирована агарозная матрица, что приводит к образованию новой пептидной связи между треонином субстрата и глицином матрицы (субстрат-LPXT-G-матрица). Осуществление такой биоконъюгации позволяет не только ковалентно «пришить» лиганд к матрице, но и обеспечивает строгую его ориентацию [4,5]. В работе доказана специфичность полученного сорбента к дцРНК на модельной смеси. Показано, что опытный образец полученного сорбента устойчив к санации в течение 10 циклов 0,1 М NaOH и способен выдерживать 10 циклов непрерывного использования без потери статической емкости. На данный момент проводится работа по оценке эффективности использования полученного аффинного сорбента в условиях реального производства мРНК-препаратов.

Список литературы
1. Clark N. E. и др. An immuno-northern technique to measure the size of dsRNA byproducts in in vitro transcribed RNA // Electrophoresis. 2024. Т. 45, № 17–18. С. 1546–1554.
2. Rosa S. S. и др. mRNA vaccines manufacturing: Challenges and bottlenecks // Vaccine. 2021. Т. 39, № 16. С. 2190–2200.
3. Zhang J. и др. Recent Advances and Innovations in the Preparation and Purification of In Vitro-Transcribed-mRNA-Based Molecules // Pharmaceutics. 2023. Т. 15, № 9. С. 2182.
4. Jacobitz A. W. и др. Sortase Transpeptidases: Structural Biology and Catalytic Mechanism // Advances in Protein Chemistry and Structural Biology. Elsevier, 2017. Т. 109. С. 223–264.
5. Tereshin M. N. и др. Affinity Resins for the Isolation of Immunoglobulins G Obtained Using Biocatalytic Technology // IJMS. 2024. Т. 25, № 3. С. 1367.

УДК 571.27

ДВОЙСТВЕННАЯ ФУНКЦИЯ RAGE В НЕЙТРОФИЛАХ ЧЕЛОВЕКА: РЕЦЕПТОРНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПАТОГЕНОМ И КОНТРОЛЬ ЭФФЕКТОРНЫХ ФУНКЦИЙ

Голенкина Е.А.[1], **Наварнова С.В.**[2], **Галкина С.И.**[1], **Судьина Г.Ф.**[1]

[1] НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
[2] Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
golyesha@mail.ru

Аннотация. В нейтрофилах человека рецептор RAGE функционирует двунаправленно: бактериальные стимулы регулируют его экспрессию и высвобождение растворимой формы, тогда как сам RAGE, распознавая патоген-ассоциированные лиганды, контролирует ключевые эффекторные функции нейтрофилов. Известный анти-RAGE аптамер дозозависимо стимулирует продукцию АФК/NO и подавляет $(TTAGGG)_4$-индуцированный оксидативный ответ, демонстрируя потенциал для регуляции врожденного иммунитета.

Ключевые слова: нейтрофил, RAGE, *S. typhimurium*, окислительный взрыв, синтетические олигонуклеотиды.

Рецептор к конечным продуктам гликирования (RAGE, Receptor for Advanced Glycation End-products), изначально описанный как сенсор AGE, в настоящее время признан полилигандным рецептором, распознающим широкий спектр молекулярных структур. В литературе накоплен обширный массив данных, описывающих RAGE-опосредованные сигнальные пути при системном воспалении и метаболических нарушениях. При этом нейтрофилы — ключевые эффекторы врождённого иммунитета и первая линия защиты от инфекций — в существующих моделях рассматриваются преимущественно как доноры лигандов RAGE. Бактерицидный потенциал нейтрофилов реализуется через скоординированную активацию NADPH-оксидазы и синтазы оксида азота (NO), однако прямая роль RAGE в регуляции этих ферментных систем изучена недостаточно. Целью исследования стало изучение экспрессии и динамики RAGE в нейтрофилах человека и определение его вклада в регуляцию ферментативной продукции активных форм кислорода (АФК) и NO.

Экспериментальная модель базировалась на взаимодействии нейтрофилов, выделенных из периферической крови здоровых доноров, с грамотрицательными бактериями *Salmonella typhimurium*, бактериальным липополисахаридом (LPS), хемотактическим пептидом fMLP, а также синтетическими CpG-олигонуклеотидами (CpG-ОДН) [1], имитирующими неметилированные мотивы бактериальной ДНК. Экспрессию RAGE оценивали иммунофлуоресцентными методами. Продукцию активных форм кислорода и оксида азота детектировали с помощью флуоресцентных зондов, жизнеспособность клеток оценивали по экстернализации фосфатидилсерина с использованием флуоресцентно-меченого аннексина V (Annexin V). Для специфического блокирования RAGE-сигналинга применяли низкомолекулярный ингибитор FPS-ZM1.

Взаимодействие нейтрофилов с *S. typhimurium* и CpG-ОДН сопровождается увеличением транскрипции гена *AGER* [2]. Несмотря на низкий уровень поверхностной экспрессии, в нейтрофилах выявлен существенный внутриклеточный пул RAGE (рисунок 1,а). При адгезии клеток к покрытому фибриногеном субстрату происходит быстрое высвобождение растворимой формы рецептора в околоклеточное пространство, усиливающееся в присутствии бактерий (MOI ~20), LPS (100 нг/мл) и fMLP (0.1 μM), но не чувствительное к действию CpG-ODN (0.5 μM) (рисунок 1,б).

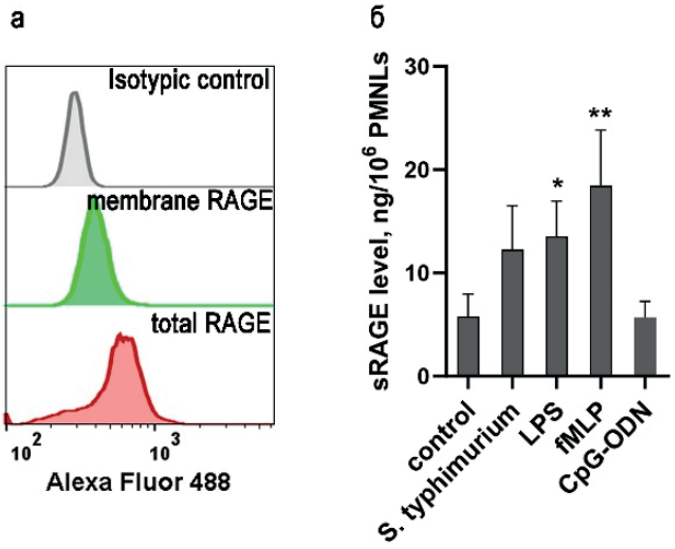


Рисунок 1. Экспрессия и локализация RAGE в нейтрофилах человека:
а) гистограммы флуоресценции, оценка поверхностной (membrane) и общей (total) экспрессии RAGE;
б) количественная оценка уровня внеклеточного RAGE в супернатантах активированных клеток
(данные представлены как mean ± SEM, *p < 0.05, **p < 0.01, n = 4)

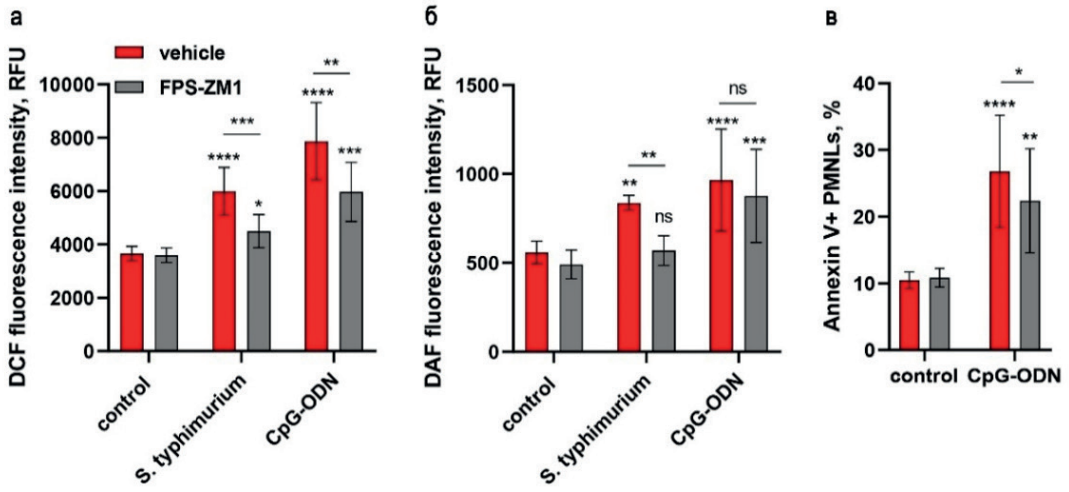


Рисунок 2. Влияние блокады RAGE на функциональные ответы и выживаемость нейтрофилов при взаимодействии с бактериями и CpG-ODN: а) продукция АФК (n = 5);
б) синтез оксида азота (n = 5); в) доля апоптотических клеток (n = 3)
(данные представлены как mean±SEM, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001)

Роль RAGE носит двоякий характер: с одной стороны, экспрессия и субклеточная локализация рецептора модулируются патогеном и его метаболитами, с другой – запуск эффекторных функций нейтрофилов в ответ на стимул опосредован сигналингом через RAGE. Ингибирование RAGE препаратом FPS-ZM1 (1 μM) достоверно подавляло: (1) образование АФК, индуцированное бактериями или CpG-ODN (0,5 μM); (2) синтез оксида азота, стимулируемый бактериями (Рисунок 2,аб), что подтверждает вовлечённость RAGE в реализацию прооксидантного ответа. Блокирование RAGE-сигналинга также снижало проапоптотический эффект CpG-ОДН (0.5 μM) (Рисунок 2,в), указывая на участие рецептора в регуляции продолжительности жизни нейтрофилов и контроле своевременного разрешения воспаления.

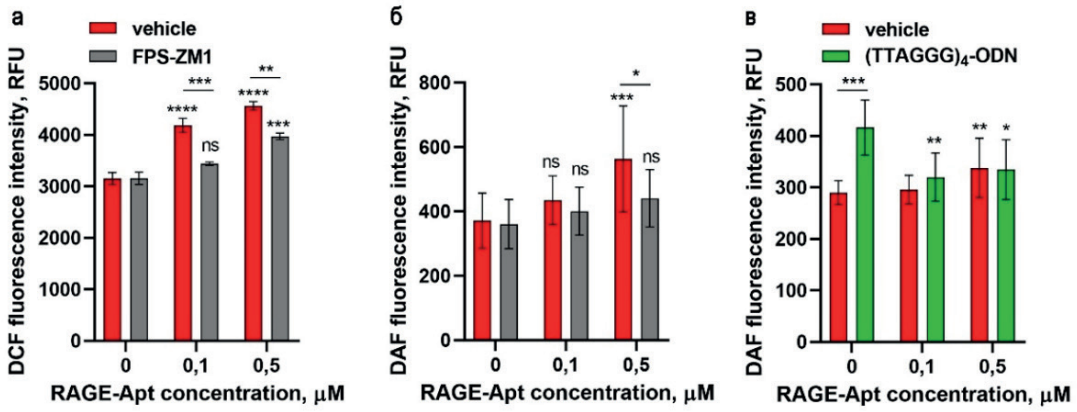


Рисунок 3. Влияние RAGE-Apt на прооксидантную активность нейтрофилов и его модуляция ингибитором FPS-ZM1 и олигонуклеотидами: продукция (n = 4) (а) и синтез оксида азота (n = 4) (б) при стимуляции RAGE-Apt и её подавление FPS-ZM1; в) дозозависимое ингибирование аптамером $(TTAGGG)_4$-индуцированного синтеза оксида азота (n = 3)
(данные представлены как mean±SEM, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001)

Отдельное внимание уделено оценке иммуномодулирующего потенциала селективно связывающегося с RAGE олигонуклеотидного аптамера (RAGE-Apt), с описанным защитным эффектом в экспериментальной модели диабетической нефропатии [3]. В нейтрофилах RAGE-Apt вызывал дозозависимую стимуляцию NADPH-оксидазы (Рисунок 3,а) и синтазы оксида азота (Рисунок 3,б). Указанные эффекты были чувствительны к действию FPS-ZM1 (1 μM), что подтверждает его рецептор-зависимую стимулирующую активность. В то же время аптамер проявлял ингибирующее действие в отношении олигонуклеотидов, содержащих теломерные повторы $(TTAGGG)_4$, — структур, имитирующих фрагменты клеточной ДНК: в частности, было продемонстрировано, что RAGE-Apt дозозависимо подавляет $(TTAGGG)_4$-индуцированный синтез оксида азота в нейтрофилах (Рисунок 3,в), указывая на его потенциал для тонкой модуляции прооксидантных сигнальных путей.

Полученные данные выводят функцию RAGE за рамки эндотелиального сигналинга, демонстрируя его роль в регуляции активности нейтрофилов человека. Экспрессия и субклеточная локализация рецептора динамически меняются при контакте с бактериями и их метаболитами. Выявленная чувствительность продукции АФК и NO к ингибированию RAGE указывает на прямую регуляторную роль рецептора в сборке NADPH-оксидазного комплекса и модуляции экспрессии индуцибельной синтазы оксида азота. Кроме того, RAGE контролирует апоптоз нейтрофилов: блокада рецептора снижает проапоптотический эффект CpG-ОДН, что критично для своевременного разрешения воспаления. В условиях хронической гипергликемии дисрегуляция этого механизма может поддерживать оксидативно-воспалительный цикл, усугубляя тканевое повреждение при диабетических осложнениях.

Отдельного внимания заслуживает агонистическая активность изученного анти-RAGE аптамера, дозозависимо стимулирующего продукцию АФК и NO, вероятно, за счёт аллостерической модуляции рецептора. При этом данный аптамер проявляет выраженный антагонизм в отношении $(TTAGGG)_4$-олигонуклеотидов, открывая перспективы для комбинированных иммуномодуляторов.

Список литературы

1. Vollmer J (2006) CpG motifs to modulate innate and adaptive immune responses. *Int Rev Immunol* 25(3-4):125-134.

2. Viryasova GM, *et al.* (2021) Magic Peptide: Unique Properties of the LRR11 Peptide in the Activation of Leukotriene Synthesis in Human Neutrophils. *International Journal of Molecular Sciences* 22(5).

3. Matsui T, *et al.* (2017) RAGE-Aptamer Blocks the Development and Progression of Experimental Diabetic Nephropathy. *Diabetes* 66(6):1683-1695.

УДК 376:15

ГЕНЕРАТИВНЫЕ ML МОДЕЛИ ДЛЯ ДИЗАЙНА ФЕРМЕНТОВ

Головин А.В.,[1,2] Пермяков И.С.,[1,2] Герасева Е.П., [1,2] Чуйко Я.В. [1,2]

[1] Факультет Биоинженерии и Биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
[2] Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова , г. Москва, РФ
golovin@fbb.msu.ru

Аннотация. Дизайн ферментов и антител с ферментативной активностью, в частности, является сложной задачей, требующей одновременного сохранения каркаса фолда, формирования каталитического центра в петлях и обеспечения аллостерической регуляции. За последние два года появилось множество методов глубокого обучения для генерации белковых структур и последовательностей (RFdiffusion, ProteinMPNN, LigandMPNN, Chai, BioEmu). Однако их применимость к задаче встраивания жесткого каталитического мотива в гибкие CDR-петли и последующего предсказания активности систематически не оценивалась.

Ключевые слова: каталитические антитела, дизайн белков, RFdiffusion, ProteinMPNN, глубокое обучение, QM/MM метадинамика

В работе проведена систематическая валидация современных вычислительных подходов на примере дизайна абзимов, гидролизующих петлю RBD спайк-белка коронавируса. Основное внимание уделено ключевым этапам: генерация остова с заданным каталитическим мотивом, восстановление последовательности, оценка конформационной подвижности и прямое моделирование реакции. Показано, что стандартные версии RFdiffusion неспособны к взаимной трансляции и ротации жёстких блоков (каркас антитела и каталитический центр). Предложенные модификации с обратной связью по выравниванию мотива и адаптированная стратегия для RFdiffusion2 (с неиндексированным мотивом и затухающей коррекцией) позволили снизить среднеквадратичное отклонение каталитической геометрии с ~2.5 Å до ~1.2–1.8 Å в зависимости от размещения. При сравнении методов обратного фолдинга LigandMPNN статистически значимо превосходит ProteinMPNN (средний dMaSIF-скор 0.74 против 0.52), однако даже лучший из них не гарантирует сохранения жёсткой ферментоподобной геометрии в CDR-петлях. Метадинамика с tICA-коллективными переменными эффективна только при полном учёте подвижных доменов (для длинных CDR-H3), а для коротких петель требуются нелинейные CV, но с риском диссипации потенциала при высокой размерности. Сквозной конвеер RFdiffusion2 → LigandMPNN → Chai → QM/MM метадинамика с множественными репликами позволил получить абзимы с вычисленными барьерами активации 17–20 ккал/моль, что сопоставимо с известными ферментами и литературными данными по абзимам. Наиболее критичным этапом валидации оказался множественный запуск QM/MM-метадинамики, выявляющий вычислительную нестабильность каталитических остатков, невидимую в одиночных траекториях. Развитие подхода реализовано в модели для конструирования de novo белков с заданными функциональными мотивами, основанная на методах геометрического машинного обучения и flow matching. Подход позволяет генерировать белковые каркасы для нескольких пространственно разделённых мотивов даже в случаях, когда их взаимное расположение и порядок в последовательности заранее не заданы с целью дизайна сложных каталитических и связывающих центров.

Предложенные протоколы могут быть распространены на другие задачи дизайна ферментов и аллостерических регуляторов.

УДК 577.325.6:57.042.2

ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕНЗИМИДАЗОЛ-КАРБОКСАМИДЫ – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ СРЕДСТВА ТЕРАПИИ КОГНИТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ

Гончаров Н.В. [1,2], **Белинская Д.А.**[1]

[1] ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, РФ
[2] Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, РФ
ngoncharov@gmail.com

Аннотация. В докладе представлены результаты исследования бензимидазол-карбоксамидов как перспективных полифункциональных противодементных препаратов, сочетающих ингибирование холинэстераз и агонизм 5-HT4/6/7-рецепторов. Методами биохимического анализа и молекулярного моделирования выявлены закономерности «структура–активность», продемонстрирована высокая аффинность соединений к ключевым терапевтическим мишеням. Обоснован высокий потенциал бензимидазол-карбоксамидов как основы для новых средств терапии когнитивных нарушений.

Ключевые слова: нейродегенеративные заболевания, холинэстеразы, серотониновые рецепторы, бензимидазол-карбоксамиды.

По данным ВОЗ, доля людей старше 60 лет к 2050 году достигнет 22% от общей численности населения мира. За последние 30 лет распространенность сенильной деменции, включая болезнь Альцгеймера (БА), увеличились на 150% и 160% соответственно [1]. БА в значительной степени обусловлена хроническим дефицитом холинергической активности базального отдела переднего мозга, который в существенной мере определяется повышением активности холинэстераз (ХЭ). Это приводит к ухудшению памяти и когнитивных функций [2,3]. Повышение активности ХЭ, представленных ацетилхолинэстеразой (АХЭ) и бутирилхолинэстеразой (БХЭ) приводит к постепенному прекращению холинергической нейротрансмиссии. По мере прогрессирования заболевания в большей степени возрастает ферментативная активность БХЭ, так что этот фермент представляет собой главную терапевтическую мишень при БА.

Препараты, назначаемые при БА, – донепезил, ривастигмин, галантамин, такрин (ингибиторы ХЭ) и мемантин (антагонист NMDA-рецепторов) – могут улучшать когнитивные и поведенческие параметры, но их клиническая эффективность остается весьма умеренной [4]. Моноклональные антитела, разработанные с большими финансовыми затратами, не оправдали ожиданий в отношении клинической эффективности и безопасности. Ключевое ограничение современного подхода заключается в монотаргетности применяемых препаратов, тогда как этиология и патогенез сенильной деменции носят мультифакториальный характер. Помимо холинергической дисфункции, в патогенез вовлечены нарушения серотонинергической передачи, нейровоспаление, оксидативный стресс, амилоидная и тау-патология. В этой связи особую актуальность приобретает разработка полифункциональных (мультитаргетных) соединений, способных одновременно воздействовать на несколько патогенетических звеньев.

Мультитаргетные препараты имеют ряд преимуществ перед многокомпонентным терапевтическим комплексом: более предсказуемая фармакокинетика, меньшая вероятность непредсказуемых межлекарственных взаимодействий, минимальная лекарственная устойчивость, максимальная восприимчивость пациентов к терапии [5]. Перспективными представляются гибридные молекулы, сочетающие антихолинэстеразную активность и высокое сродство к G-белок-связанным рецепторам (GPCR). Так, синтезированы ингибиторы ХЭ, избирательно влияющие на гистаминовые H3-рецепторы [6], каннабиноидные рецепторы 2-го типа [7]. Рецепторы серотонина 5-HT4R, 5-HT6R и 5-HT7R представляют

особый интерес в качестве молекулярных мишеней для лечения сенильной деменции Альцгеймеровского типа. Так, стимуляция 5-HT4R замедляет образование внеклеточных амилоидных бляшек [8]. Частичный агонист 5-HT4R усмараприд вызывает повышение уровня ацетилхолина в коре головного мозга у крыс и повышение уровня растворимого предшественника амилоида, т.е. обладает потенциалом для предотвращения генерации Aβ [9]. 5-HT6R локализуются исключительно в ЦНС, где они модулируют уровни ГАМК и глутамата, способствуя вторичному высвобождению дофамина, норадреналина, ацетилхолина и других нейротрансмиттеров [10]. Предполагается, что агенты 5-HT6R могут быть полезны в составе препаратов мультитаргетного действия [11]. Агонисты 5-HT7R также могут быть эффективны для лечения когнитивных расстройств [12].

Азотсодержащие гетероциклические каркасы стали перспективным фармакофором благодаря их сходству с природными и синтетическими лекарственными средствами. Среди всех азотистых гетероциклических соединений бензимидазолы и их производные являются особо привлекательными молекулами, структурно близкими к природным нуклеотидам, что позволяет им взаимодействовать с многочисленными биополимерами в биологических системах [13]. В 1999 г. были впервые синтезированы бензимидазол-карбоксамиды (бензимидазолоны), одним из первых соединений этого класса был BIMU-8 – агонист 5-HT4R [14].

В наших исследованиях мы провели синтез ряда замещенных 1,3-дигидро-2-оксо-1H-бензимидазол-2-онов, совмещающих функции потенциальных ингибиторов ХЭ и агонистов 5-HTR, провели оценку их токсичности in silico, с помощью биохимических методов in vitro и in silico исследовали антихолинэстеразную активность синтезированных соединений и их способность связываться с рецепторами 5-HT4R, 5-HT6R и 5-HT7R. Согласно полученным данным, бензимидазолоны ингибируют БХЭ в целом более выраженно, чем АХЭ. Кроме того, по отношению к БХЭ характерен либо конкурентный (для одних), либо неконкурентный (для других) тип ингибирования, тогда как по отношению к АХЭ – преимущественно смешанный. Эти факты можно объяснить меньшим стерическим размером активного центра АХЭ по сравнению с БХЭ, что затрудняет проникновение массивных бензимидазол-карбоксамидов в активный центр АХЭ. Анализ зависимостей «структура-функция» выявил ряд закономерностей. Введение трифторметильной группы в бензольное кольцо усиливает ингибирующий эффект как в отношении АХЭ, так и БХЭ. Замена изопропильного заместителя у атома N3 бензимидазолонового остова на трет-бутильный повышает активность в отношении БХЭ и изменяет тип ингибирования с конкурентного на неконкурентный. Циклопропильный заместитель у атома N3, напротив, ассоциирован с более слабой ингибирующей способностью. Замена диэтиламиноэтильного заместителя в карбоксамидной части на диметиламиноэтильный снижает ингибирующую активность, особенно в отношении БХЭ.

Что касается серотонинергической активности препаратов, то данные in silico позволяют утверждать, что препараты связываются с 5-HT4R и 5-HT7R не слабее, чем с ХЭ, т.е. в терапевтически релевантных концентрациях. Дальнейшие эксперименты in vitro позволят провести количественную оценку серотонинергической эффективности исследуемых бензимидазол-карбоксамидов. Выявленные зависимости «структура-активность» и молекулярные механизмы взаимодействия бензимидазол-карбоксамидов с холинэстеразами и серотониновыми рецепторами создают основу для целенаправленного дизайна более эффективных и селективных лигандов. Полученные результаты свидетельствуют о высоком потенциале бензимидазолонов как основы для разработки принципиально новых препаратов, способных замедлить прогрессирование сенильной деменции и улучшить качество жизни пациентов.

Работа выполнена в рамках Госзадания ИЭФБ РАН № 075-00264-26-00.

Список литературы

1. Li X. et al. Global, regional, and national burden of Alzheimer’s disease and other dementias, 1990-2019 // Front Aging Neurosci. – 2022. – Vol. 14. – P. 937486.
2. Soria-Lopez J.A. et al. Alzheimer’s disease // Handb Clin Neurol. – 2019. – Vol. 167. – P. 231–255.
3. Mantzavinos V., Alexiou A. Biomarkers for Alzheimer’s Disease Diagnosis // Curr Alzheimer Res. – 2017. – Vol. 14. – P. 1149–1154.

4. García-Morales V. et al. Current Understanding of the Physiopathology, Diagnosis and Therapeutic Approach to Alzheimer's Disease // Biomedicines. – 2021. – Vol. 9. – No. 12. – P. 1910.
5. Talevi A. Multi-target pharmacology: possibilities and limitations of the "skeleton key approach" from a medicinal chemist perspective // Front Pharmacol. – 2015. – Vol. 6. – P. 205.
6. Darras F.H. et al. Synthesis, biological evaluation, and computational studies of Tri- and tetracyclic nitrogen-bridgehead compounds as potent dual-acting AChE inhibitors and hH3 receptor antagonists // ACS Chem Neurosci. – 2014. – Vol. 5. – No. 3. – P. 225–242.
7. Dolles D. et al. Aminobenzimidazoles and Structural Isomers as Templates for Dual-Acting Butyrylcholinesterase Inhibitors and hCB2 R Ligands To Combat Neurodegenerative Disorders // ChemMedChem. – 2016. – Vol. 11. – No. 12. – P. 1270–1283.
8. Rochais C. et al. Novel multitarget-directed ligands (MTDLs) with acetylcholinesterase (AChE) inhibitory and serotonergic subtype 4 receptor (5-HT4R) agonist activities as potential agents against Alzheimer's disease: the design of donecopride // J Med Chem. – 2015. – Vol. 58. – No. 7. – P. 3172–3187.
9. Nirogi R. et al. Usmarapride (SUVN-D4010), a 5-HT4 receptor partial agonist for the potential treatment of Alzheimer's disease: Behavioural, neurochemical and pharmacological profiling // Eur J Pharmacol. – 2023. – Vol. 947. – P. 175625.
10. Szałaj N. et al. Multidirectional in vitro and in cellulo studies as a tool for identification of multi-target-directed ligands aiming at symptoms and causes of Alzheimer's disease // J Enzyme Inhib Med Chem. – 2020. – Vol. 35. – No. 1. – P. 1944–1952.
11. Czarnota-Łydka K. et al. Multitargeting the Action of 5-HT6 Serotonin Receptor Ligands by Additional Modulation of Kinases in the Search for a New Therapy for Alzheimer's Disease: Can It Work from a Molecular Point of View? // Int J Mol Sci. – 2022. – Vol. 23. – No. 15. – P. 8768.
12. Quintero-Villegas A., Valdés-Ferrer S.I. Central nervous system effects of 5-HT7 receptors: a potential target for neurodegenerative diseases // Mol Med. – 2022. – Vol. 28. – No. 1. – P. 70.
13. Chalkappa P.K.B. et al. The medicinal panorama of benzimidazoles and their scaffolds as anticancer and antithrombotic agents: A review // Arch Pharm (Weinheim). – 2023. – Vol. 356. – No. 10. – P. e2300206.
14. Berque-Bestel I., Lezoualc'h F. Serotonin 5-HT4 receptors as pharmacological targets for the treatment of Alzheimer's disease // Emerging Drugs and Targets for Alzheimer's Disease: V2: Neuronal Plasticity / Martinez A., ed. – London: RSC Publishing, 2010. – P. 169–185.

УДК 577.15.08

БИОКАТАЛИЗАТОРЫ НА ОСНОВЕ ПЕРОКСИДАЗЫ КОРНЯ ХРЕНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ

Гребенникова О.В., Юсеф-Азуз Н., Сульман А.М., Матвеева В.Г.

ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», г. Тверь, РФ
omatveevatstu@mail.ru

Аннотация. В работе синтезированы биокатализаторы на основе пероксидазы с использованием магнитных наночастиц в качестве носителя. Магнитные наночастицы Fe_3O_4 были получены полиольным методом. Поверхность магнитных наночастиц предварительно обрабатывалась тетраэтоксисиланом, 3-минопропилтриэтоксисиланом и глутаровым диальдегидом. Подобраны оптимальные условия проведения реакции окисления 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат) аммония пероксидом водорода (pH 6.0, температура 45 ^{0}C) в присутствии синтезированных биокатализаторов.

Ключевые слова: пероксидаза, имммобилизация, магниные наночастицы, биокатализатор.

Одной из важнейших и актуальных задач, стоящих перед промышленностью в настоящее время, является переход к более экологичным и устойчивым производственным процессам, которые сводят к минимуму или вообще избегают образования отходов и использования токсичных и/или опасных материалов. Биокатализ имеет много преимуществ в этом отношении. Сегодня ферменты широко используются в производстве фармацевтических препаратов, продуктов питания, тонких химикатов, ароматизаторов и других продуктов. Использование иммобилизованных ферментов позволяет повысить их активность, стабильность, легкое выделение продукта или более высокое качество продукта, достигаемое за меньшее количество стадий обработки. Благодаря ферментативным процессам, производится меньше отходов, чем при производстве традиционными синтетическими путями [1].

Использование магнитных наночастиц в биокатализе, за счёт их уникальных свойств, таких как контролируемый размер частиц, большая площадь поверхности и простота отделения их от реакционной смеси с помощью внешнего магнитного поля, позволяет повторно использовать ферменты для различных каталитических процессов [2,3].

Пероксидазу корня хрена (HRP), иммобилизованную на магнитных наночастицах, можно использовать в различных окислительных процессах. Например, в работе [4] авторы используют HRP, иммобилизованную на аминофункциализированом суперпарамагнитном оксиде железа, для окислительной деструкции кислотного черного С красителя. Fe_3O_4 был получен методом совместного осаждения и затем функционализирован 3-аминопропилтриэтоксисиланом. В каталитическом эксперименте иммобилизованный HRP продемонстрировал более высокую каталитическую активность по сравнению со свободным HRP. Также, иммобилизованную HRP часто применяют для создания биосенсоров, очистке сточных вод и для деполяризации лигнина [5].

В данной работе HRP была иммобилизована на магнитные наночастицы Fe_3O_4, синтезированные полиольным методом. Поверхность носителя перед иммобилизацией фермента была модифицирована и активирована двумя способами с использованием тетраэтоксисилана (ТЕОС), 3-аминопропилтриэтоксисилана (АПТС) и глутарового альдегида (ГА). Тестирование биокаталитических систем осуществлялось в реакции окисления 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфокислоты) диаммониевой соли с помощью пероксида водорода. Иммобилизованная на магнитных наночастицах HRP проявила высокую эффективность в отношении окисления АБТС с помощью пероксида водорода. Были подобраны оптимальные условия проведения данной реакции в присутствии синтезированных биокатализаторов (pH = 6.0, температура 45 ^{0}C). Наиболее высокую активность проявил биокатализатор Fe_3O_4/

ТЕОС/АПТС/ГА/HRP, содержащий в своем составе ТЕОС. К тому же, при повторном использовании в 5 рециклах данная биокаталитическая система потеряла всего 15 % своей активности, в то время как биокатализатор Fe_3O_4/АПТС/ГА/HRP потерял 19 % активности. Синтезированные биокатализаторы могут успешно применяться для окисления различных фенольных соединений, обеспечивая тем самым эффективность процесса и простоту отделения биокаталитической системы от реакционной смеси.

Работа выполнена при финансовой поддержке фонда РНФ (грант 24-79-10042).

Список литературы

1. Federsel H.-J., Moody T.S., Taylor S.J.C. Recent Trends in Enzyme Immobilization—Concepts for Expanding the Biocatalysis Toolbox // Molecules. – 2021. – Vol. 26. – P. 2822
2. Deepthi S.S., Reddy B.V. Green Approach towards the Synthesis of Enantio Pure Diols Using Horse Radish Peroxidase Enzyme Immobilized on Magnetic Nanoparticles // Green and Sustainable Chemistry. – 2014. - № 4. – p.15-19.
3. Grebennikova O., Sviridova I., Matveeva V., Sulman M. Magnetic nanoparticles in biocatalysis // Journal of Physics: Conference Series. – 2020. – Vol. 1658. – 012018.
4. Keshta B.E., Gemeay A.H., Khamis A.A. Impacts of horseradish peroxidase immobilization onto functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles as a biocatalyst for dye degradation // Environ Sci Pollut Res. – 2022. – Vol. 29. – p. 6633–6645.
5. Akbar H., Sedzro D. M., Khan M., Bellah F., Billah S. Structure, Function and Applications of a Classic Enzyme: Horseradish Peroxidase. Journal of Chemical // Environmental and Biological Engineering. – 2018. – Vol. 2. – No. 2. – p. 52-59.

УДК 579.66

ПОВЫШЕНИЕ УРОВНЯ ПРОДУКЦИИ ЦЕЛЕВЫХ БЕЛКОВ С ПОМОЩЬЮ 3’-НЕКОДИРУЮЩЕЙ ОБЛАСТИ ДНК ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ ЦЕЛЬНОКЛЕТОЧНЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ НА ОСНОВЕ *RHODOCOCCUS*

Гречишникова Е.Г., Шемякина А.О., Блинова В.С., Костомарова Э.Ю., Лавров К.В., Яненко А.С.

Лаборатория генетики и биотехнологии корине- и нокардиоподобных микроорганизмов КК НБИКС-ПТ, НИЦ «Курчатовский институт», Москва, РФ
Grechishnikova_EG@nrcki.ru

Аннотация. Для создания цельноклеточных биокатализаторов могут быть использованы бактерии *Rhodococcus,* обеспечивающие гипер-продукцию целевых ферментов. Вставка специфического фрагмента ДНК (3Н) в 3′-некодирующую область экспрессионной кассеты увеличивает уровень продукции белка у разных видов *Rhodococcus* до 3,8 раз. 3Н – инструмент для повышения экспрессии генов, позволяющий обходиться без модификаций промоторной области целевых генов.

Ключевые слова: *Rhodococcus,* экспрессия генов, регуляция экспрессии.

Биокатализаторы на основе целых клеток микроорганизмов в настоящее время рассматриваются как перспективный инструмент для биотехнологического получения многих промышленно-значимых химических соединений [1]. Одним из наиболее известных примеров успешно реализованных технологических процессов является крупнотоннажное биокаталитическое получение акриламида из акрилонитрила с помощью цельноклеточных биокатализаторов, содержащих фермент нитрилгидратазу, сконструированных на основе бактерий рода *Rhodococcus* [2]. Успешность данного процесса обусловлена сочетанием особенностей клеток *Rhodococcus:* быстрый рост биомассы на недорогих питательных средах, механическая прочность клеток и их способность выдерживать агрессивные условия среды, требуемые для проведения биокаталитической реакции, а также возможность гипер-продукции внутриклеточного целевого белка в активной форме. Благодаря этим особенностям бактерии рода *Rhodococcus* могут выступать в качестве микробиологической платформы для синтеза не только нитрилгидратазы, но других промышленно-значимых ферментов и затем использоваться в качестве цельноклеточных биокатализаторов.

В настоящей работе изучалась возможность повышения уровня экспрессии генов в различных видах *Rhodococcus* (*R. rhodochrous*, *R. qingshengii*, *R. coprophilus*, *R. percolatus*, *R. ruber* и *R. erythropolis*) путем изменения 3’- некодирующей области. Для этого варианты экспрессионной кассеты, содержащей репортерный ген *turboGFP* под контролем сильного конститутивного промотора P_{tuf} [3], расположили на автономно реплицирующейся плазмиде pRY3 [4]. Варианты кассеты отличались друг от друга 3’-некодирующей областью: часть вариантов содержала фрагмент ДНК из штамма *R. rhodochrous* M8, обозначенный 3Н, который предположительно способен формировать устойчивые вторичные структуры на 3’-конце транскрипта. Остальные варианты имели различные последовательности ДНК в 3’-некодирующей области, для которых не ожидалось формирование таких структур. Плазмиды вводили в клетки штаммов *Rhodococcus* с помощью электротрансформации, полученные штаммы выращивали в течение 4 суток в жидкой питательной среде Лурия-Бертани (LB), с апрамицином (100 мкг/мл), в пробирках со встряхиванием 250–300 об./мин. Значения оптической плотности культур (OD) и удельную флуоресценцию (FI/OD) измеряли на планшетном ридере Safire2 (Tecan, Щвейцария), условия пробоподготовки и параметры эксперимента приведены в работе [4]. Оказалось, что введенная в экспрессионную кассету последовательность 3Н увеличивает значение удельной флуоресценции во всех исследуемых видах, кратность увеличения составляла до 3,8 раз. Дополнительно было показано, что

увеличение экспрессии репортерного гена за счет использования последовательности 3Н наблюдалось независимо от того, какая последовательность ДНК располагалась после этой области. Уровень экспрессии репортерного гена во всех штаммах соответствовал уровню гипер-продукции белка, что подтверждалось результатами денатурирующего электрофореза в ПААГ по доле этого белка среди всех внутриклеточных растворимых белков.

Исследованный в настоящей работе фрагмент ДНК является новым инструментом повышения экспрессии генов в клетках *Rhodococcus*. Данный подход к увеличению экспрессии целевых генов может быть использован в тех случаях, когда для конструирования цельноклеточного биокатализатора требуется избегать вмешательства в регуляторную область промотора для сохранения механизма регуляция и уровня транскрипции, обеспечиваемого данной областью.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение о развитии геномных центров мирового уровня номер 075-15-2025-527).

Список литературы

1. Falcioni F. et al. The Evolving Landscape of Industrial Biocatalysis in Perspective from the ACS Green Chemistry Institute Pharmaceutical Roundtable // ACS Catalysis. – 2025. – Vol. 15. – № 12. – P. 10780–10794.
2. *Lavrov K.V.* et al. A new concept of biocatalytic synthesis of acrylic monomers for obtaining water-soluble acrylic heteropolymers // Metabolic Engineering Communications. – 2024. – Vol. 18.– P. e00231.
3. Shemyakina A.O. et al. A Set of Active Promoters with Different Activity Profiles for Superexpressing *Rhodococcus* Strain // ACS Synthetic Biology. – 2021. – Vol. 10. – № 3. – P. 515-530.
4. Шемякина А.О. и др. Новые инструменты для стабильной высокоэффективной экспрессии генов в бактериях *Rhodococcus* // Биотехнология. – 2023. – Том 39. – № 6, с. 41–51.

УДК 577.154; 577.152.352; 547.1

ИНГИБИТОРЫ БЕТА-ЛАКТАМАЗ: ПОИСК, ПРОБЛЕМЫ И РЕШЕНИЯ

Григоренко В.Г.[1], Андреева И.П.[1], Хренова М.Г.[1], Рубцова М.Ю.[1], Преснова Г.В.[1], Тихомиров А.С.[2], Шкуратова Т.С.[2], Циуляну П.[3], Фурсова Н.К.[4], Щекотихин А.Е.[2], Егоров А.М.[1]

[1] Химический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия
[2] НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, г. Москва, Россия
[3] Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, г. Москва, Россия,
[4] ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, п. Оболенск, г.о. Серпухов, Московская обл., Россия
vitaly.grigorenko@gmail.com

Аннотация. Определена структура комплекса и рассчитана константа деацилирования ($К_{деац}$=3x10^{-3}с$^{-1}$) производного тазобактама β-лактамазой ТЕМ типа. Предложены перспективные ингибиторы металло-β-лактамаз (МБЛ) на основе индол-2- и 3,5-дифенилпиррол-2- карбоновых кислот (IC_{50} - 0,09 и 0,7 мкМ). Продемонстрирована *in vivo* высокая эффективность унитиола для «защиты» карбапенемов при лечении инфекций, вызванных карбапенем-резистентными бактериями.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, бета-лактамазы, ингибиторы.

В настоящее время доля β-лактамных антибиотиков составляет более половины от всех используемых в мире для лечения различных инфекционных заболеваний [1]. β-лактамные антибиотики подавляют синтез пептидогликанового слоя клеточной стенки бактерий, нарушая структурную целостность клетки. Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам становится серьезной и растущей угрозой для общественного здравоохранения [2-3].

Наиболее распространенным механизмом резистентности у грамотрицательных бактерий является продукция β-лактамаз, которые инактивируют антибиотик путем гидролиза β-лактамного кольца [4]. Эти ферменты различаются по своей структуре, каталитической активности, специфичности и устойчивости к ингибиторам. Они делятся на четыре молекулярных класса: A, B, C и D в соответствии с гомологией их первичной последовательности [5-7]. Сериновые β-лактамазы молекулярных классов A, C и D имеют остаток серина в активном центре. Металло-β-лактамазы (МБЛ) молекулярного класса B содержат один или два иона цинка в активном центре, стабилизирующих гидроксид-ион [5]. Число описанных β-лактамаз из клинических изолятов оценивается как минимум в 2800 [3,6]. Это представляет собой значительную угрозу для эффективного использования β-лактамных антибиотиков.

Из-за высокой скорости развития устойчивости бактерий к антибиотикам наряду с поиском новых антибиотиков, активно используются ингибиторы β-лактамаз. В клинической практике давно применяются следующие комбинации: клавулановая кислота с амоксициллином, сульбактам с ампициллином, тазобактам с пиперациллином [8].

Такие ингибиторы содержат β-лактамное кольцо и также подвержены медленному гидролизу. Кроме того, из-за мутаций появляются устойчивые к ингибиторам β-лактамазы. На основе данных РСА, УФ-спектроскопии и кинетики тушения флуоресценции был изучен процесс гидролиза тазобактама β-лактамазой ТЕМ типа. Показано, что триазольная группа тазобактама взаимодействует с Tyr105. Рассчитанная константа скорости первого порядка ($К_{деац}$=3x10^{-3}с$^{-1}$) соответствует медленному деацилированию производного тазобактама и регенерации нативного фермента [9].

В отличие от сериновых β-лактамаз ни один из ингибиторов МБЛ не одобрен для клинического применения. При этом МБЛ характеризуются высокой каталитической активностью практически против всех β-лактамов, за исключением монобактамов [10].

Для изучения потенциальных ингибиторов МБЛ NDM-1 и VIM-2 были выбраны производные трех групп гетероциклических карбоновых кислот (рисунок 1, A-C).

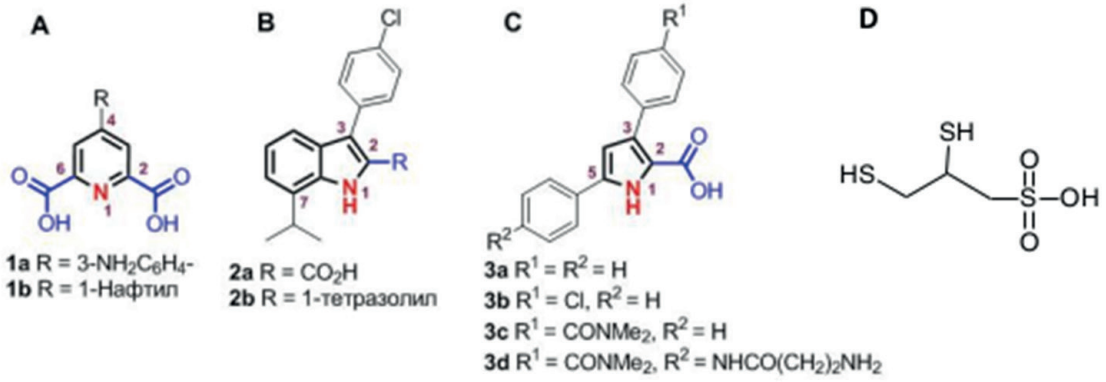


Рисунок 1. Структура перспективных ингибиторов МБЛ на основе дипиколиновой кислоты (A, **1a**, **b**), индол-2-карбоновой кислоты (B, **2a**, **b**), и 3,5-дифенилпиррол-2-карбоновой кислоты (C, **3a**-**d**), 2,3-димеркаптопропансульфоновая кислота — унитиол (D)

Несмотря на наличие активности производных дипиколиновой кислоты (Рисунок 1A) в отношении NDM-1, эти соединения не ингибировли VIM-2. Кроме того, добавление ионов Zn^{2+} приводило к снижению ингибирующей способности этих соединений, что вероятно обусловлено хелатированием Zn^{2+} в активном центре NDM-1 [11].

Производные индол-2-карбоновой кислоты (Рисунок 1B) эффективно ингибируют NDM-1 и VIM-2 (IC_{50} - 0,09 и 0,7 мкМ, соответственно), что указывает на перспективы создания универсальных ингибиторов этих ферментов на основе данного скаффолда. Замена карбоксильной группы в положение 2 на тетразол (2b), сохраняет активность в отношении NDM-1, однако снижает на порядок ингибирование VIM-2 [12].

Оптимизация структуры заместителей в арильных ядрах 3,5-дифенилпиррол-2-карбоновой кислоты (**3a**) позволяет существенно увеличить активность ингибиторов в отношении NDM-1. Было показано, что введение заместителей в 3- и 5-фенильные ядра усиливает действие на NDM-1, однако в большинстве случаев или не влияет, или ухудшает ингибирование лактамазы VIM-2. Как правило, заместители именно в *пара*-положения обоих фенильных фрагментов 3,5-дифенилпиррол-2-карбоновой кислоты (**3a**) придают соединениям наибольшую ингибирующую активность. Как и в случае с индол-2-карбоновой кислоты, ингибиторы на основе 3,5-дифенилпиррол-2-карбоновой кислоты сохраняют высокую активность в присутствии избыточного количества ионов Zn^{2+} [13].

В настоящее время всё более популярной становится концепция перепрофилирования лекарственных средств. В работе представлены результаты комбинированного исследования тиолсодержащих лекарственных препаратов для ингибирования МБЛ. Для наиболее перспективного соединения унитиол (Рисунок 1D) был изучен механизм связывания с МБЛ методами ферментативной кинетики и компьютерного моделирования [14].

На модели мышей *in vivo* продемонстрировано эффективное действие унитиола при лечении комбинированными препаратами (меропенем+унитиол и имипенем+унитиол) инфекций, вызванных штаммами-продуцентами карбапенемаз NDM-1 и VIM-2 *K.pneumoniae* и *P.aeruginosa* соответственно. Сочетание антибиотиков с унитиолом обеспечивало 100%-ное выживание экспериментальных животных. Полученные данные позволяют рассматривать унитиол в качестве перспективного компонента препаратов «защищенных» карбапенемов для лечения инфекций, вызванных карбапенем-резистентными бактериями.

Работа выполнена в рамках государственного задания НИИНА им. Г.Ф. Гаузе (соглашение № 075-00483-25-03) и химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (регистрационный номер 123032300028-0).

Список литературы

1. Fisher J.F., et al. Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity // Chem. Rev. - 2005. - Vol. 105. - No. 2. - P. 395-424.
2. Blumberg P.M., Strominger J.L. Interaction of penicillin with the bacterial cell: penicillin-binding proteins and penicillin-sensitive enzymes // Bacteriol. Rev. – 1974. – Vol. 38. – No. 3. – P. 291-335.
3. Carlet J. et al. Society's failure to protect a precious resource: antibiotics // Lancet. - 2011. – Vol. 378. – P. 369–371.
4. Tang S., Apisarnthanarak A., Hsu L.Y. Mechanisms of β-lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community-and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2014. – Vol. 78. – P. 3-13.
5. Ambler R.P., The structure of beta-lactamases // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. – 1980. – Vol. 289. – P. 321-331.
6. Bush, K. Past and present perspectives of β-lactamases // Antimicrob. Agents Chemother. – 2018. – Vol. 62. - e01076-18.
7. Hall B.G., Barlow M. Revised Ambler classification of β-lactamases. // J. Antimicrob. Chemother. – 2005. – Vol. 55. – P. 1050–1051.
8. Sargianou M. et al. // Pathogens. – 2025. – Vol. 14. – No 4. – P. 307.
9. Grigorenko V.G. et al. Crystal structures of the molecular class A β-lactamase TEM-171 and its complexes with tazobactam // Acta Crystallogr D Struct Biol. – 2022. – Vol. 78. - No 7. – P. 825-834.
10. Mojica M.F., Rossi M.A., Vila A.J., Bonomo R.A. The urgent need for metallo-β-lactamase inhibitors: an unattended global threat // Lancet Infect. Dis. – 2022. – Vol. 22. – No. 1. – P. 28-34.
11. Shkuratova T.S. et al. New derivatives of dipicolinic acid as metallo-β-lactamase NDM-1 inhibitors // Med. Chem. Res. – 2025. – Vol. 34. – P. 219–327.
12. Tiuleanu P. et al. 2-azolylindoles: synthesis and evaluation of their potential as metallo-β-lactamase inhibitors // Med. Chem. Res. – 2025. – Vol. 34. – P. 1714–1732.
13. Shkuratova T.S. et al. Rational design of 1H-pyrrole-2-carboxylic acid inhibitors of NDM-1 metallo-β-lactamase restoring β-lactam efficacy against resistant Enterobacterales // Eur. J. Med. Chem. – 2026. – Vol. 302. – No 3. – P. 118376.
14. Grigorenko V.G, et al. Drug Repurposing of the Unithiol: Inhibition of Metallo-β-Lactamases for the Treatment of Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. // Int. J. Mol. Sci. - 2022. - Vol. 23. - P. 1834-1849.

УДК 547.786.1:577.19:615.31

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ АНТАГОНИСТЫ РЕЦЕПОРА ТРОМБОКСАНА A_2 КАК ПРОТОТИПЫ АНТИАГРЕГАЦИОННЫХ СРЕДСТВ

Дёмина О.В. [1], **Беликов Н.Е.** [1], **Подоплелова Н.А.** [2], **Синауридзе Е.И.** [2], **Пантелеев М.А.** [2], **Ходонов А.А.** [1], **Варфоломеев С.Д.** [1]

[1] ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, г. Москва, РФ
[2] ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, РФ
olvicdem@gmail.com

Аннотация. В данном исследовании проведен скрининг на антиагрегационную активность 3 серий синтезированных веществ – 5-замещенных 3-пиридилизоксазолов, их позиционных изомеров и биоизостеров, с использованием линейки индукторов агрегации тромбоцитов человека, и изучено влияние на активацию тромбоцитов.

Ключевые слова: антиагрегационные средства, агрегация, активация, биоизостеры замещенных изоксазолов, тромбоцит.

Поиск новых химических соединений как прототипов антиагрегационных средств является актуальной задачей медицинской и биоорганической химии в комплексной терапии сердечно-сосудистых заболеваний [1, 2]. Актуальными мишенями являются рецепторы простаноидов мембраны тромбоцита и клеток эндотелия, рецепторы тромбина, фибриногена и аденозиндифосфата, и ферменты сигнальных путей [3-4]. Важным направлением исследований является изучение сигнальных путей простаноидов для использования антагонистов или агонистов в комплекной терапии сердечно-сосудистых дисфункций [4].

Целью данного исследования являлось изучение и сравнение антиагрегационной активности синтезированных нами серий 3,5-замещенных 1,2,4-оксадиазолов, их биоизостеров - 3,5-замещенных изоксазолов и позиционных изомеров 3,5-замещенных изоксазолов.

Серии 5-замещенных 3-пиридилизоксазолов и их позиционных изомеров были получены по реакции Хейсгена (Huisgen) [5-9], синтез серии 5-замещенных 3-пиридил-1,2,4-оксадиазолов проводили трехстадийно, с получением амидоксимов пиколина, никотина и изоникотина из нитрилов и последующим ацилированием хлорангидридами кислот, с циклизацией соответствующего О-ациламидоксима [7-9]. Структуры всех соединений были доказаны набором современных физико-химических методов анализа. Чистота полученных соединений составляла 98-99%.

Антиагрегационная активность. Изучение антиагрегационной активности всех серий веществ проводилось по отработанной методике на лазерном агрегометре «Биола» (НПО «Биола», Россия) в суспензиях отмытых тромбоцитов из образцов крови у добровольцев - мужчин не старше 40 лет, с использованием линейки индукторов агрегации – арахидоновой кислоты, PAF и U46619. Все соединения проявляли антиагрегационную активность в диапазоне концентраций от 1×10^{-6} до 1×10^{-3} М.

Влияние на активацию тромбоцитов человека. При использовании метода проточной цитометриии показано, что активация тромбоцитов тромбином или аналогом коллагена может частично ингибироваться как 5-замещенными 3-пиридилизоксазолами, так и их позиционными изомерами.

Нами впервые показано, что 3 серии синтезированных нами веществ могут быть прототипами антиагрегационных препаратов: все 3 серии подавляют агрегацию, вызванную U46619 или PAF, в концентрациях до 1×10^{-3} М. Предполагается, что механизм действия биоизостеров отличается от механизма действия 5-замещенных 3-пиридилизоксазолов.

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИБХФ РАН 2025-2026 гг. (тема № 125020601631-3) и договора о сотрудничестве № 1103/39-24.

Список литературы

1. Lordan R., A. Tsoupras A., Zabetakis I. Platelet activation and prothrombotic mediators at the nexus of inflammation and atherosclerosis: Potential role of antiplatelet agents // Blood Rev. – 2021. – V. 45. – No 1. – Art. 100694.
2. Gresele P., Momi S. Novel approaches to antiplatelet therapy // Biochem. Pharmacol. – 2022. – V. 206. – Art/ 115297.
3. Biringer R. G. A Review of Prostanoid Receptors: Expression, Characterization, Regulation, and Mechanism of Action // J. Cell Commun. Signal. – 2021. – V. 15. – P. 155-184.
4. Ashton A.W. Preparing to strike: Acute events in signaling by the serpentine receptor for thromboxane A_2. // Pharmacol.Therapeutics. – 2023. – V. 248. – Art. 108478.
5. Демина О.В., Беликов Н.Е., Варфоломеев С.Д., Ходонов А.А. 3-Пиридилизоксазолы — прототипы антиагрегационных средств. // Изв. АН. Сер. Химическая. – 2018. – Т. 67. – С. 866-877.
6. RU 2726127; Бюл. изобрет. №19, 2020.
7. Демина О.В., Лаптев А.В., Лукин А.Ю., Ходонов А.А., Беликов Н.Е., Фомин М.А., Грибкова И.В., Швец В.И., Варфоломеев С.Д. Сравнение антиагрегационной активности 3-(3-пиридил)-5-фенилизоксазола и 3-(3-пиридил)-5-фенил-1,2,4-оксадиазола // Биол. Мембраны. – 2011. – Т. 28. - № 4. – С. 243-253.
8. Беликов Н.Е., Ходонов А.А., Варфоломеев С.Д., Демина О.В. Влияние 3-(3-пиридил)-5-фенилизоксазола, его биоизостера и позиционного изомера на агрегацию тромбоцитов человека, вызванную U46619 // Труды XXI ежегодной молодежной конференции с международным участием ИБХФ РАН-вузы «Биохимическая физика». Москва, 15–16 ноября 2021 г. – Москва: РУДН. – 2022. – С. 22-29. ISBN 978-5-209-11222-8.
9. Демина О.В., Беликов Н.Е., Лукин А.Ю., Подоплелова Н.А., Пантелеев М.А., Ходонов А.А., Варфоломеев С.Д. Дизайн потенциальных антитромбоцитарных средств на основе модификаций скэффолда — 3-пиридилизоксазола // Изв. АН. Сер. Химическая. – 2025. – Т. 74. - № 4. - С. 1069-1081.

УДК 57/088/33

СОВРЕМЕННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ РАЗВИТИЯ БИОРЕЦЕПТОРНОГО АНАЛИЗА: ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ

Дзантиев Б.Б., Жердев А.В.

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва, РФ
dzantiev@inbi.ras.ru

Аннотация. Доклад посвящен рассмотрению и сравнительной оценке подходов, направленных на высокочувствительное выявление различных низко- и высокомолекулярных аналитов методами, основанными на формировании и регистрациии комплексов аналит – биорецептор. Обсуждены теоретические описания взаимодействий в различных биоаналитических системах, факторы, лимитирующие снижение пределов обнаружения, возможности различных способов управления процессами комплексообразования и усиления генерируемых сигналов.

Ключевые слова: биорецепторы, антитела, аптамеры, нанозимы, иммунохроматография, высокочувствительный анализ.

Разработка новых высокочувствительных методов является доминирующей тенденцией в аналитической химии последних лет. Однако нередко декларируемое снижение пределов обнаружения не обосновывается соответствующими изменениями в процессах взаимодействия реагентов и генерации сигнала, оставаясь представленным лишь в единичных публикациях. В этой связи востребована оценка факторов, лимитирующих достижение сверхчувствительной детекции, и возможностей направленного изменения критических параметров аналитического процесса. В докладе представлена такая характеристика биорецепторных гомогенных и мембранных аналитических систем, а также результаты проведенных работ по повышению их чувствительности.

Предложены и изучены математические модели, описывающие взаимодействия реагентов в тест-системах с оптической детекцией агрегации наночастиц, индуцированной реакцией аналит – рецептор, а также в иммунохроматографических тест-системах с разными форматами образования регистрируемых специфических комплексов. Для тест-систем установлены зависимости, описывающие содержание детектируемых комплексов и минимальные выявляемые концентрации аналитов как функции аффинностей и концентраций аналитических реагентов.

С учетом прогностических оценок рассмотрены агрегационные тест-системы на основе аптамеров и антител для детектирования ионов тяжелых металлов и низкомолекулярных соединений. Показано, как дополнительные реагенты, усиливающие агрегацию модифицированных наночастиц, позволяют преодолевать ограничения по чувствительности таких тест-систем. Рассмотрены также системы конкурентного флуоресцентного аптамерного и иммунохимического анализа. Например, для аптамерного анализа афлатоксина B1 с лиганд-индуцированным вытеснением комплементарной ДНК из комплекса с аптамером и регистрацией фёрстеровского переноса энергии, благодаря установленным требованиям к солевому составу среды достигнут предел обнаружения 1 нг/мл [1]. В антительной гомогенной аналитической системе показано усиление эмиссии флуоресцеиновой метки при формировании иммунного комплекса, позволяющее выявлять афлатоксин B1 в концентрациях до 0,2 нг/мл [2]. Рассмотрены условия, в которых фактором, лимитирующим предел обнаружения, является либо аффинность специфических взаимодействий, либо оптические характеристики маркера.

Для иммунохроматографических тест-систем охарактеризована эффективность различных схем усиления сигнала как средств снижения пределов обнаружения в конкурентных и неконкурентных форматах. Показаны возможности флуоресцентных наномаркеров, нанозимного катализа, самособирающихся агрегатов функционализированных наночастиц. Проведено сопоставление пределов

обнаружения для разных вариантов тест-систем для определения низкомолекулярных (антибиотики, пестициды), белковых (кардиомаркеры, гормоны) и корпускулярных (бактериальные клетки) антигенов. Так, при иммунохроматографическом определении клеток сальмонеллы переход от традиционно применяемых в качестве меток сферических золотых наночастиц к препаратам с разветвленной поверхностью – золотым наноцветам – обеспечил 10-кратное снижение предела обнаружения [3]. В конкурентном иммунохроматографическом анализе тетрациклина благодаря использованию пероксидазоподобной активности золотых наночастиц достигнут предел обнаружения 30 пг/мл [4]. Обсуждаются ограничения снижения пределов обнаружения, обусловленные характеристиками биорецепторных молекул и мембранных носителей. Представлены результаты изучения систем генерации гигантского комбинационного рассеяния как средств выявления сверхнизких концентраций аналитов, их возможностей применительно к иммунохроматографии. В частности, для детекции антимюллерова гормона, биомаркера репродуктивного потенциала, реализованы варианты с нанозимным усилением и с регистрацией усиленного гигантского комбинационного рассеяния [5, 6].

На основании полученного массива данных дается оценка наиболее эффективных решений для высокочувствительного биорецепторного анализа, перспективных для применения в массовой диагностике.

Список литературы

1. Samokhvalov A.V., Maksimenko O.G., Eremin S.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Interactions of ligand, aptamer, and complementary oligonucleotide: Studying impacts of Na^+ and Mg^{2+} cations on sensitive FRET-based detection of aflatoxin B1 // Molecules. – 2025. – Vol. 30. – No 10. – Art. 2125.
2. Sotnikov D.V, Agapov A.S, Eremin S.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Enhanced emission of fluorescein label in immune complexes provides for rapid homogeneous assay of aflatoxin B1 // Sensors. – 2025. – Vol. 25. – No 24. – Art. 7660.
3. Taranova N.A., Byzova N.A., Dzantiev B.B., Zherdev A.V. Lateral flow immunosensing of *Salmonella* cells in milk: Advantage of gold nanoflowers as labels // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2025. – Vol. 255. – Art. 114899.
4. Zvereva E.A., Hendrickson O.D., Dzantiev B.B., Zherdev A.V. Enhanced immunochromatographic assay of tetracycline using intrinsic peroxidase-like activity of gold nanoparticles // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2025. – Vol. 417. – P. 5105–5114.
5. Serebrennikova K.V., Komova N.S., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Sensitive lateral flow immunoassay based on the use of Au@Pt nanozyme and aptamer-captured oriented antibodies for the detection of anti-Müllerian hormone // Talanta. – 2026. - Vol. 302. – Art. 129462.
6. Serebrennikova K.V., Komova N.S., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Development of immunochromatographic analysis of anti-Mullerian hormone using bimetallic nanoparticles and registration of surface-enhanced Raman scattering // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2026. – Vol. 62. – No 1. – P. 180–189.

УДК 615.45

СОВРЕМЕННЫЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ АКТИВНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ

Дизик В.С.[1], **Джавахян М.А.**[2]

[1] *ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», г. Москва, РФ*
[2] *ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России, г. Москва, РФ*
vitaliya.bobyleva@yandex.ru

Аннотация. Современные системы доставки лекарственных средств обеспечивают направленный транспорт активных фармацевтических субстанций (АФС) к биологическим мишеням, повышая безопасность и эффективность терапии. В данной работе кратко рассмотрены основные типы современных методов доставки АФС: применение наночастиц, экзосом с природным тканевым тропизмом, аутологичных эритроцитов, микроигл, инъекционных гидрогелей, формирующих депо препарата *in situ*. Эволюция методов доставки знаменует переход к мультифункциональным платформам, где архитектоника носителя становится ключевой детерминантой выбора пути введения и терапевтической эффективности.

Ключевые слова: способы доставки, активная фармацевтическая субстанция, биофармация.

Системы доставки лекарственных средств определяются как композиции или устройства, предназначенные для обеспечения поступления активных фармацевтических субстанций (АФС) в организм и их направленного транспорта к соответствующим биологическим мишеням, что открывает возможности для повышения безопасности и эффективности фармакотерапии. Эффективная доставка является необходимым условием для клинического внедрения новых лекарственных средств, а также для перепрофилирования уже существующих препаратов, поскольку основными задачами терапии являются не только способность молекулы лекарственного средства достигать своей мишени, но также и необходимость в поддержании терапевтической концентрации в течение клинически значимого периода времени. В связи с фундаментальной важностью данного аспекта системы доставки на протяжении многих десятилетий остаются объектом интенсивных исследований, причём темпы их развития и практическая эффективность существенно возросли в текущем столетии благодаря прогрессу в области материаловедения, что привело к расширению спектра доступных вариантов доставки — от наночастиц, внеклеточных везикул, пористых материалов и гидрогелей до применения сложных лекарственных форм, получаемых методами аддитивного производства [1].

В традиционной фармакотерапии путь введения препарата являлся производной двух ключевых факторов — нозологической формы заболевания и характеристик активной фармацевтической субстанции (растворимость, стабильность, липофильность, молекулярная масса). Современная парадигма допускает обратную логистическую связь: именно свойства разработанной системы доставки (нанокапсулирование, таргетные лиганды, модифицированное высвобождение) начинают определять оптимальный маршрут введения, зачастую позволяя преодолевать исходные биофармацевтические ограничения АФС [2].

Использование наночастиц (диаметром от 10 до 200 нм) – липосом, мицелл, полимерных микросфер – один из самых распространенных современных методов доставки. Основными преимуществами данного метода являются преодоление гематоэнцефалического барьера, солюбилизация гидрофобных соединений, а также защита лабильных АФС от нуклеаз и протеаз биологических жидкостей. Заключение АФС в наночастицу обеспечивает физическую и химическую защиту до момента доставки к мишени, что часто используется при доставке мРНК-вакцин (Comirnaty, Spikevax) [3].

Более современной альтернативой традиционным системам доставки служат экзосомы — представители гетерогенной группы внеклеточных везикул, включающей также микровезикулы, эктосомы,

онкосомы и апоптотические тельца. Согласно современным представлениям, указанные фосфолипидные везикулы покрыты белками и несут молекулярные «штрихкоды», которые обеспечивают их хемотаксис к биологическим мишеням. Принципиальным отличием данных структур от липосом является сложный многокомпонентный состав, включающий гетерогенную смесь липидов, а также разнообразные поверхностные и мембранные белки [1, 4].

Возможным решением проблемы биосовместимости лекарственных препаратов является применение систем доставки активных фармацевтических субстанций на основе аутологичных клеток пациента. В частности, предложены методы использования эритроцитов в качестве естественных эндогенных переносчиков терапевтических агентов. Осмотическая инкапсуляция наночастиц или нанопрепаратов в эритроцитарный компартмент представляет собой инновационный подход к адресной доставке лекарственных средств, обеспечивающий повышение селективности накопления, увеличение биодоступности и улучшение биосовместимости [5].

Одним из подходов к снижению системной токсичности активных фармацевтических субстанций является применение трансдермальных систем доставки, которые позволяют избежать метаболизма при первом прохождении через печень, обеспечить повышенную локальную концентрацию лекарственного средства в очагах кожных поражений и, как следствие, редуцировать нежелательные системные эффекты. К числу передовых методов трансдермальной доставки, демонстрирующих более высокую эффективность по сравнению с альтернативными путями введения, относятся микроиглы, ионофорез, сонофорез и электропорация. В отличие от классических трансдермальных подходов, системы на основе наноносителей или микрокапсул отличаются безболезненностью, неинвазивностью (либо минимальной инвазивностью) и отсутствием необходимости в дорогостоящем оборудовании. Кроме того, указанные системы способны реализовывать расширенный функционал, включающий повышение пенетрационной способности через кожный барьер, контролируемое высвобождение препарата с заданной кинетикой и усиление адресности доставки [6].

Инновационным подходом к разработке инъекционных лекарственных форм выступают инъекционные гидрогели, представляющие собой трёхмерные гидрофильные полимерные матрицы, которые способны к обратимому либо необратимому гелеобразованию *in situ* после введения в организм в жидком состоянии. Указанные системы обеспечивают пролонгированное и контролируемое высвобождение активных фармацевтических субстанций посредством формирования лекарственного депо непосредственно в зоне инъекции, что позволяет сократить частоту введений и снизить выраженность системных побочных эффектов [7].

Таким образом, современные системы доставки активных фармацевтических субстанций представляют собой эволюционный переход от классических лекарственных форм к мультифункциональным платформам, обеспечивающим не только транспорт терапевтического агента, но и его защиту от биодеградации, контролируемое высвобождение с заданной кинетикой, а также таргетное накопление в патологическом очаге. Выбор пути введения и разработка лекарственной формы в современной фармацевтике все в большей степени детерминируются не только свойствами АФС и нозологической формой заболевания, но и материаловедческими характеристиками и функциональными возможностями системы доставки.

Список литературы

1. Winkler D.A. Synergies between data science methods and innovative drug delivery technologies // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2026. — Vol. 230. – P.115783.
2. Jain K.K. An overview of drug delivery systems // Drug delivery systems. – 2019. — Vol. 2059. – P. 1-54.
3. Swingle K.L., Hamilton A.G., Han X. et al. Circular RNA lipid nanoparticle vaccine against SARS-CoV-2 // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2025. – Vol. 122. – . No. 38. – Art. e2505718122.
4. Herrmann I.K., Wood M.J.A., Fuhrmann G. Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform // Nature nanotechnology. – 2021. – Vol. 16. – No. 7. – P. 748-759.
5. Jiang Y., Yuan Y., Peng F. et al. Erythrocyte-based Drug Delivery: How Far from Clinical Application? // Current Drug Delivery. – 2024. – Vol. 21. – No. 1. – P. 52-64.

6. Jung J.H., Jin S.G. Microneedle for transdermal drug delivery: current trends and fabrication // Journal of pharmaceutical investigation. – 2021. – Vol. 51. – No. 5. – P. 503-517.
7. Paez J.I., Lim K.S. An introduction to injectable hydrogels // Journal of Materials Chemistry B. – 2024. – Vol. 12. – No. 23. – P. 5571-5572.

УДК 577.15

АНТИОКСИДАНТНЫЙ ЭФФЕКТ КОМБИНАЦИИ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ В ИНТЕРПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ КОМПЛЕКСАХ

Дорощенко А.В.[1], **Усмонова М.О.**[2], **Тагирова М.А.**[2], **Лопухов А.В.**[1], **Клячко Н.Л.**[1]

[1] *Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ*
[2] *Самаркандский государственный университет имени Шарофа Рашидова, Самарканд, Республика Узбекистан*
alexey07251@gmail.com

Аннотация. В работе изучен комбинированный антиоксидантный эффект супероксиддисмутазы (СОД) и низкомолекулярных антиоксидантов. Получены интерполиэлектролитные комплексы СОД с полиэтиленгликоль-поли-L-лизином (PEG-PLL), стабилизированные сшиванием первичных аминогрупп поликатиона дженипином. Методом ингибирования автоокисления пирогаллола показано, что совместное применение СОД с низкомолекулярным антиоксидантом глутатионом приводит к синергетическому антиоксидантному эффекту.

Ключевые слова: супероксиддисмутаза, полиэлектролиты, антиоксиданты, аскорбат, глутатион.

Активные формы кислорода (АФК) – химически активные молекулы, ионы или радикалы, образующиеся в организме в результате метаболизма кислорода, при различных патологических процессах, таких как травмы, ожоги и др. В низких концентрациях АФК выполняют сигнальные функции, однако в высоких концентрациях могут приводить к повреждению белков, ДНК и липидов в организме. Одним из наиболее активных радикалов является супероксид-анион радикал, повышенные концентрации которого приводят к окислительному стрессу и гибели клеток. Супероксиддисмутаза (СОД) является одним из ключевых ферментов антиоксидантной защиты организма, катализирующим дисмутацию супероксидного анион-радикала в молекулярный кислород и пероксид водорода. Благодаря высокой каталитической эффективности и специфичности СОД играет центральную роль в предотвращении окислительного стресса и связанных с ним патологических процессов, что позволяет рассматривать фермент в качестве перспективного противовоспалительного агента. Однако клиническое использование нативного фермента существенно ограничено его высокой чувствительностью к протеолитической деградации, низкой проницаемостью через биологические мембраны и значительной стоимостью производства. Эффективным подходом к повышению стабильности фермента является формирование интерполиэлектролитных комплексов [1], сшитых при помощи кросс-сшивающего агента.

Дополнительным важным компонентом антиоксидантной защиты являются неферментативные антиоксиданты низкомолекулярной природы — аскорбиновая кислота (витамин С), глутатион, токоферол (витамин Е), флавоноиды и каротиноиды [2]. Аскорбиновая кислота (витамин С) представляет собой один из наиболее мощных водорастворимых антиоксидантов. Она эффективно нейтрализует активные формы кислорода, такие как супероксидный анион-радикал, гидроксильный радикал и синглетный кислород. Механизм действия аскорбата основан на способности отдавать один атом водорода, образуя относительно стабильный радикал моно-дегидроаскорбат, который реагирует с другими радикалами, прерывая цепные реакции окисления.

Глутатион — основной низкомолекулярный тиольный антиоксидант клетки, присутствующий в высоких концентрациях (1–10 мМ) в цитозоле, митохондриях и ядре. Благодаря наличию сульфгидрильной группы глутатион непосредственно реагирует с АФК (супероксидом, гидроксильным радикалом,

пероксидами), образуя окисленную форму — глутатиондисульфид. Также играет важную роль как кофактор глутатионпероксидаз, которые восстанавливают гидропероксиды липидов и перекись водорода до соответствующих спиртов и воды.

Целью данной работы было изучение комбинированного антиокислительного эффекта супероксиддисмутазы и полиэлектролитных комплексов фермента с низкомолекулярными антиоксидантами – аскорбатом натрия, глутатионом и кверцетином. В ходе работы был получен интерполиэлектролитный комплекс СОД с полиэтиленгликоль-поли-L-лизином (PEG-PLL), сшитый по первичным аминогруппам поликатиона с использованием сшивающего агента дженипина. Средний размер комплексов составил 200 нм с узкой полидисперсностью и околонулевым дзета-потенциалом. В качестве модельной системы методом анализа ингибирования автоокисления пирогаллола было проведено сравнение комбинированного антиокислительного эффекта нативной СОД в присутствии и отсутствии низкомолекулярных антиоксидантов – аскорбата натрия, кверцетина и глутатиона, и показано, что степень ингибирования автоокисления пирогаллола линейно зависит от концентраций СОД и низкомолекулярных агентов. В случае аскорбата натрия синергетическое усиление антиоксидантного эффекта в присутствии СОД практически не наблюдалось. Для кверцетина также не было получено достоверных свидетельств синергетического взаимодействия. Однако оценка его антиоксидантной активности затруднена вследствие наложения спектров поглощения кверцетина и пирогаллола, что ограничивает применимость используемого метода для данного соединения. Для глутатиона в концентрации 0,1 мкМ без СОД степень ингибирования составила 41,2 %, а в присутствии СОД – 78,5 %, что говорит о совместном антиокислительном эффекте СОД и глутатиона. Полученный эффект планируется дополнительно исследовать на сшитых интерполиэлектролитных комплексах супероксиддисмутазы. Таким образом, совместное применение глутатиона и СОД может приводить к синергетическому антиоксидантному эффекту, а также снижать стоимость получения антиоксидантных препаратов на основе супероксиддисмутазы.

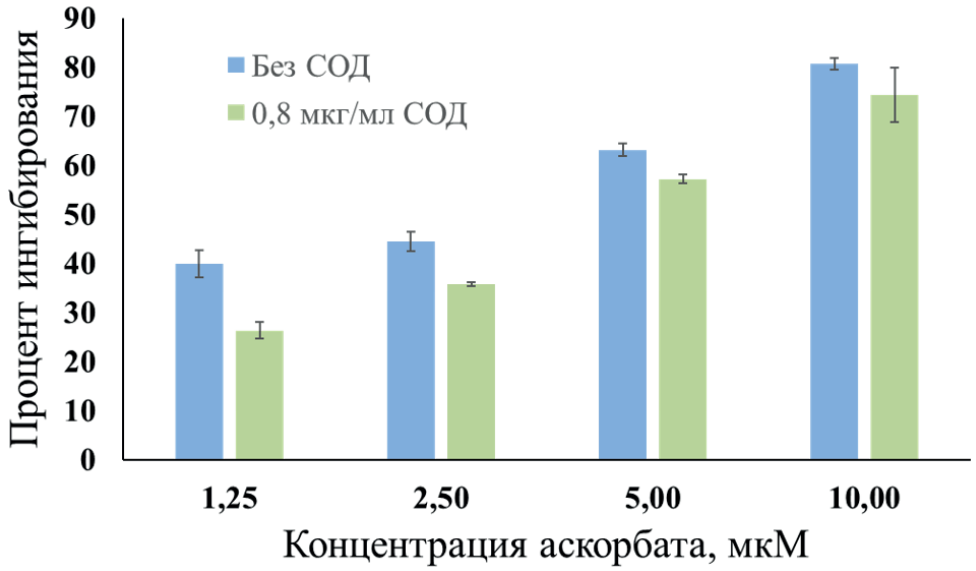


Рисунок 1. Зависимость процента ингибирования автоокисления пирогаллола от концентрации аскорбата натрия в присутствии и отсутствии СОД (0,8 мкг/мл)

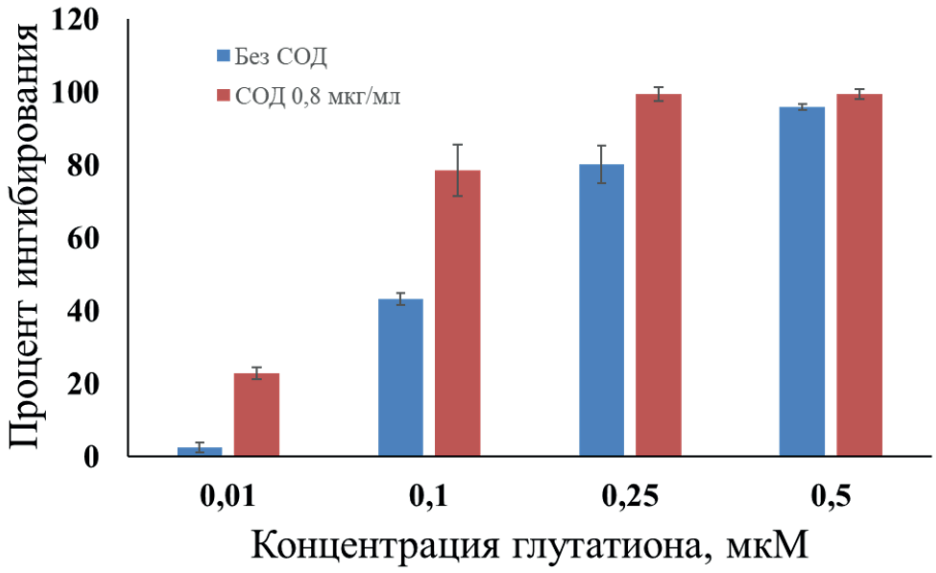


Рисунок 2. Зависимость процента ингибирования автоокисления пирогаллола от концентрации глутатиона в присутствии и отсутствии СОД (0,8 мкг/мл)

Работа частично поддержана грантом РНФ 22-13-00261П, темами с гос. регистрацией 121041500039-8 и 123032300028-0 и Программой развития МГУ (покупка приборов).

Список литературы

1. Nukolova N. V. et al. Multilayer polyion complex nanoformulations of superoxide dismutase 1 for acute spinal cord injury. Journal of Controlled Release. 2018, 270, 226-236.
2. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function // Physiological Reviews. American Physiological Society, 2002. Vol. 82, № 1. P. 47–95.

УДК 577.29

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ СУБЪЕДИНИЦ ПРОТЕАСОМЫ В КЛЕТКАХ HEK293T ПРИ СВЕРХЭКСПРЕССИИ ПОЛНОРАЗМЕРНЫХ ВАРИАНТОВ ХАНТИНГТИНА

Ежов А.А.[1], **Готманова Н.Н.**[2], **Бобик Т.В.**[3], **Бачева А.В.**[2]

[1] *Физический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ*
[2] *Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ*
[3] *Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, г. Москва, РФ*
alexander-ezhov@yandex.ru

Аннотация. Представлены результаты флуоресцентной микроскопии, полученные при изучении взаимосвязи временной сверхэкспресии полноразмерных нормального (Htt) или мутантного (mHtt) хантингтина в клетках HEK293T с активностью протеасомы и изменением экспрессии ее субъединиц. Установлено, что сверхэкспрессия Htt и особенно mHtt приводит к активации иммунопротеасомы. Полученные результаты согласуются с результатами вестерн-блоттинга и ПЦР с обратной транскрипцией.

Ключевые слова: флуоресценция, протеасома, хантингтин, полиглутаминовые заболевания.

Болезнь Хантингтона — аутосомно-доминантное нейродегенеративное заболевание, вызванное патологической мутацией, приводящей к увеличению числа последовательных тринуклеотидных повторов (CAG) в гене HTT, которые кодируют полиглутаминовый тракт (полиQ-тракт) в белке хантингтин. Если число глутаминовых остатков в полиQ-тракте превышает 37, то развивается болезнь Хантингтона, поражающая нейроны в определенных областях центральной нервной системы. Считается, что нейрон-специфическая токсичность мутантного Htt (mHtt) обусловлена его конформационной нестабильностью и склонностью к агрегации из-за удлинения полиQ-тракта [1]. Однако недавние структурные исследования ставят под сомнение эти предположения [2]. Для выяснения некоторых ключевых аспектов молекулярных механизмов болезни Хантингтона была осуществлена временная экспрессия полноразмерных нормального хантингтина (Htt, Q15) или мутантного хантингтина (mHtt, Q138) в клетках HEK293T и изучена связь экспрессии Htt/mHtt с изменением активности протеасомы и с изменением состава ее субъединиц. Для трансфекции использовались специально созданные плазмиды на основе pCI_HTT-Q15 и pCI_HTT-Q138 [3] путем добавления комбинированной пептидной метки 3FLAG-6His [4].

Исследования трансфицированных клеток проводились методами иммунофлуоресцентной микроскопии как в варианте широкопольной микроскопии, так и в варианте конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ), в том числе – с использованием локальной спектрофлуориметрии. Методом иммунофлуоресцентной микроскопии была проведена визуализация экспрессии протеасомы в отдельных клетках. Для этого использовались первичные антитела кролика к Htt, антитела мыши к субъединицам α1-7 и антитела мыши к иммунной субъединице β1i 20S протеасомы. В качестве вторичных антител использовались конъюгированные с флуорофором Cy5 антитела козы к антителам мыши и конъюгированные с флуорофором FITC антитела осла к антителам кролика. Сигнал, соответствующий α1-7-субъединицам отражал общее содержание протеасомы в клетках, а β1i субъединицам – изменение уровня иммунопротеасомы, поскольку β1i субъединица включается в собранные частицы протеасомы только вместе с субъединицами β5i [5].

Было показано, что трансфицированные клетки HEK293T экспрессируют белок Htt/mHtt, о чем свидетельствует увеличение интенсивности зеленой флуоресценции в 6-20 раз по сравнению с отсутствием трансфекции. Красная флуоресценция, соответствующая α-субъединицам 20S протеасомы

в клетках, экспрессирующих Htt/mHtt, была в 2-4 раза сильнее, чем в нетрасфицированных клетках. Клетки HEK293T, сверхэкспрессирующие Htt/mHtt, продемонстрировали выраженную красную флуоресценцию, соответствующую субъединице β1i, интенсивность которой была в 4-8 раз выше, чем в случае отсутствия трансфекции. Для количественных оценок относительной интенсивности эмиссии использовались поперечные сечения флуоресцентных изображений. Сигналы зеленой и красной флуоресценции продемонстрировали сильную колокализацию. Для подтверждения того, что сигналы флуоресценции соответствуют различным флуорофорам, с помощью КЛСМ были измерены локальные спектры эмиссии при возбуждении светом с длинами волн 488 и 635 нм. Таким образом, наблюдается колокализация протеасомы и хантингтина, и следовательно заметное концентрирование протеасомы вокруг хантингтина.

КЛСМ использовалась для получения дополнительной информации об изменениях в составе субъединиц протеасомы во время экспрессии как Htt/mHtt, поскольку позволяла не только локализовать флуоресценцию в 3D, но и количественно определять разницу в интенсивности флуоресценции в заданных спектральных диапазонах.

Было установлено, что экспрессия Htt/mHtt не приводит к существенному изменению общего количества протеасомы, поскольку оранжевый цвет (смесь зеленого и красного) преобладает как в клетках, экспрессирующих Htt, так и в клетках, экспрессирующих mHtt. В то же время уровень экспрессии иммунной субъединицы β1i протеасомы при сверхэкспрессии Htt значительно ниже, чем при экспрессии mHtt. Такой результат указывает на активацию экспрессии иммунопротеасомы.

Эти данные были подтверждены с помощью вестерн-блоттинга, ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и измерения внутриклеточной протеазной активности по низкомолекулярным субстратам. Показано, что кратковременная сверхэкспрессия полноразмерных Htt или mHtt приводит к повышенной каспазной активностью как протеасомы, так и других протеаз, а также к изменениям в экспрессии некоторых субъединиц протеасомы. Клеточный ответ на экспрессию mHtt проявлялся в основном в увеличении субъединиц β1, β5i и в меньшей степени β1i, а также в экспрессии 11Sαβ протеасомного регулятора.

Таким образом, иммунофлуоресцентная микроскопия продемонстрировала разницу в уровне субъединицы β1i протеасомы между трансфицированными и нетрансфицированными клетками, а также между клетками, сверхэкспрессирующими Htt и mHtt, что подтверждается результатами вестерн-блоттинга и ОТ-ПЦР. Можно предположить, что экспрессия mHtt не вызывает общего повышения уровня конститутивной 20S протеасомы, а частично способствует активации иммунопротеасомы (за счет увеличения экспрессии иммуносубъединиц β1i и β5i и регулятора 11Sαβ) и также увеличивает скорость обновления протеасомы, по крайней мере на начальных стадиях накопления мутантного белка.

Исследование было поддержано Российским научным фондом (грант № 25-24-00260). Авторы благодарят Е.В. Казначееву (Институт цитологии Российской академии наук, г. Санкт-Петербург, РФ) за предоставление плазмид pCI_HTT, А.А. Белогурова и А.А. Кудряеву (Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, г. Москва, РФ) за предоставление плазмиды pBud-DHFR, а также МГУ имени М.В. Ломоносова за предоставленную возможность использовать оборудование AKTA Purifier, YoCell SCG-P-030 V6 и Olympus FV1000/IX81.

Список литературы

1. Zheng Zh., Diamond M.I. Huntington disease and the huntingtin protein // Progress in Molecular Biology and Translational Science. - 2012. - Vol. 107. - P. 189-214.

2. Harding R.J., Loppnau P., Ackloo S. et al. Design and characterization of mutant and wildtype huntingtin proteins produced from a toolkit of scalable eukaryotic expression systems // Journal of Biological Chemistry. - 2019. – Vol. 294. – No. 17. - P. 6986-7001.

3. Wellington C.L., Singaraja R., Ellerby L. et al. Inhibiting caspase cleavage of huntingtin reduces toxicity and aggregate formation in neuronal and nonneuronal cells // Journal of Biological Chemistry. – 2000. – Vol. 275. – No. 26. – P. 19831–19838.

4. Gotmanova N.N., Bobik T.V., Kriachkov V.A. et al. The HEK293T cells manage overload by the overexpressed full-length Htt variants via proteasome activation // Biochimie. – 2026. – Vol. 240. – P. 59-75.
5. Guillaume B., Chapiro J., Stroobant V. et al. Two abundant proteasome subtypes that uniquely process some antigens presented by HLA class I molecules // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2010. – Vol. 107. – No. 43. P. 18599–18604.

ПРОБЛЕМЫ РАЗРАБОТКИ ИММУНОАНАЛИЗА ПОЛИ- И ПЕР-ФТОРАЛКИЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ (ПФАС)

Сюе Шися[1], Kai Wen[2], Zhanhui Wang[2], Еремин С.А.[1,3]

[1] Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы 1, Россия
[2] College of Veterinary Medicine China Agricultural University, Yuanmingyuan WestRoad 2#, Haidian District, 100193, Beijing, P.R.China
[3] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «МИРЭА - Российский технологический университет», Москва, пр. Вернадского 78, Россия
saeremin@gmail.com

Аннотация. Доклад посвящён получению антител и разработке иммунных методов определения поли- и перфторалкильных соединений (ПФАС). ПФАС обладают слабой иммуногенностью, что часто препятствует получению высокоаффинных антител и созданию чувствительных методов иммуноанализа. В работе предлагается стратегия использования структурных аналогов ПФАС для иммунизации с целью получения антител, специфичных к нативным токсикантам. В качестве модельного соединения выбрана перфтороктановая кислота (ПФОК). С использованием полученных антител разработан поляризационный флуоресцентный иммуноанализ (ПФИА). Показано, что метод обладает высокой специфичностью и пригоден для скринингового определения ПФОК в водных объектах.

Ключевые слова: иммуноанализ, антитела, поли- и перфторалкильные соединения (ПФАС), поляризационный флуоресцентный иммуноанализ (ПФИА), перфтороктановая кислота (ПФОК), «вечные химикаты».

Введение

Поли- и перфторалкильные вещества (ПФАС) представляют собой группу из тысяч синтетических фторорганических соединений, в молекулах которых все или почти все атомы водорода замещены на фтор. Благодаря уникальным физико-химическим свойствам — высокой термической и химической стабильности, а также способности придавать поверхностям водо-, масло- и грязеотталкивающие свойства — ПФАС с 1940-х годов широко применяются в производстве антипригарных покрытий, водонепроницаемого текстиля, упаковочных материалов, противопожарных пен и электроники.

Однако та же устойчивость, которая делает ПФАС ценными в промышленности, превращает их в опаснейшие загрязнители окружающей среды. Эти вещества получили образное название «вечные химикаты» из-за чрезвычайно высокой устойчивости к химическому, термическому и биологическому разложению [1]. В результате ПФАС практически повсеместно обнаруживаются в питьевой воде, водоёмах, почве, воздухе, продуктах питания и даже в крови человека по всему миру, включая отдалённые районы Арктики [2]. Международное агентство по изучению рака (IARC) в 2025 году классифицировало ПФОК как канцероген для человека.

Проблема усугубляется тем, что ПФАС в окружающей среде присутствуют не по отдельности, а в виде сложных смесей. «Золотым стандартом» их определения остаётся жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС), обеспечивающая пределы обнаружения на уровне единиц нг/л. Однако сложность, длительность и высокая стоимость таких анализов делают их малопригодными для массового скрининга многочисленных проб.

Эффективной альтернативой могут стать иммунохимические методы, основанные на специфическом взаимодействии антигена (анализируемого токсиканта) с антителами. Среди них особый интерес представляет поляризационный флуоресцентный иммуноанализ (ПФИА). Будучи гомогенным методом, он не требует этапа разделения свободной и связанной форм, а сам процесс анализа занимает всего несколько минут.

Однако ключевым препятствием на пути создания чувствительных иммунных тест-систем для ПФАС является их низкая иммуногенность. Малые размеры самих молекул, а также отсутствие сильнозаряженных групп и высокая химическая инертность приводят к тому, что при введении в организм позвоночных ПФАС не вызывают полноценного иммунного ответа. В литературе описаны лишь единичные случаи получения антител к ПФАС с относительно невысокой аффинностью.

Для преодоления ограничений, связанных со слабой иммуногенностью ПФАС, нами предлагается альтернативный подход. Вместо прямого использования целевого токсиканта (например, ПФОК) для иммунизации животных, мы предлагаем применять структурные аналоги ПФАС, в частности соединения, содержащие фрагменты —CF_3 [3]. Такие аналоги могут быть более иммуногенными, но при этом сохранять структурное сходство, необходимое для выработки антител, перекрёстно реагирующих с исходными загрязнителями. Представленные в литературе данные свидетельствуют, что антитела к таким структурным элементам можно успешно использовать в различных иммунных методах [4].

Следующим этапом после получения антител является подбор формата иммуноанализа. Основное внимание в нашей работе уделено методу ПФИА, который доказал свою эффективность при разработке анализов на низкомолекулярные вещества, схожие с ПФАС по физико-химическим свойствам [5]. За последние годы нами был успешно разработан ПФИА для широкого круга ксенобиотиков: нонилфенола, линейных алкилсульфонатов, дибутилфталатов и других. Накопленный опыт и отработанные методологические подходы послужили основой для создания ПФИА для ПФОК — самого распространённого представителя ПФАС.

В результате работы получены первые образцы моноклональных антител к ПФОК с использованием стратегии иммунизации конъюгатами ПФАС с белком-носителем. Разработан гомогенный поляризационный флуоресцентный иммуноанализ для специфического определения ПФОК с порогом чувствительности 1 мкг/мл, временем анализа 15 минут и удовлетворительными метрологическими характеристиками. Данный метод может стать основой для создания простых, экспрессных, портативных систем экологического мониторинга. Перспективным направлением дальнейших исследований является также получение антител к другим опасным представителям ПФАС, включая короткоцепочечные и ультракороткоцепочечные соединения, например, трифторуксусную кислоту.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 25-43-02081) - "Разработка простых и быстрых способов обнаружения пер- и полифторалкильных соединений в образцах пищевых продуктов на основе нового распознающего материала"

Список литературы

1. М. К. Беклемишев, С. А. Еремин, И. А. Родин. Журнал Аналитической химии, в печати (2026).
2. Huihui Wu, Lingling Guo, Xinxin Xu, Jie Zou, Hua Kuang, Chuanlai Xu, Xiaoling Wu. On-site rapid detection of perfluorooctanoic acid by visual immunochromatographic strip biosensor in domestic water and real human samples. Environmental Pollution. 348, 123776 (2024). https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123776
3. Wenjia Yang, Lu Zeng, Xinyu Zhang, Xiangrui Li, Qiujin Zhu. A time-resolved fluorescent signal tag-mediated immunochromatographic assay for the rapid and sensitive detection of fluoxetine. Journal of Food Composition and Analysis, 150, 108884 (2026). https://doi.org/10.1016/j.jfca.2026.108884
4. Ghulam Mujtaba Mari, Weilin Wu, Aisha Talpur, Jan Muhammad Shah, Saqib Ali, Faiz Khand, Erum Bughio, Abdul Samad, Zhanhui Wang, Sergei A. Eremin. Hapten design to prepare monoclonal antibodies and establishment of immunoassay for direct screening of oxamichydrazide in chicken, the metabolite of nifuraldezone. One Health Adv. 1, 6 (2023). https://doi.org/10.1186/s44280-023-00006-y
5. Yakovleva J., Zeravik J., Michura I.V., Formanovsky A.A., Franek M., Eremin S.A. Hapten Design and Development of Polarization Fluoroimmunoassay for Nonylphenol // International Journal of Environmental Analytical Chemistry. vol. 83, pp. 597–607, 2003. DOI: https://doi.org/10.1080/0306731021000060029

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СИГНАЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЛЮКОАМИЛАЗЫ *ASPERGILLUS AWAMORI* У МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *PENICILLIUM VERRUCULOSUM*

Ерошенко Н.С.[1,2], Чулкин А.М.[1], Волков П.В.[1], Доценко А.С.[1], Шашков И.А.[1], Рожкова А.М.[1,2], Зоров И.Н.[1,2], Синицын А.П.[1,2]

[1] Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия
[2] Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

Мицелиальные грибы являются важным инструментом в промышленной биотехнологии благодаря своей высокой секреторной способности, использованию доступных питательных сред и предсказуемой масштабируемости в производственных циклах. Одним из примеров таких грибов является *Penicillium verruculosum* B1-537, который способен синтезировать до 70 граммов белка на 1 литр культуральной среды, что делает данный гриб платформой для производства ферментов пищевой и технической направленности.

Штамм *P. verruculosum* характеризуется эффективной системой экспрессии белков, регулируемой сильным индуцибельным промотером *cbh1*. Несмотря на это, производство некоторых гетерологичных ферментов, например, глюкоамилазы из *Aspergillus awamori* (aaGlaA), остается низким (всего 15-20% от общего объема синтезируемых белков). Эта недостаточность ограничивает использование ферментных препаратов, полученных с помощью *P. verruculosum*, в процессах переработки зернового крахмала, где требуется совместное действие α-амилазы и глюкоамилазы. Один из известных подходов к решению этой проблемы — замена сигнального пептида для увеличения экспрессии белка.

В работе были проанализированы пять сигнальных пептидов (СП), которые ранее использовались для других хорошо экспрессируемых гетерологичных белков. Это *pvGlaA* (СП глюкоамилазы А из *P. verruculosum*), *XylA* (СП ксиланазы из *P.canescens*), Bgl1 (СП β-глюкозидазы из *A. niger*), *Cbh1* (СП целлобиогидралазы из *P. verruculosum*) и *aaGlaA* (родной пептид глюкоамилазы А из *A.awamori*). Были сконструированы пять плазмид, содержащих последовательности сигнальных пептидов, слитые с геном *glaA*, и использованы для трансформации *P. verruculosum*. Полученные штаммы культивировали и проверяли на содержание белка и активность глюкоамилазы. Лучшим оказался СП гомологичной глюкоамилазы в *P. verruculosum* (*pvGlaA*). Использование этого СП увеличило секрецию гетерологичной aaGlaA в 2,5 раза при культивировании рекомбинантных штаммов на целлюлозосодержащих ферментационных средах для *P. verruculosum.*

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования.

УДК 579.69; 544:47

БИОКАТАЛИЗ В УПРАВЛЕНИИ КВОРУМНЫМИ МИКРОБНЫМИ СИСТЕМАМИ: ПОДХОДЫ И РЕШЕНИЯ

Ефременко Е.Н., Асланлы А.Г., Домнин М.В., Сенько О.В., Степанов Н.А., Лягин И.В., Маслова О.В., Угарова Н.Н.

Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
elena_efremenko@list.ru

Аннотация. Интерес к различным биотехнологическим процессам, которые могут быть улучшены по своим показателям благодаря использованию высококонцентрированных популяций клеток микроорганизмов, находящихся в составе природных или искусственно сформированных консорциумов, существует на научном и практическом уровне. В докладе представлена информация о подходах к формированию, исследованию и управлению функционированием подобных биокаталитических систем. Отражены подходы к конструированию комбинированных средств супрессии многоклеточных микробных систем, катализирующих многие деградационные процессы, на основе ферментов, подавляющих кворумный ответ в клетках разных микроорганизмов.

Ключевые слова: кворумные молекулы, лактоназы, аденозинтрифосфат, супрессия консорциумов, иммобилизация клеток

Всё большее внимание привлекают к себе с научной и практической точек зрения высококонцентрированные популяции клеток разных микроорганизмов, способных осуществлять разложение различных экополлютантов а аэробных, анаэробных и комбинированных условиях [1-5]. Увеличение скоростей биокаталитических трансформаций исходных веществ в коммерчески значимые продукты или детоксификация разных сред (почв, грунтов, водных сред) достигаются именно благодаря целенаправленному формированию и использованию биокаталитических систем с высокими концентрациями клеток микроорганизмов. При этом гетерогенный состав таких биокаталитических систем часто обеспечивает лучшие результаты по достижению максимальных показателей процессов. Конструирование природоподобных вариантов так называемых искусственных консорциумов, формирующих эффективные биокаталитические системы, часто с целенаправленно создаваемым гетерогенным составом микробных клеток позволяет сочетать в себе метаболические потенциалы разных участников таких систем при тесном их взаимодействии. В качестве результата эффективного функционирования продуктов такой «синтетической биологии», как правило, фиксируется улучшение известных или даже появление новых характеристик у искусственных микробных консорциумов [3-7]. Очень эффективным для контроля состояния консорциумов оказался метод биолюминесцентной АТФ-метрии [8].

Следует отметить, что наиболее часто объектами исследования в таких сообществах становятся именно бактериальные клетки, обладающие самым широким спектром биохимических путей трансформации и биодеградации экополлютантов [2-3], однако активно развиваются разработки в области формирования микробных искусственных консорциумов, в которые входят клетки дрожжей, мицелиальных грибов и микроводорослей, ориентированные на применение в процессах, снижающих уровни загрязнения разных сред экополлютанами и конверсию различных отходов сельского хозяйства и промышленности [1-5]. В ряде случаев достигаются значительные успехи по использованию искусственных консорциумов в комбинированной трансформации отходов разных производств, особенно при использовании гибридных подходов к реализации процессов, а именно при использовании химических стадий предобработки исходного сырья с последующей биокаталитической трансформацией продуктов химической деградации [9].

Использование клеток в иммобилизованной форме и при их высоких концентрациях для реализации разных процессов позволяет формировать условия для длительного и стабильно продуктивного их *функционирования.* В основе этого устойчивого функционирования лежит кворумный ответ (КО) – это генетически запрограммированная система взаимодействий между клетками через, так называемые, сигнальные молекулы кворума, способные регулировать экспрессию генов микроорганизмов в ответ на повышение плотности клеточных популяций. Установлено, что таким КО обладают клетки разных

микроорганизмов: бактерии, мицелиальные грибы, дрожжи, микроводоросли и археи [1]. Знания о способах регуляции КО в клетках разных микроорганизмов даёт в руки исследователей и практиков ключи от систем управления многими биокаталитическими процессами с участием отдельных ферментов, клеток и сложных по составу микробных консорциумов.

Разработаны подходы к оптимизации условий формирования и организации функционирования таких высококонцентрированных клеточных популяций, а также подбор «партнеров» для получения синергического эффекта при создании искусственных консорциумов микроорганизмов [10-14]. Одновременно с этим сформировалось понимание того, как можно ферменты, катализирующие гидролиз сигнальных молекул КО у разных микроорганизмов и запускающих процесс формирования у них резистентности к негативным факторам, сочетать с антимикробными агентами. Такие сочетания формируют основу для комбинированного супрессивного воздействия на биокаталитические микробные системы, в том числе сложного гетерогенного состава. Применение таких сочетаний может быть довольно широким, так как формирование и пребывание клеток в состоянии КО характерно для болезнетворных микроорганизмов, клеток, участвующих в биокоррозии металлических изделий, метаногенном накоплении свалочного газа на мусорных полигонах, деструкции полимерных материалов и т.п..).

Использование методов компьютерного моделирования обеспечило успешный отбор ферментов, максимально эффективно катализирующих гидролиз молекул КО бактерий, мицелиальных грибов и дрожжей, а также выбор для этих гидролаз наиболее «удачных партнёров» среди антимикробных агентов, для их совместного применения. Применение биоинформатических подходов к решению задач по подавлению роста и развития сложных по микробному составу консорциумов представляется сегодня одним из перспективных направлений научно-практических исследований в области экологической энзимологии, составляющей основу разработки многих экоориентированных и природоподобных процессов. Весьма успешными здесь оказались исследования, проводимые с применением ферментов, подавляющих КО, в комбинации с гуминовыми веществами природного происхождения и искусственно полученными из отходов сельского хозяйства [14].

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова (тема № 121041500039-8).

Список литературы

1. Efremenko E., Senko O., Stepanov N. et al. Quorum sensing as a trigger that improves characteristics of microbial biocatalysts. // Microorganism. – 2023. – Vol. 11. – Article 1395.
2. Efremenko E., Stepanov N., Senko O. et al. Progressive biocatalysts for the treatment of aqueous systems containing pharmaceutical pollutants //Life. – 2023. – Vol. 13. – No. 3. – Article e841.
3. Efremenko E., Stepanov N., Maslova O. et al. “Unity and struggle of opposites” as a basis for the functioning of synthetic bacterial immobilized consortium that continuously degrades organophosphorus pesticides. // Microorganisms. – 2022. – Vol. 10. – Article 1394.
4. Efremenko E., Stepanov N., Senko O. et al. Using fungi in artificial microbial consortia to solve bioremediation problems. // Microorganisms – 2024. – Vol. 12. – Article 470.
5. Stepanov N., Senko O., Aslanli A. Maslova, O.; Efremenko, E. Enhanced biogas production from glucose and glycerol by artificial consortia of anaerobic sludge with Immobilized Yeast. // Fermentation. – 2025. – Vol.11. – Article 352.
6. Efremenko E., Stepanov N., Senko O. et al. “Stop, Little Pot” as the Motto of Suppressive Management of Various Microbial Consortia. // Microorganisms. – 2024. – Vol.12. – Article 1650.
7. Efremenko E., Senko O., Maslova O. et al. Biocatalysts in synthesis of microbial polysaccharides: Properties and development trends. //Catalysts. – 2022. – Vol.12. – Article 1377.
8. Efremenko E., Senko O., Stepanov N. et al. Luminescent analysis of ATP: Modern objects and processes for sensing. // Chemosensors. – 2022. – Vol. 10. – Article 493.
9. Efremenko E., Senko O., Maslova O. et al. Destruction of mycotoxins in poultry waste under anaerobic conditions within methanogenesis catalyzed by artificial microbial consortia. // Toxins – 2023. – Vol. 15. – Article 205ю

10. Domnin M., Aslanli A., Senko O., et al. Enzymes degrading fungal cell wall components vs. those exhibiting lactonase activity as participants of antifungals. // Sci. – 2025. – Vol. 7. – Article 169.
11. Aslanli A., Domnin M., Stepanov N., Senko O., Efremenko E. Action enhancement of antimicrobial peptides by their combination with enzymes hydrolyzing fungal quorum molecules. // Int. J. Biol. Macromol. – 2024. – Vol. 280. – Article 136066.
12. Efremenko E., Aslanli A., Domnin M. et al. Enzymes with lactonase activity against fungal quorum molecules as effective antifungals. // Biomolecules. – 2024. – Vol. 14. – Article 383.
13. Aslanli A., Maslova O., Lyagin I. et al. Suppression of fungal growth by ionophores through inhibition of hydrolases secreted by fungi. // Biocatal. Agric. Biotechnol. — 2025. — Article 10382
14. Efremenko E., Stepanov N., Senko O. et al. Strategies for variable regulation of methanogenesis efficiency and velocity. // *Appl. Microb. Biotechnol.* — 2022. — Vol. 106. — P. 6833–6845.

УДК: 577.112

СТАБИЛЬНОСТЬ И ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ БИФУНКЦИОНАЛЬНОЙ 5’-НУКЛЕОТИДАЗЫ ИЗ LIMOSILACTOBACILLUS REUTERI LR1

Ефремова А.Д.[1], Коршунова В.С.[1,2], Логинова А.А. [1,3], Чикурова Н.Ю.[1,3], Горбовская А.В.[1,3], Клейменов С.Ю.[1], Антипов А.Н.[1], Пометун А.А.[1,3]

[1] ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия
[2] Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия
[3] Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
nastya.efremova.2000@gmail.com

Аннотация. В данной работе определены некоторые структурные особенности и стабильность 5’-нуклеотидазы из *Limosilactobacillus reuteri* LR1. В ходе эксперимента было выявлено, что фермент представляет собой димер, температура плавления – 45,4°C. Проведены измерения ферментативной активности с наиболее предпочтительным субстратом – АМФ, получены результаты при нескольких температурах.

Ключевые слова. 5’-нуклеотидаза, АМФ, лактобактерии, пробиотики, *Limosilactobacillus reuteri.*

Мультирезистентность к антибиотикам среди патогенных бактерий неуклонно растёт с каждым годом, что обуславливает необходимость разработки новых антибактериальных препаратов. В 2021 году было обнаружено, что два штамма лактобактерий (*Limosilactobacillus reuteri* LR1 и *Lacticaseibacillus rhamnosus* F), угнетают рост бактерий *Klebsiella pneumoniae* при совместном культивировании. Впоследствии проведенный протеомный анализ группы белков, выделенных лактобактериями в ответ на действие патогена, выявил в их числе фермент бифункциональную металлофосфатазу или 5’-нуклеотидазу из *L. reuteri* (LreBM) [1]. Фермент 5’-нуклеотидаза (E.C. 3.1.3.5) присутствует у всех живых организмов, характеризуется функциональным разнообразием и влияет на метаболизм нуклеотидов, катализируя гидролиз фосфорно-эфирной связи 5′-нуклеотидов до соответствующего нуклеозида и фосфата. Изучение рекомбинантной нуклеотидазы лактобактерий может помочь понять механизм взаимодействия между лактобактериями и патогенными штаммами, а также в разработке новых антибактериальных препаратов.

В ходе работы ген, кодирующий LreBM, был клонирован в клетках *E. coli*, фермент получен в активной и растворимой форме. Очистку проводили, используя метод металл-хелатной хроматографии с последующим обессоливанием. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии определили температурную стабильность, с помощью аналитической гель-фильтрации выявили олигомерный состав. В результате было показано, что фермент представляет собой димер общей массой 117 кДа. При наложении модельной структуры LreBM с уже решёнными структурами 5’-нуклеотидаз из других источников, наилучшая сходимость структур была выявлена с 5’-нуклеотидазой из *Escherichia coli*, активный сайт которой расположен на стыке N- и C-концевого доменов. Результаты ДСК представлены кривой плавления с максимумом при 45,4°C, форма которой позволяет предположить наличие двух калориметрических доменов. Измерения ферментативной активности проводили двумя способами – фосфатным методом и с помощью ВЭЖХ. Полученные препараты проявляют активность с АМФ при нескольких температурах: за 5 минут при 40°C и 37°C фермент гидролизует субстрат полностью, при 30°C та же концентрация субстрата гидролизуется за 10 минут, при этом при 25°C активность фермента незначительная.

Данное исследование проводится с финансовой поддержкой РНФ по гранту № 23–64–10029, https://rscf.ru/project/23-64-10029/.

Список литературы
1. Savinova O.S., Glazunova O.A., Moiseenko K.V., Begunova A.V., Rozhkova I.V., Fedorova T.V. Exoproteome analysis of antagonistic interactions between the probiotic bacteria *Limosilactobacillus reuteri LR1* and *Lacticaseibacillus rhamnosus F* and multidrug resistant strain of *Klebsiella pneumonia* // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 20 (22). – P. 1-18.

УДК 577:11; 577:15

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ НА ПЛЕНКАХ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ДЛЯ БИОМЕДИЦИНСКИХ ЦЕЛЕЙ

Шишпарёнок А.Н.[1], Жданов Д.Д.[1,2]

[1] Институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, лаборатория медицинской биотехнологии
a.shishparyonok@yandex.ru
[2] Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы (Университет РУДН), кафедра биохимии имени академика Т.Т. Березова
zhdanovdd@mail.ru

Аннотация. В докладе представлена информация об иммобилизации фермента L-аспарагиназы (используемого в терапии лейкоза и солидных опухолей) на плёнках бактериальной целлюлозы для повышения его стабильности и пролонгации активности. Предложены два метода: физическая адсорбция, обеспечивающая контролируемое высвобождение фермента и ковалентное присоединение после окисления. Оба подхода применимы для индукции цитотоксичности в клетках меланомы человека.

Ключевые слова: L-аспарагиназа, бактериальная целлюлоза, иммобилизация, стабильность.

Иммобилизация белка – это биотехнологический по его фиксации в подходящей матрице для ограничения подвижности, повышения стабильности и пролонгации активности. L-аспарагиназа (EC 3.5.1.1, L-АСНаза) — фермент, ускоряющий гидролиз L-аспарагина до аспарагиновой кислоты и аммиака. L-АСНаза используется как ключевой фермент в терапии острого лимфобластного лейкоза, а также обладает терапевтической возможностью для лечения некоторых солидных опухолей. L-АСНазы в свободной форме характеризуются низкой стабильностью, коротким временем полужизни и часто вызывают побочные реакции. Ограничения, связанные с применением свободных форм L-АСНаз, можно преодолеть посредством иммобилизации. Бактериальная целлюлоза (БЦ) перспективна для иммобилизации терапевтических белков из-из хорошей биосовместимости и присутствия нескольких функциональных химически активных групп в структуре, пригодных для связывания фермента. В работе предложены два подхода по иммобилизации L-АСНазы *Erwinia carotovora* [1,2,3] на плёнках БЦ: методом физической адсорбции и ковалентного присоединения. Плёнки БЦ получали при культивировании штамма-продуцента *Komagataeibacter hansenii*. Для физической адсорбции плёнки инкубировали в растворе фермента (0,5 мг/мл) в буфере HEPES при pH = 8,0. Фермент, иммобилизованный на плёнках, показал профиль высвобождения, описываемый кинетической моделью нулевого порядка и моделью Корсмейера-Пеппаса. Высвобождение характеризовалось контролируемой диффузией, при которой терапевтический фермент высвобождался с постоянной скоростью. Пленки бактериальной целлюлозы с иммобилизованным ферментом обладали повышенной цитотоксичностью по отношению к клеткам меланомы человека линии A875. Для ковалентной иммобилизации фермента, пленки предварительно окисляли перйодатом натрия ($NaIO_4$) и ковалентно связывали с ферментом. Иммобилизованный таким образом фермент проявлял активность даже при 60°C и в диапазоне pH 6 – 11, был устойчив к действию трипсина, мочевины и сохранял 100% активности после 8 циклов использования в отличие от свободной формы L-АСНазы. Ковалентно иммобилизованная на окисленных плёнках БЦ L-АСНаза обладала цитотоксичностью даже в отношении слабо чувствительных клеток солидных опухолей линий A431, A549 и SW-620. Предложенные в работе подходы применимы для иммобилизации и оптимизации функций других ферментов с потенциальной терапевтической активностью.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021 - 2030 годы) (№ 122022800499-5)

Список литературы
1. Shishparenok A.N., Koroleva S.A., Dobryakova N.V. et al. Bacterial cellulose films for L-asparaginase delivery to melanoma cells // Int J Biol Macromol. – 2024. –V. 276 (1). – P. 133932.
2. Shishparenok A.N., Petryaev E.R., Koroleva S.A., et. al. Bacterial Cellulose-Chitosan Composite for Prolonged-Action L-Asparaginase in Treatment of Melanoma Cells // Biochemistry Moscow – 2024. – V. 89. – P. 1727–1743.
3. Shishparenok A.N., Gladilina Yu.A., Pokrovskaya M.V. et al. Immobilization of L-asparaginase on oxidized bacterial cellulose to enhance stability and cytotoxic activity // Int J Biol Macromol. – 2026. – V. 339(1). – 149992.

УДК 614.31

ПРИМЕНЕНИЕ ИММУНОХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ТОКСИЧНЫХ КОНТАМИНАНТОВ В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ

Жердев А.В.

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва, РФ
zherdev@inbi.ras.ru

Аннотация. В докладе рассмотрены специфические задачи, решаемые при обеспечении эффективного применения иммунохроматографических тест-систем в контроле токсичных контаминантов различных продуктов питания. Представлены разработанные подходы для снижения пределов обнаружения целевых соединений, простой и быстрой пробоподготовки, совместимой с последующей иммунодетекцией. Обсуждается адаптация протоколов тестирования к мониторингу превышения нормативных требований безопасности продуктов.

Ключевые слова: иммунохроматографические тест-системы, ветеринарные препараты, токсиканты, пищевая безопасность.

Вопросы безопасности пищевой продукции в современном обществе становятся крайне важными, что обусловлено как техногенной контаминацией окружающей среды, так и применением разнообразных препаратов для интенсификации растениеводства и животноводства. Нормативные требования к контролю токсичных контаминантов в продуктах питания регулярно изменяются – возрастает число контролируемых соединений, снижаются максимально допустимые уровни для многих из них. В этой связи крайне востребованы аналитические системы, позволяющие проводить простой и оперативный контроль контаминации без обращения в специализированные лаборатории, что обеспечивает возможность широкого скринингового мониторинга. В докладе представлены разработки иммунохроматографических тест-систем для контроля низкомолекулярных токсикантов (антибиотики, пестициды, микотоксины и др.) и обсуждаются особенности их адаптации к контролю сырья и готовой продукции пищевых производств.

В отличие от медицинской диагностики, применение иммунохроматографии в контроле качества пищи сопряжено с необходимостью работы с большими объемами проб, преимущественно твердых, содержащих значительное число матричных компонентов, влияющих как на распознавание антителами целевых аналитов, так и на движение и взаимодействие реагентов в мембранных элементах тест-полосок. В связи с этим в работе проведено сопоставление различных способов пробоподготовки, выбраны наиболее эффективные экстрагирующие среды для разных групп токсикантов. Изучена стабильность свободных и иммобилизованных антител в различных водно-органических системах, и с учетом полученных данных обоснованы условия иммунохроматографического тестирования экстрактов пищевых проб. Охарактеризовано применение магнитных иммуносорбентов для концентрирования аналитов и их отделения от компонентов матрикса, установлены кинетические и концентрационные зависимости концентрирования. Исследована эффективность различных способов усиления оптического сигнала в иммунохроматографии, оценен их вклад в снижение пределов обнаружения в зависимости от аффинности иммунореагентов. Представлены данные по селективности иммунохроматографического определения структурно близких соединений, возможностям управления селективностью для обеспечения индивидуального или класс-специфического анализа. Рассмотрены особенности мультизонной иммунохроматографии для одновременного контроля нескольких соединений.

Для разработанных иммунохроматографических тест-систем показана возможность достоверного контроля токсичных контаминант разных классов за 20-30 минут с полнотой выявления не менее 80%

и высокой степенью корреляции с результатами референтных инструментальных (хроматографических) методов. Реализованные подходы к концентрированию аналитов и амплификации сигнала обеспечивают снижение пределов обнаружения на 1-2 порядка, способствуя эффективному внелабораторному мониторингу.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 24-16-00273).

УДК 53.082.9

СПЕКТРОСКОПИЯ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ КАК ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИТИЧЕСКИЙ МЕТОД ДЛЯ БИОСЕНСОРОВ И ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ПАТОГЕНОВ

Завьялова Е.Г., Мушенков В.А., Мещерякова Н.Ф.

Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
zlenka2006@gmail.com

Аннотация. В докладе представлен аналитический обзор биосенсоров и тест-систем на основе спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) для определения вирусов и бактерий. Приведены результаты экспериментальной работы по определению вирусов и бактерий с использованием ГКР-биосенсоров, а также тест-систем для фенотипического определения устойчивости бактерий к антибиотикам с использованием ГКР-субстратов.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, бактерии, биосенсор, вирус, ГКР-спектроскопия, КР-спектроскопия, тест-система.

Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) — это метод идентификации веществ и определения аналитов сверхнизких концентраций в сложных средах по их уникальному спектру комбинационного рассеяния (КР), интенсивность которого многократно увеличена за счет наноструктурированного ГКР-субстрата. Развитие биосенсоров и тест-систем на основе спектроскопии ГКР позволяет создавать воспроизводимые, чувствительные, быстрые и простые в использовании системы внелабораторной диагностики, перспективные для дальнейшего внедрения. В недавнем обзоре [1] были обобщены достижения по определению вирусов и бактерий с помощью спектроскопии ГКР. Проведено сравнение различных подходов к конструированию биосенсоров, генерации аналитических сигналов, а также первые попытки их использования для реальных клинических образцов. Конечной целью разрабатываемых систем является обнаружение патогенов в биологических жидкостях в следовых количествах. Применяемые в настоящее время в клинической практике диагностические средства не соответствуют критериям точных тестов для внелабораторной диагностики, таким как время анализа <20 мин, предел обнаружения 100–1000 геномов·мл$^{-1}$ и специфичность обнаружения. Некоторые описанные ГКР-биосенсоры соответствуют этим критериям, позволяя выявить несколько патогенов в образце одновременно, т.е. обеспечивая мультиплексность анализа.

Серия наших работ показала, что использование ДНК-аптамеров в качестве узнающих элементов ГКР-биосенсоров имеет дополнительные преимущества, такие как простота и управляемость иммобилизации на поверхности ГКР-подложек, использование конформационных переходов олигонуклеотидов для генерации аналитического сигнала, высокая скорость комплексообразования, стабильность сенсоров при хранении [2-7]. В поисках «золотой середины» между коэффициентом усиления ГКР-субстрата, стоимости его производства, и простоты методики анализа, стоит рассмотреть дополнительные стратегии концентрирования аналита, такие как использование фильтрующих устройств с ГКР-слоем [2,4]. Скорость анализа может быть значительно увеличена за счет использования конформационных переходов ДНК-аптамеров, в этом случае аптамер модифицирован тиольной группой по одному из концов биомолекулы для ее иммобилизации на поверхности металла, а второй конец модифицирован резонансной КР-меткой. Интенсивность спектра КР-метки зависит от ее близости к поверхности металла, которая должна изменяться при взаимодействии с аналитом. Такой подход делает определение

аналита одноэтапным, поскольку связывание аналита сразу дает аналитический сигнал – изменение интенсивности спектров КР и / или поверхностно-усиленной люминесценции, если КР-метка была флуорофором [2-5,7]. Далее только воспроизводимость поверхности ГКР-субстрата определяет, применим ли биосенсор для количественного анализа, или только для качественного. Пределы обнаружения достигают 10-100 патогенов в мл для вирусов гриппа А, SARS-CoV-2 и бактерий *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*.

Еще одной важной способностью биосенсоров и тест-систем на основе эффекта ГКР является быстрое определение лекарственной устойчивости низких титров возбудителей. Традиционные тесты для определения чувствительности бактерий к антибиотикам основаны на выявлении роста бактерий в присутствии антимикробного препарата. На проведение этих тестов уходит не менее 1-2 дней, поэтому часто эмпирические схемы терапии начинают применять до получения результатов теста. Тест-системы на основе полимеразной цепной реакции требуют значительно меньшего времени анализа, однако, далеко не все генетические детерминанты устойчивости к антибиотикам известны в настоящее время. Экспресс-тесты на устойчивость к противомикробным препаратам необходимы для оптимизации лечения бактериальной инфекции. Сочетание МТТ-теста с КР-спектроскопией (МТТ-КР) позволяет определить чувствительность бактерий к противомикробным препаратам в течение 1,5 часов, для чего требуется 10^6-10^8 КОЕ/мл бактерий [8]. Подход основан на том, что формазан, образующийся при восстановлении МТТ-реагента является резонансной КР-меткой для лазеров с длиной волны 633 нм. Клинические образцы обычно содержат значительно меньшие титры бактерий. Для повышения чувствительности МТТ-КР была предложена ГКР-спектроскопия. ГКР-спектры бактерий, обработанных МТТ, были получены с использованием трековых мембран, покрытых наночастицами серебра (фильтрующий ГКР-субстрат) [9]. Эти мембраны одновременно концентрируют образец на поверхности и генерируют ГКР-спектры при лазерном облучении с длиной волны 532 нм или 638 нм. Как спектры отдельной бактерии, так и усредненная интенсивность пробы являются информативными для определения устойчивости к противомикробным препаратам. Титр бактерий может быть снижен до 100 КОЕ/мл с одновременным определением чувствительности к антибиотикам. Получена корреляция между минимальными подавляющими концентрациями из метода МТТ-ГКР и традиционными культуральными методами, например, метода микроразведений. Общее время анализа составило 1,5 часа, поэтому этот быстрый чувствительный тест представляет большой интерес для применения в медицинских учреждениях, что позволяет избежать длительного культивирования бактерий.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант №24-65-00015, https://rscf.ru/project/24-65-00015.

Список литературы

1. Alieva R.S., Mushenkov V.A., Kukushkin V.I. Zavyalova E.G. Surface-enhanced Raman spectroscopy as a highly sensitive analytical method for biosensors and test systems for pathogen detection // Russian Chemical Reviews. – 2026. – Vol. 95. – No. 4. – Art. RCR5209.

2. Tikhonova D., Andreev E., Akhmetova A., Meshcheryakova N., Zaborova O., Mukhametova L., Alieva R., Kravchenko E., Boravleva E., Dubkov S., Eremin S., Yaminsky I., Nechaev A., Zavyalova E. Specific determination of influenza virus A by SERS-active spike-like track-etched membranes // Analytica Chimica Acta. – 2026. – Vol. 1388. – Art. 345100.

3. Kukushkin V., Ambartsumyan O., Astrakhantseva A., Gushchin V., Nikonova A., Dorofeeva A., Zverev V., Gambaryan A., Tikhonova D., Sovetnikov T., Akhmetova A., Yaminsky I., Zavyalova E. Lithographic SERS aptasensor for ultrasensitive detection of SARS-CoV-2 in biological fluids // Nanomaterials. – 2022. – Vol. 12. – No. 21. Art. 3854.

4. Kukushkin V., Kristavchuk O., Andreev E., Meshcheryakova N., Zaborova O., Gambaryan A., Nechaev A., Zavyalova E. Aptamer-coated track-etched membranes with a nanostructured silver layer for single virus detection in biological fluids // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2023. – Vol. 10. – Art. 1076749.

5. Kukushkin V., Ambartsumyan O., Subekin A., Astrakhantseva A., Gushchin V., Nikonova A., Dorofeeva A., Zverev V., Keshek A., Meshcheryakova N., Zaborova O., Gambaryan A., Zavyalova E. Multiplex lithographic SERS aptasensor for detection of several respiratory viruses in one pot // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24. – No. 9. – Art. 8081.
6. Zhdanov G., Gambaryan A., Akhmetova A., Yaminsky I., Kukushkin V., Zavyalova E. Nanoisland SERS-substrates for specific detection and quantification of influenza A virus // Biosensors. – 2023. – Vol. 14. – No. 1. – Art. 20.
7. Alieva R., Sokolova S., Zhemchuzhina N., Pankin D., Povolotckaia A., Novikov V., Kuznetsov S., Gulyaev A., Moskovskiy M., Zavyalova E. A surface-enhanced raman spectroscopy-based aptasensor for the detection of deoxynivalenol and T-2 mycotoxins // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Vol. 25. – No. 17. – Art. 9534.
8. Mushenkov V., Zhigalova K., Denisov P., Gordeev A., Lukyanov D., Kukushkin V., Priputnevich T., Zavyalova, E. Rapid Raman spectroscopy-based test for antimicrobial resistance // Open biology. – 2025. – Vol. 15. – No. 2. – Art. 240258.
9. Mushenkov V, Andreev E, Nechaev A, Poddubikov A, Kukushkin V, Zavyalova E. Surface-enhanced Raman spectroscopy on the membranes for antimicrobial resistance testing // BioRxiv. – 2025. – Art. 2025.07.12.664554.

УДК 547.992.3

УФ ЗАЩИТНЫЕ И АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ЛИГНИНОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНОЙ БИОМАССЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЛУБОКИХ ЭВТЕКТИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ РАЗЛИЧНОГО СОСТАВА

Морозова О.В.[1], Васильева И.А.[1], Хлупова М.Е. [1], Зайцева Е.А.[2]

[1] Институт биохимии имени А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, г. Москва, РФ

[2] Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ

zaitsevaea@my.msu.ru

Аннотация. Проведено сравнительное исследование антиоксидантных и УФ-защитных свойств образцов лигнина, экстрагированных из соломы тростника глубокими эвтектическими растворителями (ГЭР) различного состава: хлорид холина/щавелевая кислота (ХХ/Щк), хлорид холина/молочная кислота (Хх/Мк) и хлорид холина/моноэтаноламин (Хх/Эа). Показано, что состав ГЭР оказывает значительное влияние на структуру и, соответственно, свойства экстрагированных лигнинов. Антиоксидантная активность и эффективность экранирования УФ-излучения лигнинов снижались в ряду Лиг-Щк > Лиг-Мк > Лиг-Эа. Образцы Лиг-Щк и Лиг-Мк показали высокую эффективность в качестве активного компонента пленок из поливинилового спирта, экранирующих УФ-излучение, и могут быть использованы в составе упаковочных материалов для пищевых продуктов и лекарств.

Ключевые слова: лигнин, глубокие эвтектические растворители, композитные пленки лигнин/поливиниловый спирт, антиоксидантная активность, защита от УФ-излучения

Среди биополимеров лигнин занимает второе место по распространенности в природе после целлюлозы и представляет богатый природный ресурс [1]. Из отходов целлюлозно-бумажного производства ежегодно для переработки доступно около 50 млн. тонн лигнина, однако из них перерабатывается только 2%. Доступность, биоразлагаемость и подходящие механические свойства лигнина делают его привлекательным объектом для практического использования в различных областях [2]. Лигноцеллюлоза является ценным природным возобновляемым сырьем. Традиционные методы делигнификации лигноцеллюлозной биомассы во многом не отвечают экологическим требованиям. Предварительная обработка лигноцеллюлозы глубокими эвтектическими растворителями (ГЭР) перспективна и отвечает требованиям зеленой химии [3]. Лигнин, в отличие от целлюлозы, обладает высокой растворимостью во многих ГЭР. В результате предобработки лигноцеллюлозной биомассы различными ГЭР повышается эффективность ферментативного гидролиза целлюлозы, а в качестве побочного продукта получается высококачественный лигнин.

Состав, структура и свойства лигнина зависят как от исходного лигноцеллюлозного материала, так и от метода экстракции [4]. Лигнины обладают антиоксидантными и антимикробными свойствами, способностью поглощать УФ-излучение, биосовместимостью и низкой цитотоксичностью, поэтому из них можно получать ценные продукты, такие как гидрогели, упаковочные и УФ-защитные материалы [5]. Кроме того, использование лигнина в продуктах с высокой добавленной стоимостью важно для повышения экономической эффективности биоперерабатывающих предприятий [6].

Целью настоящей работы было сравнительное изучение свойств лигнинов, экстрагированных из соломы тростника с использованием различных ГЭР на основе холин хлорида, для оценки их антиоксидантной активности и УФ-защитных свойств.

Для экстракции лигнина из соломы тростника были использованы три ГЭР холин хлорид/щавелевая кислота (мол. соотношение 1:1, Хх/Щк), холин хлорид/молочная кислота (1:5, Хх/Мк) и холин хлорид/моноэтаноламин (1:6, Хх/Эа), которые получали смешиванием компонентов при 60 °С. Экстрагированные лигнины различались по цвету, а их выход составлял 8.2, 7.0 и 6.1 вес.%, после предобработки Хх/Щк, Хх/Мк и Хх/Эа, соответственно. Содержание полисахаридов в образцах, определенное методом ВЭЖХ, было незначительным (3.4-3.9 вес.%).

Антиоксидантная активность лигнина напрямую связана с его структурой. Фенольные гидроксильные группы, а также сопряженные двойные связи в лигнине оказывают положительное влияние на антиоксидантную активность, в то время как наличие алифатических гидроксильных групп лигнина отрицательно влияет на антиоксидантную активность [7].

Для оценки антиоксидантного потенциала лигнинов использовали метод восстановления радикалов $ABTS^{+\bullet}$ и $DPPH^{\bullet}$. Антиоксидантная активность лигнинов уменьшалась в ряду Лиг-Щк > Лиг-Мк > Лиг-Эа как для $ABTS^{+\bullet}$, так и для $DPPH^{\bullet}$ (Таблица 1). Способность Лиг-Щк удалять свободные радикалы $ABTS^{+\bullet}$ была немного ниже, чем у коммерческого антиоксиданта Trolox, который использовали в качестве контроля.

Таблица 1. Содержание фенольных групп и антиоксидантная активность лигнинов

Образец лигнина	ОСФ[1]	IC_{50} (ABTS)[2]	IC_{50} (DPPH)[2]
Лиг-Щк	169.67±1.45	10	50
Лиг-Мк	77.17±1.48	30	200
Лиг-Эа	23.11±0.73	60	500
Trolox	—	3	10

[1] Общее содержание фенолов выражали в мг эквивалентов галловой кислоты на г сухого образца лигнина

[2] Концентрация лигнина (мкг/мл), необходимая для нейтрализации 50% радикалов.

Наше исследование продемонстрировало корреляцию между содержанием фенольных групп и антиоксидантной активностью образцов лигнина. Общее содержание фенольных соединений (ОСФ) в образцах лигнина определяли спектрофотометрическим методом Фолина-Чокальтеу с использованием ДМСО в качестве растворителя и галловой кислоты в качестве эталонного соединения [8]. Среди трех образцов лигнина Лиг-Щк показал самое высокое общее содержание фенолов, и самое высокое значение IC_{50}, в то время как Лиг-Эа показал самую низкую антиоксидантную активность и самое низкое содержание фенольных групп.

Методом сольвент-антисольвент [9] были получены и охарактеризованы наноразмерные частицы лигнинов (НЧ). НЧ лигнинов (НЧ-Щк, НЧ-Мк, Нч-Эа) имели размеры 160, 200 и 250 нм и ζ-потенциал 24.19, 31.41 и 24.78 mV, соответственно. Полученные НЧ обладали практически такими же антиоксидантными свойствами, как и исходные экстрагированные лигнины.

Было исследовано влияние трех образцов лигнина на УФ-защитные свойства биоразлагаемых пленок поливинилового спирта (ПВС). Пленки чистого ПВС пропускали 90% УФ-излучения в диапазоне 200–400 нм. Включение лигнинов в матрицу ПВС приводило к существенному экранированию УФ-излучения. Для всех трех образов лигнина увеличение массового содержания лигнина в пленке ПВС (с 0.5 до 4 вес.%) обеспечивало более высокую защиту от УФ-излучения, а эффективность защиты увеличивалась в ряду Лиг-Щк > Лиг-Мк > Лиг-Эа. Установлено, что пленки ПВС/Лиг-Щк и ПВС/Лиг-Мк с массовым содержанием лигнина 4 вес.% блокировали 96 и 87 % УФ-излучения в UVA диапазоне и полностью блокировали излучение в UVB диапазоне. Однако увеличение содержания лигнина с 0.5 до 4 вес.% несколько снижало прозрачность пленок в видимой области спектра.

Весь комплекс исследований, проведенных в данной работе, показал, что состав ГЭР оказывает существенное влияние на структуру и, соответственно, на свойства экстрагированного лигнина. Наибольшей антиоксидантной активностью и УФ-защитными свойствами обладал лигнин, полученный после обработки соломы тростника ГЭР на основе холин хлорида и щавелевой кислоты. Высокая антиоксидантная активность образцов лигнина, и особенно Лиг-Щк, позволяет сделать вывод, что они могут быть использованы в качестве потенциальных антиоксидантов, а прозрачные пленки ПВС/Лиг с хорошими защитными свойствами от УФ-излучения являются перспективными материалами для упаковки пищевых продуктов и лекарств.

Список литературы

Brienza, F.; Cannella, D.; Montesdeoca, D.; Cybulska, I.; Debecker, D.P. A guide to lignin valorization in biorefineries: Traditional, recent, and forthcoming approaches to convert raw lignocellulose into valuable materials and chemicals // RSC Sustain. – 2024. – Vol. 2. – P. 37–90.
2. Sethupathy S., Morales G.M., Gao L.,Wang, H., Yang B., Jiang J., Sun J., Zhu D. Lignin valorization: Status, challenges and opportunities // Bioresour. Technol. – 2022. – Vol. 347. – 126696.
3. Recent progress in deep eutectic solvent (DES) fractionation of lignocellulosic component: A review // Renew. Sustain. Energy Rev. – 2024. – Vol. 192. – 114243.
4. Zheng L., Lu G., Pei W., Yan W., Li Y., Zhang L., Huang C., Jiang Q. Understanding the relationship between the structural properties of lignin and their biological activities // Int. J. Biol. Macromol. – 2021. – Vol. 190. – P. 291–300.
5. Collins M.N.. Nechifor M., Tanasă F., Zănoagă M., McLoughlin A., Stróżyk M.A., Culebras M., Teacă C.-A. Valorization of lignin in polymer and composite systems for advanced engineering applications – A review. // Int. J. Biol. Macromol. – 2019. – Vol. 131. – P. 828–849.
6. Ragauskas A.J., Beckham G.T., Biddy M.J., Chandra R., Chen F., Davis M.F., Davison B.H., Dixon R.A., Gilna P., Keller M., Langan P., Naskar A.K., Saddler J.N., Tschaplinski T.J.. Tuska, G.A., Wyman C.E. Lignin valorization: improving lignin processing in the biorefinery // Science – 2014. – Vol. 344. – 1246843.
7. Li P., Lu Y., Long G., Li S., Li K., Jiang B., Wu W. Structural characterization of acid des-modified alkaline lignin and evaluation of antioxidant properties // Forests – 2023. – Vol. 14. – P. 550.
8. Gordobil O., Herrera R., Yahyaoui M.,˙Ilk S., Kaya M., Labidi, J. Potential use of kraft and organosolv lignins as a natural additive for healthcare products // RSC Adv. – 2018. – Vol. 8. – P. 24525–24533.
9. Lievonen M., Valle-Delgado, J.J., Mattinen M.-L., Hult E.L., Lintinen K., Kostiainen M.A., Paananen A., Szilvay G.R., Setäläb H., Österberg, M. A simple process for lignin nanoparticle preparation // Green Chem. – 2016. – Vol. 18. – P.1416–1422.

УДК 620.178.156

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПЛЕНОК ХИТОЗАН-ФИБРОИН МЕТОДОМ НЕПРЕРЫВНОГО НАНОИНДЕНТИРОВАНИЯ

Тюрин А.И.[1], Коренков В.В.[1], Головин Д.Ю.[1], Васюков В.М.[1], Сажнев Н.А.[2], Зайцева Е.А.[3], Кильдеева Н.Р.[2], Клячко Н.Л.[3]

[1] Тамбовский государственный университет имени Г.Р. Державина, Тамбов, Россия
[2] Российский государственный университет имени А.Н. Косыгина, Москва, Россия
[3] Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
zaitsevaea@my.msu.ru, tyurinalexander@yandex.ru

Аннотация. Представлены результаты экспериментальных исследований зависимости механических свойств хитозан-фиброиновых полимерных пленок, предназначенных для медицинского применения в качестве субстрата для пролиферации клеток, от частоты и скорости деформации. Для исследования использовали различные моды динамического наноиндентирования. По результатам сопоставления экспериментальных данных была разработана адекватная аналитическая модель вязкоупругих свойств материала.

Ключевые слова: хитозан-фиброиновые полимерные пленки, наноиндетирование, механические свойства полимерных пленок, тканевая инженерия, регенеративная медицина

Развитие тканевой инженерии и регенеративной медицины тесно связано с архитектурой и свойствами искусственных матриц (матриц роста клеток), которые должны обеспечивать адгезию, пролиферацию и дифференцировку клеток, создавая оптимальные условия для регенерации, а также контролируемое высвобождение лекарственных препаратов [1]. Механическая сила играет ключевую роль в активации и регулировании многочисленных клеточных процессов. Одним из перспективных методов генерации таких сил в различных масштабах (нано-, микро- и макро-) является стрейнтроника — быстро развивающаяся стратегия контроля физико-химических свойств различных материалов посредством контролируемых нано-/микродеформаций [2].

Целью настоящей работы является изучение механических характеристик биополимерных пленок на основе сшитых дженипином хитозана и фиброина, пригодных для использования в регенеративной медицине, с потенциалом дальнейшего контроля физико-химических свойств композитных материалов, созданных с использованием этих матриц, включая клетки и магнитные наночастицы.

Основным компонентом исследуемых матриц (пленок) является хитозан. Хитозан и его производные демонстрируют хорошие волокно- и пленкообразующие свойства. Благодаря своей биосовместимости с тканями человека, биоразлагаемости, низкой токсичности, способности усиливать регенеративные процессы эти материалы представляют особый интерес в медицине [3]. Свойства хитозановых пленок могут быть улучшены за счет различных добавок, таких как наночастицы металлов, графена, фуллерена и его производных, растительных экстрактов. Применение сшивающих реагентов позволяет регулировать растворимость, гидрофильность, осмотические и другие свойства пленок на основе хитозана, а совместное использование с фиброином позволит приблизить характеристики биополимерной матрицы для выращивания клеток к свойствам внеклеточного матрикса.

В работе образцы биополимерных пленок формировали путем заливки растворов хитозана и фиброина, содержащих водный раствор сшивающего агента дженипина (Gp), в чашки Петри. Пленки выдерживали при комнатной температуре (72 часа) для испарения растворителя до достижения постоянного веса. Краткое описание характеристик образцов представлено в табл. 1.

Таблица 1. Характеристики образцов пленок хитозан-фиброинового полимера, сшитых дженипином (Gp), и результаты аппроксимации экспериментальных данных.

Образец пленки	Соотношение		pH/ толщина пленки, мкм	τ_1, с	τ_2, с	k	C
	раствор Хитозан : Фиброин, 2%	Gp/полимер, моль/ моль (ρ)					
1	1:1	0.01	5.6 / 30	0.278	3.46×10^{-4}	5.49	0.0760
2	1:1	0.02	5.6 / 30	0.294	2.73×10^{-4}	5.50	0.0876
3	1:1	0.03	5.6 / 30	0.161	3.98×10^{-4}	5.53	0.0591

Скоростные/частотные зависимости механических свойств полученных образцов, исследовали методами динамического наноиндентирования в режимах ползучести и непрерывного измерения жесткости (CSM). Это позволяло определять значения твердости - H, модуля упругости - E', модуля потерь (рассеяния) - E'' и коэффициента механических потерь - tgδ = E''/E'. Для индентирования был использован наноиндентометр G200 (Agilent, США). Максимальная нагрузка P_{max} приложенная к индентору Берковича составляла 7.00 ± 0.25 мН. Это позволяло получать отпечатки глубиной h=1000 ± 50 нм. Все измерения в режиме CSM выполнены при постоянной скорости относительной деформации $\varepsilon = 0.05c^{-1}$, при частотах f (от 1 до 60 Гц) и амплитудах h_0 (2, 4, 6 и 8 нм) гармонических осцилляций.

Проведенные исследования вязкоупругих свойств позволили получить зависимости E', E'' и $tg\delta$ от частоты f и амплитуды h_0 зондирующих колебаний для всех исследованных образцов. Средние эффективные значения E' для образцов № 1-3, различающихся по значениям соотношения Gp/полимер (ρ) (см. табл. 1), составляли 5.1 ± 0.63, 5.0 ± 1.06 и 5.58 ±1.4 ГПа, соответственно. При этом для всех пленок модули E' продемонстрировали слабую зависимость от f, а минимальное значение $E' \approx 4$ ГПа приходилось на частоту f = 1 Гц. Другой особенностью исследованных пленок было то, что наибольшую упругость они демонстрировали при h_0 = 8 нм, а самое низкое значение E' - при h_0= 2 нм.

В значительно большей степени чем модуль упругости от частоты зависит величина модуля потерь, особенно при больших h_0 (h_0 = 8 нм). При этом для всех образцов зависимость E'' от f оказалась нелинейной: на самой низкой исследованной частоте (f = 1 Гц) величина E'' достигала максимума, при 10 Гц - минимума, а затем (до частоты 60 Гц) - линейно возрастала. Ход частотной зависимости $tg\delta$ для всех образцов пленок практически повторял частотную зависимость E''. Полученные результаты зависимости E'' от h_0 показали, что наибольший модуль потерь имеет место при h_0=8 нм, и только для образца ρ = 0.02 аномально большой модуль потерь реализуется при самой низкой величине h_0=2 нм.

Анализ зависимостей $tg\delta$ от f показал, что в исследованном диапазоне частот наблюдаются две характерных особенности: близкий к линейному рост потерь с увеличением частоты в области высоких частот и резкий рост потерь с уменьшением частоты в области низких частот. Это означает, что наблюдаемые потери определяются как минимум двумя механизмами, с разными характерными временами релаксации τ. Механизм с большим τ может отвечать за ползучесть и проявляет себя резким ростом потерь в низкочастотной области, а линейный рост потерь в области высоких частот может определяться быстрыми перестройками структуры полимера, проявляющимися как внутреннее трение. Проведено моделирование механических свойств изучаемых материалов с использованием подхода, основанного на конструировании вязкоупругой модели из чисто упругих и чисто вязких элементов, соединяемых параллельно или последовательно [4]. Результаты моделирования позволили провести аппроксимацию экспериментальных результатов выражением (1) с очень хорошей точностью, и погрешностью, не превышающей погрешностей эксперимента. Значения констант, найденных в результате аппроксимации, представлены в табл. 1.

$$tg\delta = \frac{1+\omega^2\tau_2^2+k\omega^2\tau_1\tau_2}{\omega\tau_1(1+k+\omega^2\tau_2^2)} + C \quad (1),$$

где $\omega = 2\pi f$ - круговая частота, τ_1 и τ_2 - времена релаксации элементов, определяемых как отношение вязкости к жесткости, k - отношение жесткостей упругих элементов, а C - аддитивная константа. Анализ зависимости $tg\delta$ от h_0 показывает, что величина $tg\delta$ уменьшается с увеличением h_0. Это свидетельствует о заметном ухудшении демпфирующей способности полимерной пленки при этих условиях. С точки зрения практического использования этих материалов в качестве клеточных субстратов в медицинских целях, то есть для приложения силы к клеткам, наибольшим препятствием является макроскопическая ползучесть. Поскольку обнаруженные характерные времена ползучести находятся в диапазоне 0,2–0,3 с (табл. 1), оптимальными представляются частоты ~10 Гц и выше. Более низкие частоты возбуждения позволяют матричному материалу значительно релаксировать, что приводит к заметному снижению механического напряжения на целевых клетках.

Таким образом, показано, что образцы хитозан-фиброиновых полимерных пленок реагируют на малые (наномасштабные) механические напряжения. Ожидается, что механические реакции под воздействием магнитных полей будут наблюдаться при включении магнитных наночастиц в пленки, что позволит в будущем использовать разработанные биоматериалы в качестве клеточных субстратов в медицинских целях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (Соглашение 22-13-00261-П).

Список литературы

1. Richbourg N.R., Peppas N.A., Sikavitsas V.I. Tuning the biomimetic behavior of scaffolds for regenerative medicine through surface modifications // J. Tissue Eng. Regen. Med. – 2019. – Vol. 13. – P. 1275–1293.
2. Bukharaev A.A., Zvezdin A.K., Pyatakov A.P., Fetisov Yu.K. Straintronics: a new trend in micro- and nanoelectronics and material science // Phys. Usp. – 2018. – Vol. 61. – P. 1175–1212.
3. Khubiev O.M., Egorov A.R., Kirichuk A.A., Khrustalev V.N., Tskhovrebov A.G., Kritchenkov A.S. Chitosan-Based Antibacterial Films for Biomedical and Food Applications // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24. – No. 13. – Art. n. 10738.
4. Постников В.С. Исследование молекулярного движения в твердых полимерах методом внутреннего трения // Успехи химии. – 1967. – Т. 36. – No. 10. – С. 1842-1876.

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА АЗОТОФИКСАЦИИ РАСТЕНИЯМИ НА ПРИМЕРЕ СИМБИОСОМ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КОРНЕВЫХ КЛУБЕНЬКОВ КОРМОВЫХ БОБОВ *(Vicia faba L.)*

Зартдинова Р.Ф.[1,2], **Кондаков С.Э.**[1]

[1] *Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва*
[2] *Институт биохимии и физиологии растений, Российская академия наук, Москва*
rosik_75@mail.ru

Аннотация. В работе представлены результаты исследования о способности симбиосом выделенных из корневых клубеньков кормовых бобов, к активному поглощению Ca^{2+}. Эксперименты, проведенные на препаратах симбиосом симбиосомной мембраны с использованием индикаторов Ca^{2+} арсеназо III показали, что на этой мембране функционирует Mg^{2+}-зависимая Ca^{2+}-АТФаза, катализирующая активный транспорт Ca^{2+} из цитоплазмы растительной клетки в симбиосомы через симбиосомноую мембрану. Также Ca^{2+}-АТФаза симбиосомной мембраны является кальмодулин- стимулируемой и обладает способностью использовать альтернативные АТФ другие нуклеозидтрифосфаты, например, ИТФ.

Ключевые слова: симбиосома, азотфиксация, клубеньки, симбиосомная мембрана, Ca^{2+}-АТФаза

Симбиотическая азотофиксация, осуществляемая внутри специализированных органелл растительной клетки — симбиосом, является краеугольным камнем биологической доступности азота в наземных экосистемах и сельском хозяйстве. Симбиосомная мембрана (СМ), происходящая из плазмалеммы хозяина, выступает не просто физическим барьером, но и метаболическим интерфейсом, строго контролирующим обмен метаболитами и сигнальными молекулами между растением и микросимбионтом. Понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе этого обмена, критически важно для создания высокоэффективных растительно-микробных систем с пониженной зависимостью от промышленных азотных удобрений. Симбиоз бобовых растений с клубеньковыми бактериями (ризобиями) является одной из наиболее эффективных систем биологической азотфиксации, имеющей важное сельскохозяйственное значение. Бобовые культуры могут минимизировать свою зависимость от азотных удобрений, вступая в взаимовыгодный симбиоз с ризобиями [1]. Симбиосома — это специализированная внутриклеточная структура, которая образуется внутри клеток корня бобовых культур. Она состоит из азотфиксирующей бактерии (бактероида), окруженной специальной мембраной цитоплазматической клетки корневого волоска вывернутая наизнанку. Важной функцией симбиосомы является фиксация атмосферного азота. Азот диффундирует к бактероиду через мембраны, там под действием фермента нитрогеназы азот восстанавливается до аммиака.

В работе объектом исследования являются симбиосомы, расположенные в корневых клубеньках кормовых бобов (*Vicia faba* L.). Одним из основных элементов регулирования процесса азотофиксации являются ионы кальция. Как дефицит, так и высокие концентрации Ca^{2+} приводят к снижению нитрогеназной активности симбиосом. Концентрация Ca^{2+} регулируется транспортными системами клеточной мембраны и симбиосомной мембраны [2]. Транспорт ионов кальция в симбисому осуществляется Ca^{2+}-АТФазой, расположенной на симбиосомной мембране.

Выделение симбиосом проводили при температуре +4 – +5 °С. путем центрифугирования гомогената корневых клубеньков бобов в ступенчатом градиенте перколла 10%, 25% и 60% с последующей дополнительной очисткой бактероидов с СМ, собранных на интерфейсе 25% от перколла центрифугированием. Осадок бактероидов с симбиосомной мембраной ресуспендировали в гипоосматической среде.

Препарат симбиосом стандартизировали для дальнейших экспериментов по белку по методу Бредфорд. Характеристикой активности выбирали начальную скорость поглощения ионов кальция [3]. Результаты измерения представлены на рис.1 в виде графика.

На графике (рис. 1) показана концентрационная зависимость начальной скорости поглощения Ca^{2+} от концентрации Mg^{2+}, который является кофактором Ca^{2+}-АТФазы. За АТФ-зависимым транспортом кальция через СМ следили с помощью непроникающего через мембраны металлохромного Ca^{2+}-индикатора арсеназо III. Из полученных данных видно, что начальная скорость поглощения кальция достигает максимальных значений при 1 мМ магния в присутствии 1 мМ АТФ в реакционной среде с дальнейшим снижением активности фермента при более высоких концентрациях ионов магния, составляющих 2 мМ.

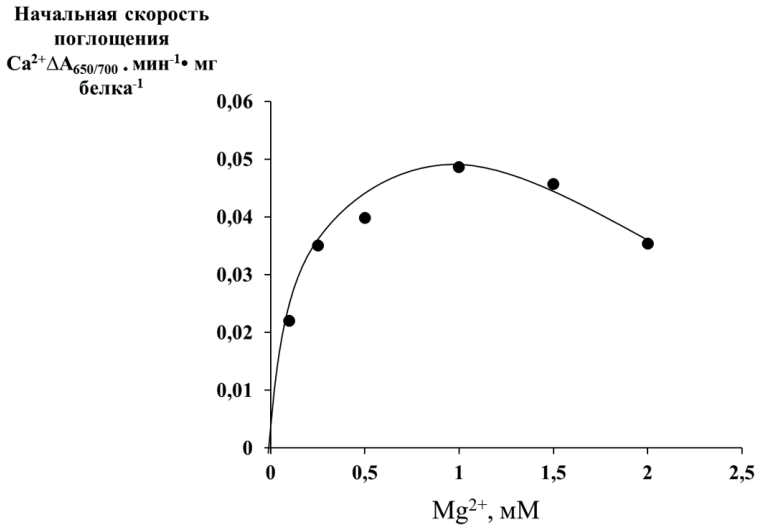


Рис.1 Зависимость начальной скорости поглощения Ca^{2+} симбиосомами от концентрации Mg^{2+} в инкубационной среде.

Известно, что активный транспорт кальция, катализируемый Ca^{2+}-АТФазой, обладает способностью использовать ИТФ, ГТФ и другие нуклеозидтрифосфаты, как альтернативные субстрату АТФ. В экспериментах с использованием непроникающего через мембраны металлохромного Ca^{2+}-индикатора арсеназо III была исследована субстратная специфичность транспортной активности Ca^{2+}-АТФазы СМ. Для определения субстратной специфичности фермента были взяты нуклеозидтрифосфаты с фиксированной концентрацией 1 мМ, включающие АТФ, ИТФ, ГТФ, ЦТФ, УТФ. Показано, что ее предпочтительным субстратом является АТФ. Так же установлено, что другие нуклеозидтрифосфаты (ИТФ, ГТФ, ЦТФ) также способны выступать в роли субстратов этого фермента и участвовать в энергообеспечении процесса транслокации ионов кальция через СМ, но с заметно меньшей эффективностью, которая убывает в следующем ряду: АТФ>ИТФ>ГТФ≥УТФ>ЦТФ [4].

Одним из основных факторов, контролирующих активность Ca^{2+}-АТФазы IIB типа растительных клеток, является кальций - связывающий белок кальмодулин, который способен стимулировать активность этого фермента.

Результаты исследований показали что, активность Ca^{2+}-АТФазы СМ зависела от концентрации кальмодулина в инкубационной среде и показала, что максимальная скорость Ca^{2+}- АТФазы СМ достигала в присутствии 80-100 мкг/мл кальмодулина [4].

Таким образом, нами показано, что полученные препараты симбиосом позволяют изучить активность Ca^{2+}-АТФазы, от которой зависит интенсивность азотфиксации корневых клубеньков бобовых культур.

*Экспериментальная работа выполнена в Институте биохимии и физиологии растений, РАН (г. Москва) во время обучения в аспирантуре.

Список литературы
1. Clarke V.C., Loughlin P.C., Day D.A., Smith P.M.C. The symbiosome membrane proteome of “Medicago truncatula” reveals proteins involved in transport and signaling during nodule symbiosis // Plant Physiology. 2021. V.185, №1. P. 147–166. DOI: 10.1093/plphys/kiaa045
2. Zartdinova R., Nikitin A. Calcium in the Life Cycle of Legume Root Nodules // Indian Journal of Microbiology. 2023. V.63. №4. P. 410–420.
3. Andreev I.M., Andreeva I.N., Kozharinova G.M., Dubrovo P.N., Krylova V.V., Izmailov S.F. Accumulation of Calcium and Its Involvement in the Control of Nitrogenase Activity in the Symbiosomes of Broad Bean Root Nodules // Russian Journal of Plant Physiology. 2001. V.47. №1. P. 10-16.
4. Krylova V.V., Andreev I.M., Zartdinova R., Izmailov S.F. Biochemical characterization of Ca2+-ATPase in the peribacteroid membrane of broad bean root nodules // Protoplasma. 2013. V.250. P. 531-538.

УДК 637.5.072

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ БЫСТРОГО ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ОБНАРУЖЕНИЯ СТИМУЛЯТОРОВ РОСТА В МЯСНЫХ ПРОДУКТАХ

Зверева Е.А., Панферов В.Г., Гендриксон О.Д., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, 119071, Москва, Ленинский проспект 33, РФ
zverevaea@yandex.ru

Аннотация: В сообщении представлены результаты разработки иммунохроматографических тест-систем для детекции бета-агонистов – активно используемых в сельском хозяйстве стимуляторов роста животных и птицы. Установлены аналитические характеристики тест-систем, показана их эффективность при контроле мясных продуктов.

Ключевые слова: иммунохроматографические тест-системы, бета-агонисты, пищевая безопасность.

Для повышения продуктивности в современном животноводстве активно используются бета-агонисты, которые повышают конверсию корма, способствуют снижению содержанию жира и увеличению мышечной массы выращиваемых организмов. Однако их поступление с продуктами питания в организм человека может негативно влиять на центральную нервную систему и вызывать развитие сердечно-сосудистых заболеваний, в связи с чем установлены предельные уровни их допустимого содержания в потребительской продукции. Данная ситуация определяет необходимость разработки быстрых высокочувствительных тестов для детекции бета-агонистов в продуктах питания.

Для обнаружения таких приоритетных бета-агонистов, как кленбутерол, рактопамин и мабутерол, разработаны иммунохроматографические тест-системы (ИХТС) с использованием различных маркеров. В тест-системах на основе наночастиц золота (НЧЗ) показаны преимущества замены конъюгатов НЧЗ со специфическими антителами на комбинацию немодифицированных специфических антител и конъюгатов НЧЗ с антивидовыми антителами. Для достижения минимальных пределов обнаружения проведен выбор концентраций иммунореагентов, состава буферных растворов, продолжительности стадий тестирования. В качестве альтернативы НЧЗ рассмотрены наночастицы-маркеры с каталитической активностью – нанозимы. Разработана ИХТС для детекции мабутерола с использованием в качестве маркера биметаллических наночастиц ядро@оболочка Au@CeO_2, проявляющих пероксидазоподобную активность. В установленных оптимальных условиях трансформация хромогенного субстрата 3,3′,5,5′-тетраметилбензидина обеспечивает снижение предела обнаружения мабутерола по сравнению с ИХТС на основе НЧЗ в 6 раз – до 0,26 нг/мл при продолжительности тестирования 18 минут. Для обеспечения эффективного применения ИХТС проведено сравнение различных протоколов подготовки образцов мяса. Выбранная схема пробоподготовки включала гомогенизацию образца, экстракцию ацетонитрилом, выпаривание и последующее растворение в рабочем буфере для иммунохроматографии. При тестировании образцов мяса, содержащих бета-агонисты, показана высокая степень выявления аналита – 80-118%. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности разработанных тест-систем как средств внелабораторного скринингового контроля продукции животноводства.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 25-26-00214).

УДК 577.15:615.015

ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ФИТОАДЪЮВАНТЫ В СОСТАВЕ ТАРГЕТНЫХ НАНОСИСТЕМ: ПРЕОДОЛЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ И ИММУНОМОДУЛЯЦИЯ

Злотников И.Д.[1,2], **Кудряшова Е.В.**[1,2]

[1] *Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ*
[2] *Центральный университет, г. Москва, РФ*
izlotnikov2003@yandex.ru

Аннотация. В работе продемонстрирован потенциал фитокомпонентов (эвгенол, апиол, байкалеин, куркумин, кумарин и др.) как эффективных адъювантов широкого спектра действия. Доказано их синергетическое действие с антибиотиками и цитостатиками, способность блокировать эффлюкс-насосы, ингибировать печеночные цитохромы для пролонгации фармакокинетики, а также направленно ремоделировать фенотип макрофагов, способствуя разрешению воспаления.

Ключевые слова: адъюванты, терпеноиды, флавоноиды, эффлюкс, макрофаги, цитохром, биокатализ.

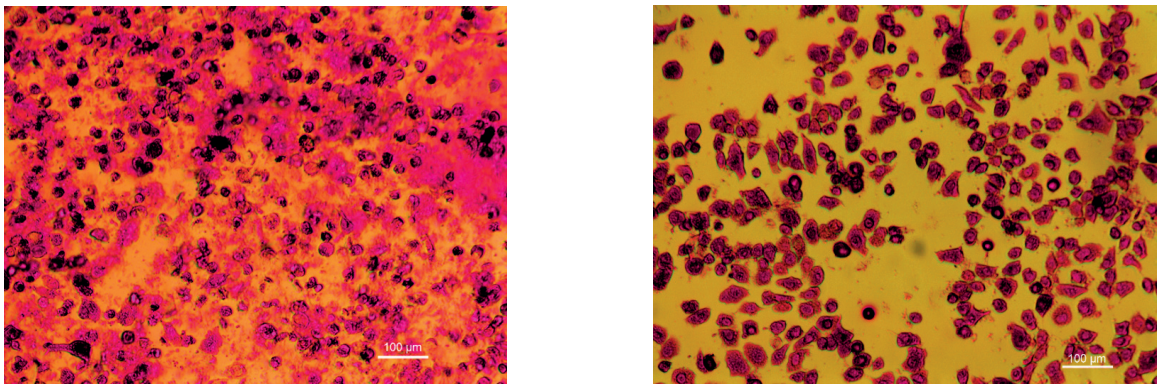
Изменение механизмов множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) у патогенных микроорганизмов и опухолевых клеток критически снижает эффективность традиционных антибиотиков [1] и цитостатиков [2]. Преодоление этого барьера требует оригинальных решений, среди которых наиболее перспективным является применение природных адъювантов. Подобные молекулы, хотя не обладая высокой собственной токсичностью, способны влиять на клеточный метаболизм и многократно усиливать эффективность терапии антибиотиками или цитостатиками.

В фокусе нашего исследования находятся индивидуальные компоненты эфирных масел (аллилбензолы, терпеноиды), растительные флавоноиды (эвгенол, апиол, диллапиол, байкалеин, дигидрокверцетин), куркуминоиды, производные кумарина, хромены и их аналоги. Установлено, что первичной мишенью этих соединений выступают системы клеточной защиты. Данные вещества способны не только ингибировать работу эффлюкс-насосов, но и существенно повышать проницаемость клеточных мембран. Блокируя выброс ксенобиотиков — специфически или за счёт превалирующей концентрации, но оставаясь при этом в пределах терапевтического окна — адъюванты (эвгенол, апиол и др.) многократно увеличивают внутриклеточную концентрацию действующего вещества. Так, добавление эвгенола к фторхинолонам *in vitro* приводило к увеличению зон ингибирования роста *E. coli* на чашках Петри, повышая антибактериальную активность в 2–5 раз по сравнению с чистым препаратом.

Эффект преодоления клеточных барьеров и снижения эффлюкса многократно усиливается при использовании наноразмерных систем направленной доставки. Нами разработаны стимул-чувствительные полимерные мицеллы на основе конъюгатов хитозана и гепарина с олеиновой и липоевой кислотами (хитозан-олеат, хитозан-липоат). Мицеллы способны высвобождать цитотоксическое карго (доксорубицин) в ответ на специфические внешние стимулы опухолевого микроокружения. Хитозан обеспечивает pH-чувствительность системы. Остатки липоевой кислоты образуют лабильные дисульфидные (S-S) сшивки между полимерными цепями либо ковалентно связывают молекулы доксорубицина. Кинетика высвобождения препарата зависит от микроокружения: в физиологических условиях (pH 7.4, отсутствие глутатиона) процесс идет медленно (около 20% за 6 часов). Однако в слабокислой среде в присутствии 10 мМ глутатиона скорость высвобождения возрастает до 6 раз, что приводит к увеличению концентрации препарата до 5 раз уже через 7 часов.

Оценка проницаемости мицеллярных форм доксорубицина (с ковалентными S-S сшивками и без них) на линиях опухолевых клеток A549, Raji, K562 и A875 методами ИК-спектроскопии,

флуоресцентной спектроскопии и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии продемонстрировала улучшение внутриклеточного накопления, снижение уровня эффлюкса и значительный рост цитотоксичности по сравнению с контрольным (свободным) доксорубицином. Примечательно, что для здоровых клеток HEK293T та же комбинация доксорубицина с эвгенолом оказывала протекторное действие, сводя к минимуму проникновение цитостатика и его цитотоксичность. Визуально накопление доксорубицина в раковых клетках представлено на рисунке 1. Для простого цитостатика наблюдается размывание (рис. 1а), а для доксорубицина в составе полимерных таргетных систем доставки — селективное окрашивание раковых клеток, напоминающее «золотую осень» (рис. 1б).



(а) **(б)**

Рисунок 1. «Золотая осень». Микрофотографии раковых клеток A549, инкубированных с (а) доксорубицином, (б) доксорубицином в составе полимерных таргетных систем доставки. Концентрация доксорубицина 0,2 мг/мл.

Помимо локального действия, растительные адъюванты активно участвуют в системном метаболизме *in vivo*. Ключевой барьер на пути любого препарата — его быстрая ферментативная деградация в печени с участием системы цитохромов, например, P450 (главным образом, изоферментом CYP3A4). Наши данные подтвердили, что апиол, диллапиол и исследованные флавоноиды – ингибиторы этих ферментов. Направленное снижение активности цитохромов обеспечивает контролируемую пролонгацию лекарственного препарата. Фармакокинетические исследования на мышах подтвердили, что введение адъювантов увеличивает период полувыведения и время циркуляции комбинированных антибиотиков или цитостатиков до 5 раза, что открывает путь к существенному снижению доз токсичных препаратов без потери их действия.

Не менее значимым является иммуномодулирующий потенциал фитокомпонентов [3]. Для их таргетной доставки к инфекции или раковым новообразованиям были синтезированы полимерные молекулярные контейнеры с включёнными углеводными лигандами к маннозным рецепторам CD206 и CD68. Подобная архитектура обеспечивает селективный захват комбинированного препарата (антибиотик + адъювант) в зависимости от цели и структуры альвеолярными или опухоль-ассоциированными макрофагами, повышая биораспределение активных веществ в таргетной мишени до 1-2 порядков. Оказавшись внутри клетки, индивидуальные компоненты эфирных масел (аллилбензолы, терпеноиды), растительные флавоноиды (эвгенол, апиол, диллапиол, байкалеин, дигидрокверцетин), куркуминоиды напрямую действуют на инфекцию или модулируют каскады, ответственные за поляризацию макрофагов. Ингибирование синтеза провоспалительных медиаторов запускает направленное ремоделирование макрофагов — переключение из провоспалительного фенотипа M1 в репаративный M2a. Такой сдвиг критически важен для разрешения воспаления и защиты здоровых тканей от аутоиммунной атаки, что делает этот подход перспективным в терапии тяжелых заболеваний дыхательных путей, типа пневмоний, туберкулеза, ХОБЛ, а также высокоспецифичной терапии рака.

Таким образом, исследованные молекулы биофлавоноидов и фитокомпонентов природного происхождения действуют как универсальные полифункциональные агенты. Воздействуя на ферментатив-

ную активность на системном (цитохромы печени) и клеточном (эффлюкс-насосы, поляризация макрофагов) уровнях, они позволяют не просто преодолевать механизмы резистентности клеток-мишеней, но и осуществлять таргетную терапевтическую настройку ответа организма на терапию.

Данная работа была выполнена с использованием следующего оборудования: ИК-Фурье микроскопа MICRAN-3 (Simex, Новосибирск, Россия), ИК-Фурье спектрометра Bruker Tensor 27 (Bruker, Этлинген, Германия), спектрометра кругового дихроизма Jasco J-815 (JASCO, Токио, Япония), атомно-силового микроскопа NTEGRA II (NT-MDT Spectrum Instruments, Москва, Россия) и конфокального лазерного сканирующего микроскопа FluoView FV1000 (Olympus, Токио, Япония) в рамках Программы развития МГУ.

Список литературы

1. Zlotnikov, I.D.; Belogurova, N.G.; Krylov, S.S.; Semenova, M.N.; Semenov, V.V.; Kudryashova, E.V. Plant Alkylbenzenes and Terpenoids in the Form of Cyclodextrin Inclusion Complexes as Antibacterial Agents and Levofloxacin Synergists. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 861. https://doi.org/10.3390/ph15070861.
2. Zlotnikov, I.D.; Dobryakova, N.V.; Ezhov, A.A.; Kudryashova, E.V. Achievement of the Selectivity of Cytotoxic Agents against Cancer Cells by Creation of Combined Formulation with Terpenoid Adjuvants as Prospects to Overcome Multidrug Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 8023. https://doi.org/10.3390/ijms24098023
3. Zlotnikov, I.D.; Vinogradov, A.A.; Kudryashova, E.V. AI-Driven Secondary Immunomodulatory Effects of Conventional Drugs on Patient-Derived Macrophages. *Int. J. Mol. Sci.* **2026**, *27*, 3894. https://doi.org/10.3390/ijms27093894

УДК 577.12

ТИОРЕДОКСИН-ЗАВИСИМАЯ СИСТЕМА И ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК: РЕГУЛЯЦИЯ ПОЛИФЕНОЛАМИ

Асиль Али Хасан[1], Калинина Е.В.[1], Нужина Ю.В. [2], Володина Ю.Л. [4], Штиль А.А. [4], Татарский В.В. [2,3]

[1] Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, г. Москва, РФ
[2] Институт биологии гена РАН, г. Москва, РФ
[3] Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, г. Москва, РФ
[4] НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, г. Москва, РФ
kalinina-ev@rudn.ru

Аннотация. В докладе представлена информация об исследовании влияния растительных полифенолов куркумина и кварцетина на ферменты системы Trx/TrxR/Prx и устойчивость клеток аденокарциномы SKOV-3 к цисплатину. Показано, что действие полифенолов приводит к эффекту «обращения» лекарственной устойчивости резистентных клеток, что сопровождается подавлением экспрессии генов ферментов системы Trx/TrxR/Prx, контролирующих клеточный редокс-статус.

Ключевые слова: тиоредоксин, тиоредоксинредуктаза, куркумин, кверцетин, цисплатин

Редокс-зависимые процессы в значительной степени определяют функциональную активность многих ферментов и, как следствие, редокс-зависимую регуляцию клеточных функций, таких как пролиферация, дифференцировка, апоптоз. Особое внимание привлекает изучение тиол-дисульфидной регуляции, осуществляемой редокс-зависимыми ферментами, среди которых важную роль играет тиоредоксин-зависимая система, представленная изоформами тиоловой оксидоредуктазы тиоредоксина (Trx), НАДФН-зависимой тиоредоксинредуктазы (TrxR) и пероксиредоксина (Prx), сопряженная функциональная активность которых регулирует внутриклеточный уровень H_2O_2 и вносит значительный вклад в систему антиоксидантной защиты [1,2]. Изменение активности системы Trx/TrxR/Prx связано с развитием различных патологий, включая злокачественные новообразования. Среди потенциальных противоопухолевых препаратов активно разрабатываются куркумин (CUR) и кверцетин (QU) – растительные полифенолы, обладающие антиоксидантным и антипролиферативным действием и химиотерапевтический потенциал которых установлен для различных типов злокачественных новообразований [3].

В работе оценивалось влияние CUR и QU на ферменты системы Trx/TrxR/Prx и устойчивость клеток аденокарциномы яичника SKOV-3 к цисплатину (CDDP). Установлено, что формирование лекарственной устойчивости клеток SKOV3 сопровождается повышением экспрессии генов изоферментов системы Trx/TrxR/Prx (*TRX1, TRX2, TXRD1, TXRD2, PRDX1, PRDX2, PRDX3, PRDX6*), ключевых антиоксидантных ферментов (*SOD-1, SOD-2, GPX-1, HO-1, CAT*) и транскрипционного фактора Nrf2.

Действие Cur и QU вызывает резкое снижение экспрессии генов TRX1, TRX2, TRXRD1, TRXRD2, сопряженное с подавлением экспрессии генов изоформ Prx и ключевых антиоксидантных ферментов. Наблюдаемая депрессия антиоксидантной системы в значительной степени объясняться снижением экспрессии Nrf2, контролирующего экспрессию генов большинства антиоксидантных ферментов и экспрессия которого может регулироваться Trx-зависимой системой [4]. В свою очередь, вызываемый CUR и QU сдвиг редокс-статуса, может быть причиной наблюдаемого при их действии снижения экспрессии генов сигнального пути PI3K/Akt/mTOR, контролирующего пролиферацию опухолевых клеток и активность которого зависит от уровня активных форм кислорода (АФК).

Показано, что действие QU или CDDP не оказывает эффективного влияния на генерацию АФК в клетках резистентных клетках SKOV/CDDP. Однако предобработка QU с последующим внесением в среду CDDP эффективно запускает генерацию АФК. В то время как предобработка QU клеток SKOV-3 дикого типа действует как антиоксидант, снижая образование АФК и активируя экспрессию антиоксидантных ферментов.

Окислительный стресс, индуцированный предобработкой CUR и QU, вызывающих подавление тиоредоксин-зависимой системы, активирует в клетках SKOV-3/CDDP митохондриальный апоптотический путь, вызывая расщепление каспаз 9, 7, 3 и PARP и подавление фосфорилирования белков сигнального пути mTOR/STAT3, что приводит к эффекту «обращения» лекарственной устойчивости резистентных клеток.

Список литературы

1. Bramatti I., Branco V., Carvalho C. The interplay between the thioredoxin system and hypoxia-related factors in cancer // Free Radical Biology and Medicine. – 2026. – Vol. 249. –P. 563–576.
2. Seitz R., Tümen D., Kunst C., Heumann P., Schmid S., Kandulski A., Müller M., Gülow K. Exploring the Thioredoxin System as a Therapeutic Target in Cancer: Mechanisms and Implications // Antioxidants (Basel). – 2024. – Vol. 13. – No. 9. – P. 1078.
3. Sahoo S., Kashyap A., Muduly D.K., Sahoo S.K. Phytonanomedicine: An Assessment of Therapeutic Relevance in Cancer Through Targeting Cancer-Associated Fibroblast in Tumor Microenvironment// Phytotherapy Research. – 2026. – Vol. 40. – No. 3. – P. 1141–1172.
4. Jaganjac M., Milkovic L., Sunjic S.B., Zarkovic N. The NRF2, Thioredoxin, and Glutathione System in Tumorigenesis and Anticancer Therapies. // Antioxidants (Basel). – 2020. – Vol. 9. – No. 11. – P. 1151.

УДК 577.15

МИЕЛОПЕРОКСИДАЗА МАКРОФАГОВ: КАТАЛИТИЧЕСКАЯ КОНВЕРСИЯ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА В ГИПОХЛОРИТ ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Касаткина С.И.[1], Демина Г.Р.[1], Костюк А.И.[2], Линге И.А.[3], Соловьев И.Д.[1], Билан Д.С.[2], Савицкий А.П.[1], Шлеева М.О.[1]

[1] ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва, РФ
[2] Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, г. Москва, РФ
[3] ЦНИИ туберкулеза, г. Москва, РФ
kasatkinasvetlana7722@gmail.com

Аннотация. Исследование посвящено оценке каталитической функции миелопероксидазы макрофагов в ответ на фотодинамическую терапию (ФДТ). С использованием генетически кодируемого сенсора на гипохлорит показано, что ФДТ индуцирует каталитическую активность фермента в макрофагах, инфицированных *E. coli*, усиливая продукцию гипохлорита.

Ключевые слова: миелопероксидаза, биокатализатор, гипохлорит, фотодинамическая инактивация.

В настоящее время важной проблемой в терапии бактериальных инфекций является высокая устойчивость бактерий к антибиотикам. Антибактериальная фотодинамическая терапия считается многообещающей альтернативой традиционному противомикробному лечению из-за её широкого спектра действия и мультитаргетного нацеливания. Данный подход не приводит к развитию у бактерий резистентности, как это происходит с антибиотиками [1]. Уничтожение бактерий происходит за счет генерации активных форм кислорода (АФК) в результате фотодинамической реакции в присутствии фотосенсибилизаторов [2].

В нашей лаборатории было показано, что фотодинамическая терапия эффективнее инактивирует микобактерии внутри макрофагов, чем в свободной культуре [3], что указывает на участие хозяин-зависимых каталитических механизмов. Предположительно, активные формы кислорода, генерируемые при ФДТ, могут служить субстратами для миелопероксидазы, которая катализирует образование гипохлорита (OCl^-), мощного бактерицидного агента, из перекиси водорода и хлорид-аниона [4]. Действие миелопероксидазы хорошо описано в нейтрофилах, однако наличие этого фермента в макрофагах и его вклад в их антибактериальные механизмы изучены недостаточно. Целью данного исследования является оценка изменения каталитической активности миелопероксидазы макрофагов в ответ на фотодинамическую терапию.

Для регистрации образования гипохлорита *in vivo* применяли генетически кодируемый сенсор Hypocrates, разработанный для регистрации (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных в ИБХ им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН [5]. Спектр возбуждения флуоресценции данного сенсора в бактериальных клетках изменяется рациометрически в присутствии гипохлорита натрия.

В качестве модели фагоцитоза использовали макрофаги линии RAW264.7, инфицированные бактериями *E. coli*, экспрессирующие биосенсор Hypocrates. Для протекания фотодинамической реакции в качестве фотосенсибилизаторов использовали внутриклеточные порфирины, концентрацию которых порфиринов в макрофагах увеличивали инкубированием с 5-аминолевулиновой кислотой (предшественником синтеза порфиринов).

После светового воздействия (565 нм) на макрофаги, содержащие бактерии, было зарегистрировано достоверное рациометрическое изменение максимумов флуоресценции сенсора, что свидетельствует о большем образовании гипохлорита и, следовательно, усилении каталитической активности миелопероксидазы в макрофагах.

Таким образом, ФДТ выступает в роли триггера, который индуцирует каталитическую функцию МПО в нативной среде живой клетки, переключая метаболизм активных форм кислорода на продукцию гипохлорита. Этот механизм может быть положен в основу стратегий, направленных на стимуляцию внутриклеточного киллинга бактерий, персистирующих в фагоцитах.

Работа поддержана грантом РНФ № 25-45-10015.

Список литературы

1. Marasini S., Leanse L.G., Dai T. Can microorganisms develop resistance against light based anti-infective agents? // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2021. – Vol. 175. – P. 113822.
2. Wainwright M., Maisch T., Nonell S., Plaetzer K., Almeida A., Tegos G.P., Hamblin M.R. Photoantimicrobials – are we afraid of the light? // The Lancet. Infectious diseases. – 2017. – Vol. 17. – No. 2. – P. e49–e55.
3. Shleeva M.O., Linge I.A., Gligonov I.A., Vostroknutova G.N., Shashin D.M., Tsedilin A.M., Apt A.S., Kaprelyants A.S., Savitsky A.P. Acquiring of photosensitivity by Mycobacterium tuberculosis in vitro and inside infected macrophages is associated with accumulation of endogenous Zn-porphyrins // Scientific reports. – 2024. – Vol. 14. – No. 1. – P. 846.
4. Siraki A. G. The many roles of myeloperoxidase: From inflammation and immunity to biomarkers, drug metabolism and drug discovery // Redox Biology. – 2021. – Vol. 46. – P. 102109.
5. Kostyuk A.I., Tossounian M.A., Panova A.S., Thauvin M., Raevskii R.I., Ezeriņa D., Wahni K., Van Molle I., Sergeeva A.D., Vertommen D., Gorokhovatsky A.Y., Baranov M.S., Vriz S., Messens J., Bilan D.S., Belousov V.V. Hypocrates is a genetically encoded fluorescent biosensor for (pseudo)hypohalous acids and their derivatives // Nature communications. – 2022. – Vol. 13. – No. 1. – P. 171.

УДК: 577.151.63+ 661.727.2+ 543.635.24+ 612.393.1+ 612.396.22 + 613.81

ОТ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМА МЕТАБОЛИЗМА ЭНДОГЕННЫХ ЭТАНОЛА И АЦЕТАЛЬДЕГИДА В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА ДО СОЗДАНИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОДУКТОВ СНИЖЕНИЯ СОМАТО- И НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ ЭКЗОГЕННОГО АЛКОГОЛЯ

Кершенгольц Б.М.

Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, г.Якутск, Россия
kerschen@mail.ru

Аннотация. Изучен дегидрогеназный механизм метаболизм эндогенного этанола в организме животных и человека. Установлено, что концентрация промежуточного продукта его окисления - ацетальдегида является функцией концентраций и каталитических свойств активных изоформ алкогольдегидрогеназы и альдегиддегидрогеназы. При введении в организм экзогенного этанола токсические и наркотические эффекты обусловлены повышением концентрации ацетальдегида. Амино-β-олигосахариды, получаемые при биотехнологическом переделе слоевищ лишайников, связывая пиковые концентрации ацетальдегида непосредственно в месте его образования – в гепатоцитах, снижают интенсивность этих негативных эффектов. В промышленных масштабах осуществлено производство водочных изделий с пониженной токсичностью и наркотичностью за счет добавок микроконцентраций лишайниковых амино-β-олигосахаридов. Отслежены популяционные положительные социальные и медицинские эффекты их массового потребления.

Ключевые слова: этанол и ацетальдегид, дегидрогеназы их метаболизирующие, токсический и наркотический эффекты, лишайниковые амино-β-олигосахариды.

Ранее был изучен ферментативный механизм метаболизма эндогенных этанола (ЭЭ) и ацетальдегида (ЭА) в организмах животных и человека. Установлено, что концентрация ЭА является функцией соотношения концентраций и каталитических свойств активных изоформ алкогольдегидрогеназы (АДГ) и альдегиддегидрогеназы (АльДГ) в печени и в структурах мозга [1, 2].

$$\text{Этанол} \overset{АДГ_{I}}{\underset{АДГ_{II}}{\leftrightarrow}} \text{ацетальдегид} \xrightarrow{АльДГ} \text{ацетат} \xrightarrow{\text{ацетил-КоА-синтаза}} \text{ацетил-КоА} \rightarrow \text{Цикл трикарбоновых кислот}$$

Показано, что одними из основных функций ЭА являются синтез морфиноподобных соединений в структурах мозга - нейрохимических медиаторов, а также регуляция разобщения в системе окислительного фосфорилирования в митохондриях. Установлены интервалы концентраций ЭЭ (≈ 0,1 мМ) и ЭА (≈ 1 мкМ), при которых реализуются их нативные метаболические функции в организмах животных и человека [1, 2].

Выявлены молекулярные механизмы, лежащие в основе формирования токсических поражений алкогольной этиологии и наркотической алкогольной психической и физической зависимости при экзогенной алкоголизации, связанные прежде всего с повышением концентрации ацетальдегида в крови, гепатоцитах, клетках мозга, других соматических органов [1, 2], включая модификацию концевых сиаловых кислот олигогликозидов гликокаликса клеточных мембран [3]. Сам этанол в основном ответственен за формирование эйфорического эффекта при употреблении алкоголя.

Результаты проведенных фундаментальных исследований позволили предположить, что создание методов связывания избыточных концентраций ацетальдегида (по сравнению с концентрацией ЭА) в месте его образования в организме (в гепатоцитах) при употреблении экзогенного этанола позволит существенно снизить уровень токсических нарушений алкогольной этиологии и скорость формирования алкогольной зависимости даже в условиях умеренной алкоголизации.

В этом отношении оптимальными природными веществами оказались лишайниковые амино-β-олигосахариды (Л-амино-β-ОС), содержащиеся во фракции лишайниковых β-олигосахаридов (Л-β-ОС), являющиеся по составу и структуре прочными (не гидролизуемыми в организме человека), небольшими по размерам, бифильными молекулами, близкими по строению к олигосахаридам гликокаликсового слоя клеточных мембран и к гликозаминогликанам, образующим на коллагеновой матрице соединительную ткань и мембраны интерстиция. Благодаря этим свойствам, Л-β-ОС, во-первых, хорошо проникают через различные мембранные комплексы, включая структуры стенок кишечника и клеточные структуры, что обеспечивает их высокую биоусвояемость. Во-вторых, они способны образовывать супрамолекулярные комплексы с молекулами эндо- и экзотоксинов в плазме крови и в клетках, обеспечивая их детоксикацию и последующий вывод из организма. С ацетальдегидом Л-амино-β-ОС дополнительно образуют основания Шиффа (рис.) Такая детоксикационная способность Л-β-ОС в отношении ацетальдегида доказана для гепатоцитов, плазмы крови, интерстиция и лимфы [4].

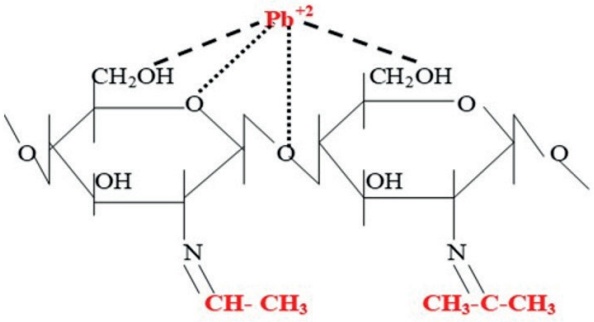


Рис. Схема структуры фрагмента β-олигосахарида со связанными катионами свинца и карбонильных органических – соединений – алкогольных токсинов (в виде оснований Шиффа).

В организме животных лишайниковые Л-β-ОС, в том числе Л-амино-β-ОС, образуются в достаточной высокой концентрации только в рубце северного оленя при гидролизе β-гликозидазами до 80% очень прочных β-гликозидных связей в трёхмерных молекулах лишайниковых. β-полисахаридов (Л-β-ПС), являющихся основным веществом слоевищ лишайников. В биотехнологическом природоподобном переделе Л-β-ОС образуются при частичной деполимеризации Л-β-ПС в процессе обработки слоевищ лишайников диоксидом углерода в состоянии сверхкритической жидкости с последующей экстракцией водно-спиртовой смесью, либо при механохимической активации, в ходе которой происходит расщепление части β-гликозидных связей и образование Л-β-ОС из Л-β-ПС непосредственно в твердой фазе, без участия растворителей [5].

Образование Л-β-ОС из Л-β-ПС доказано методами: сканирующей электронной микроскопии, атомно-силовой микроскопии, инфракрасной спектроскопии, ЯМР-спектроскопии и др., а также методом прямого химического титрования «восстанавливающих концов» (свободных альдегидных групп гликозидов) [6]. Для детоксикации ацетальдегида в биожидкостях и клетках при экзогенной алкоголизации организма был выбран первый способ получения Л-β-ОС с помощью БАД «Ягель» [7].

Результаты экспериментальных виварных исследований, проведенных по стандартным методикам, показали, что введение БАД «Ягель» в 40-процентную водно-спиртовую смесь в соотношении 1:500 в целях детоксикации и профилактики алкогольных патологий позволяет снизить в 2÷3 раза токсическое действие алкоголя при полном сохранении эйфорического эффекта; более чем в 20 раз уменьшить постинтоксикационный эффект, в 5,6 раз уменьшить скорость формирования наркоманической алкогольной зависимости. Соответствующие эффекты по снижению токсического и постинтоксикационного

эффектов были подтверждены при испытаниях БАД «Ягель» на волонтерах (n=25) по стандартным методикам, на основании их письменного согласия [8].

Механизм заключается в том, что Л-амино-β-ОС вместе с этанолом всасываются через стенки кишечника в кровь, через воротную вену поступают в гепатоциты, непосредственно в них связывают пиковые концентрации образующегося ацетальдегида с образованием оснований Шиффа и в таком виде выводят из организма основной «алкогольный токсин» – ацетальдегид. Алкогольная детоксикация может проводиться как путём введения в водки миллидобавок БАД «Ягель», в соотношении 1:500, так и путём приёма 5 мл препарата/200 мл воды до, либо в ходе приёма алкоголя (в профилактических целях) или после алкоголизации.

Результаты фундаментальных исследований, завершившиеся получением многочисленных патентов РФ, позволили в 2020-2025 годах организовать на предприятиях ФАПК «Якутия» промышленное производство водок-особых с пониженной токсичностью и наркотичностью (при охранении эйфоричности) и алкогольсодержащих лечебно-профилактических бальзамов. Только за 2023-2025 годы таких сортов алкогольной продукции произведено и реализовано населению на общую сумму более 545 млн. руб.

Результаты проведенных социологических исследований показали, что в условиях свободного выбора (при наличии нескольких сортов водок) и отсутствия рекламной информации потребители уже через 2,0-2,5 месяца после начала продаж по субъективным оценкам (отсутствие интоксикационного эффекта и постинтоксикационного синдрома, качество эйфории) выбирали водки с добавками БАД «Ягель», несмотря на повышение их цены на 6-8%. Отслежены популяционные положительные социальные и медицинские эффекты потребления водочных изделий с пониженной токсичностью и наркотичностью.

Список литературы

1. Кершенгольц Б.М. Этанол и ацетальдегид в организмах растений и животных: автореферат дис. ... доктора биологических наук: 03.00.04 // Ин-т биохимии. — Москва, 1991. — 49 с.
2. Чернобровкина Т.В., Кершенгольц Б.М. Фундаментальные и медико-социальные аспекты аддиктологии // Якутск - Москва: Компания «Дани АлмаС», 2011. - Т.1. - 473 с.; Т.2. -528 с.
3. Чернобровкина Т.В., Кершенгольц Б.М., Копоров С.Г. Сиалогликобиология в механизмах адаптации и полиморбидности при алкоголизме // Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2023. – 200 с.
4. Кершенгольц Б.М., Афанасьева О.В., Баранов Н.А. Роль лишайниковых β-олигосахаридов в естественной интракорпоральной лимфодетоксикации // Материалы XV научно-практической конференции с международным участием имени Ю.И.Бородина «Лимфология: от фундаментальных исследований к медицинским технологиям». Новосибирск, 24-25 марта 2023. – С.151-154.
5. Кершенгольц Б.М. Лишайники: биотехнологии переработки, биопрепараты на их основе // LAMBERT Academic Publishing. – RU; Deutschland, 2017. -100 с.
6. Аньшакова В. В. Биотехнологическая механохимическая переработка лишайников рода Cladonia // Рос. акад. естествознания. – М.: Акад. естествознания, 2013. - 115 с.
7. Свидетельство ЕВРАЗЭС о гос. регистрации Роспотребнадзором РФ БАД «Ягель» №RU.77.99.11.003.E.051236.11.11 от 17.11.2011.
8. Кершенгольц Б.М., Журавская А.Н., Ремигайло П.А. и др. Способ получения водки, обладающей пониженным токсическим и наркотическим эффектом // Патент РФ №2318407 от 10.03.2008. – приоритет от 10.01.2006.

БИОНАНОМАТЕРИАЛЫ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ В КОНСТРУИРОВАНИИ ЛЕКАРСТВ НА ОСНОВЕ ФЕРМЕНТОВ, ИХ ЭФФЕКТОРОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Клячко Н.Л., Лопухов А.В.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, кафедра химической энзимологии, 119991, Москва, Ленинские горы, 1-11Б, nlklyachko@gmail.com

Особенности функционирования и регуляции ферментов, других биополимеров, таких как нуклеиновые кислоты, в последние годы становятся все более понятными. Однако, несмотря на успехи, проблемы с использованием биополимеров как лекарств остаются. В докладе представлен ряд подходов по созданию бионаноматериалов для медицины, разрабатываемых в настоящее время, для конструирования лекарств на основе ферментов, их эффекторов и нуклеиновых кислот.

В ранних работах была впервые показана возможность включения ферментов и нуклеиновых кислот в мембраноподобные агрегаты из липидов и/или ПАВ, впервые продемонстрированы особенности и установлены закономерности функционирования биомолекул, определяемые наличием матриц. Включение биополимеров в наноразмерные агрегаты оказалось удобным универсальным подходом, как для белков (ферментов), так и для нуклеиновых кислот. В случае ферментов, например, они сохраняют каталитическую активность, наблюдается усиление проникновения в клетку, повышенная стабильность биомолекул в клетке и организме, увеличение времени циркуляции в крови, а также снижение иммунного ответа. Схема образования «наноэнзима» - ассоциата из молекул фермента и полиэлектролитов представлена на рис.1.

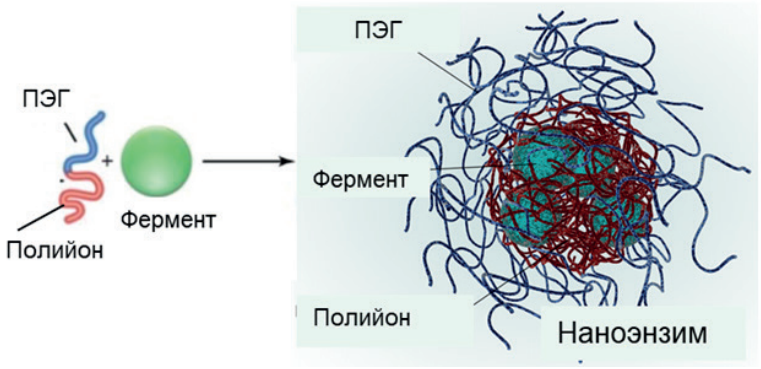


Рис. 1. Схематическое представление образования «наноэнзима» – ассоциата из молекул фермента и полиэлектролита

В докладе обсуждается ряд примеров, охватывающих результаты исследований по конструированию фермент-содержащих наноконтейнерных систем для медицинских применений (для доставки таких систем в центральную нервную систему, мозг, глаз), а также особенностей создания систем для доставки эффекторов ферментов и нуклеиновых кислот. Так, направленная доставка позволяет локализовать лекарственное средство в тканях и органах, нуждающихся в терапии, и при этом снизить побочные эффекты в других частях организма. На рис. 2 представлены варианты лигандов-векторов и рецепторов-мишеней для создания различных систем направленной доставки биополимеров.

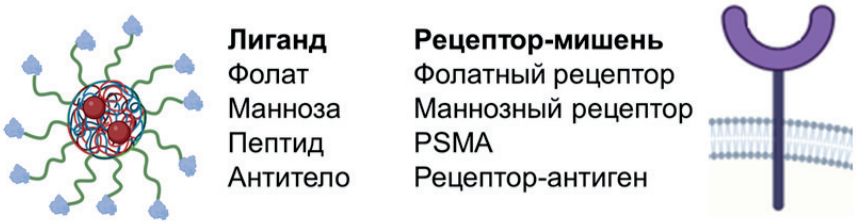


Рис. 2. Схематическое представление вариантов лигандов-векторов и рецепторов-мишеней для создания универсальной платформы для направленной доставки биополимеров

Один из примеров рассматривает платформу для направленной доставки молекул ДНК к дофаминовому и маннозному рецепторам. В этом случае использование в качестве нацеливающей молекулы дофамина позволило в два раза увеличить результативность трансфекции клеток нейробластомы SH-SY5Y. Обнаружено, что декорирование полиплексов маннозными остатками повышает эффективность интернализации ДНК-содержащих полиплексов более, чем в 500 раз иммортализованными макрофагами линии IC-21. Продемонстрирована успешная нацеленная доставка интерполиэлектролитных комплексов, содержащих фермент супероксиддисмутазу, к рецептору E-селектину, как *in vitro* на модельных клеточных культурах (линии HUVEC и HaCaT), так и *in vivo* в сосуды головного мозга мыши.

В целом, представленные в докладе результаты показывают новые возможности в создании систем доставки ферментов (терапевтических белков), их эффекторов и нуклеиновых кислот для медицинской практики. Полученные результаты могут быть использованы в дизайне эффективных и селективных систем для терапии социально-значимых заболеваний. Работа вносит вклад в решение фундаментальной проблемы направленной доставки биомолекул, подтверждая высокий потенциал бионаноматериалов на основе блок-сополимеров. Проведенные исследования являются важным шагом на пути от лабораторных моделей к будущим клиническим применениям и открывают перспективы для создания нового поколения высокоселективных и безопасных лекарственных препаратов.

Работа частично поддержана грантом РНФ 22-13-00261П, темой с гос. регистрацией 121041500039-8 и Программой развития МГУ (покупка приборов).

УДК 577.154.2+542.952+579.22

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНОЙ АГРЕГАЦИИ АДСОРБИРОВАННЫХ БЕЛКОВ И ФЕРМЕНТОВ. ВЛИЯНИЕ АГРЕГАЦИИ НА БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИММОБИЛИЗОВАННОЙ РЕКОМБИНАНТНОЙ ЛИПАЗЫ

Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Беклемишев А.Б., Саланов А.Н., Ларичев Ю.В.

Институт катализа СО РАН, 63090 Новосибирск, Россия, пр. Акад. Лаврентьева, 5
galina@catalysis.ru

Аннотация. В докладе представлена информация об исследовании процессов супрамолекулярной агрегации белковых молекул (в том числе, рекомбинантной липазы) на твердой поверхности неорганических носителей (металлы, углерод) современными физико-химическими методами. Показано, что агрегация молекул рекомбинантной липазы на углеродной поверхности адсорбентов приводит к повышению (порой на порядок) активности гетерогенных биокатализаторов в реакции низкотемпературного синтеза сложных эфиров в органических растворителях. Полученная информация имеет важное практическое значение для специалистов в области гетерогенного биокатализа, поскольку помогает установить корреляцию между формой и размером адсорбированных белковых молекул (мономеры, агрегаты, фибриллярные структуры) и биокаталитическими свойствами иммобилизованных ферментов.

Ключевые слова: электронная микроскопия, малоугловое рентгеновское рассеяние, рекомбинантная липаза, адсорбция, супрамолекулярная агрегация, биокатализ

С помощью современных физико-химических методов, таких как сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) и малоугловое рентгеновское рассеяние (МУРР), были изучены процессы супрамолекулярной агрегации белковых молекул (альбумин, липаза), происходящие на твердой поверхности неорганических носителей (металлы, углерод) [1, 2]. Например, были исследованы процессы агрегации рекомбинантной липазы из *Thermomyces lanuginosus* (рек-Лип) при физической адсорбции этого фермента на ячеистой углеродной пене [2]. Ячеистая углеродная пена имела ажурную трехмерную макроструктуру, поверхность которой была равномерно покрыта пироуглеродными отложениями округлой формы (рис. 1). Анализ многочисленных СЭМ-изображений показал, что при адсорбции рек-Лип более половины углеродной поверхности занято наночастицами размером 20±10 нм, соответствующими по размеру мономерам или димерам липазы из *T. lanuginosus*.

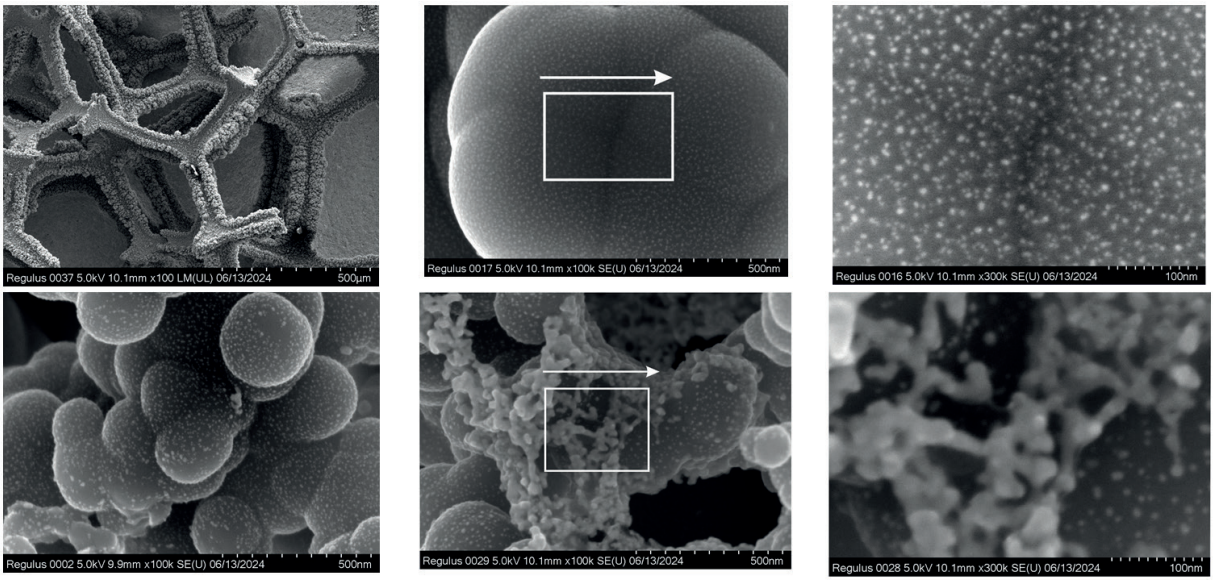


Рис.1. СЭМ изображения рек-Лип, адсорбированной на ячеистой углеродной пене

Данные, полученные методом МУРР, подтвердили наличие процессов агрегации рек-Лип на углеродной поверхности, образованной пироуглеродными отложениями. Анализ кривых распределения по размерам наночастиц (рис. 2) показал, что распределение частиц было тримодальным со средними размерами фракций, равными 5 нм, 10 нм и 22 нм [2].

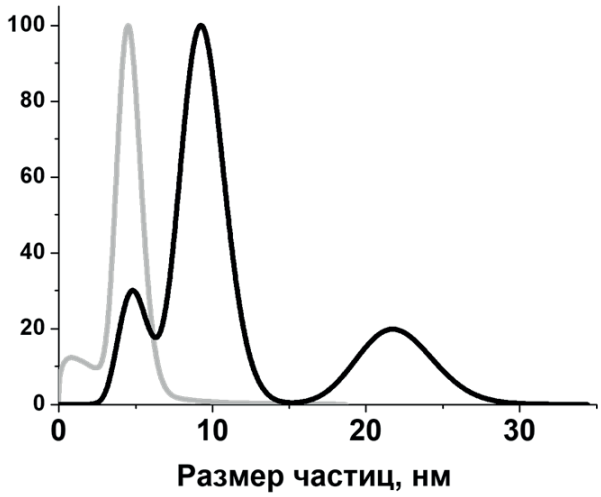


Рис.2. Кривые распределения по размерам наночастиц рек-Лип, полученные методом МУРР: *серая кривая* – липаза в растворе; *черная кривая* – липаза, адсорбированная на пироуглероде

Как видно из кривых на рис. 2, только 13 % молекул адсорбированных рек-Лип присутствовали в форме, соответствующей состоянию липазы в водном растворе. Основная фракция наночастиц адсорбированной липазы (65 %) имела средний размер 10 нм. Доля фракции наночастиц со средним размером 22 нм составила 22 %. Допуская, что молекула липазы имеет сферическую форму и учитывая кубическую зависимость между размером одной наночастицы и ее количеством в одном округлом агломерате, можно предположить, что агрегат размером 10 нм состоял из 8–10 молекул липазы, а агрегат размером 22 нм – из 100 и более молекул. Однако, как видно на СЭМ-изображениях рис. 1, агрегаты из молекул липазы имели сложную разветвленную форму в виде фибрилл, далекую от сферической.

Наличие корреляции между процессами супрамолекулярной агрегации рекомбинантной липазы и активностью биокатализаторов, приготовленных путем адсорбционной иммобилизации этого фермента на углеродных носителях (таблица), позволило сделать вывод о том, что агрегированная форма фермента обладает большей активностью (порой на порядок), чем мономерная [3].

Таблица. Удельная активность липазы в реакции этерификации гептатовой C_7 кислоты бутиловым C_4 спиртом при 20±2°C в гексане в зависимости от доли различных размеров наночастиц адсорбированного фермента

Адсорбент	Удельная активность рекЛ, мкмоль/мин/мг	Доля наночастиц 4–5 нм	Доля наночастиц 11–14 нм	Доля наночастиц 18 –26 нм
Углеродные нанотрубки	1.5	7	70	23
Пироуглеродный	0.3	13	65	22

Несомненно, что полученная информация чрезвычайно важна для специалистов в области гетерогенного биокатализа и аналитической сенсорики, поскольку помогает установить взаимосвязь между формой и размером адсорбированных молекул ферментов (мономеры, агрегаты, фибриллярные структуры) и биокаталитическими свойствами иммобилизованных ферментов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания Института катализа СО РАН (проект FWUR-2024-0034)

Список литературы

1.Salanov A, Serkova A., Zhirnova A., Perminova L., Kovalenko G. Supramolecular aggregation of nanoparticles on aluminum and gold surfaces occurring in bovine serum albumin solutions // Micro. –. 2022. – Vol. 2. – No. 22. – P. 334–341. https://doi.org/10.3390/micro2020022.

2. Kovalenko G.A., Salanov A.N., Serkova A.N., Perminova L.V., Larichev. Yu.V. Microscopic study of adsorption of recombinant *T. lanuginosus* lipase on the surface of the cellular carbon foam // Mendeleev Comm. – 2025. – Vol. 35. – P. 592–594. doi:10.71267/mencom.7757.

3. Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Бородина О.А., Ларичев Ю.В., Саланов А.Н. Исследование методами МУРР и СЭМ процессов супрамолекулярной агрегации ферментов на поверхности углеродных носителей-адсорбентов и их влияние на биокаталитические свойства иммобилизованной липазы // Ж. структурной химии. –2025. – Т. 66. – № 9 – С. 1–15. doi:10.26902/JSC_id152299.

УДК 602.64+ 577.113.7+544.6.018.47-036.5

КАТИОННЫЕ БЛОК-СОПОЛИМЕРЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИАСПАРТАМИДА И ПОЛИГЛУТАМИДА ДЛЯ ДОСТАВКИ ГЕНОВ В КЛЕТКИ

Козырев Н.А.[1], Сабсаби Н.С.[2], Лопухов А.В.[1], Клячко Н.Л.[1]

[1] Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
[2] Биотехнологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
n.kozyrev99@gmail.com

Аннотация: Представлены новые векторы для доставки нуклеиновых кислот на основе полиэтиленгликоля и полиаспартамида (pAsp) или полиглутамида (pGlu), модифицированных диэтилентриамином, спермином и спермидином, определена эффективность их использования для доставки плазмиды pTurboGFP-C в культуры клеток HEK 293 и SH-SY5Y. Изучена возможность таргетной доставки в нейрональные клетки за счет введения дофамина в структуру вектора.

Ключевые слова: трансфекция, PEG-b-pAsp, спермин, спермидин, диэтилентриамин (DET)

Генная терапия представляет собой одно из наиболее динамично развивающихся направлений современной биомедицины, в основе которого лежит использование нуклеиновых кислот для лечения различных патологических состояний. Данный подход включает широкий спектр методов, направленных на изменение экспрессии генов или исправление генетических нарушений путём введения в клетки нового генетического материала. Основная идея генотерапии заключается в восстановлении нарушенного синтеза белков за счёт доставки генов, кодирующих необходимые белковые продукты. Применение нуклеиновых кислот в данном случае является более эффективным из-за отсутствия иммуногенности. Особенно актуально развитие генной терапии для лечения заболеваний центральной нервной системы, включая нейродегенеративные расстройства, для которых на сегодняшний день сохраняется дефицит эффективных терапевтических решений[1].

Ключевым условием успешной реализации генной терапии является создание эффективных механизмов доставки генетического материала внутрь клетки. После введения нуклеиновые кислоты подвергаются воздействию многочисленных внеклеточных и внутриклеточных барьеров, препятствующих их проникновению в клетки-мишени и значительно снижающих терапевтический эффект. К числу таких препятствий относятся ферментативная деградация, ограниченное прохождение через клеточные мембраны и низкая эффективность высвобождения терапевтического агента внутри клетки. В связи с этим разработка безопасных и результативных систем доставки рассматривается как одна из центральных задач в создании современных генотерапевтических препаратов[2].

Среди невирусных платформ доставки особый интерес представляют катионные полимеры, которые зарекомендовали себя как перспективные носители нуклеиновых кислот. Благодаря наличию положительно заряженных групп они способны эффективно связываться с отрицательно заряженными молекулами ДНК или РНК, образуя устойчивые наноразмерные комплексы. Такая конденсация способствует уменьшению размеров генетического материала, облегчая его транспорт через биологические барьеры, а также обеспечивает защиту нуклеиновых кислот от ферментативного разрушения до доставки в клетку. Дополнительным преимуществом катионных полимеров является возможность регулировать их химическую структуру, что позволяет подстраивать их свойства под разные задачи[3].

Для повышения селективности доставки в клетки нервной системы катионные полимеры могут быть модифицированы различными функциональными молекулами, обеспечивающими адресное взаимодействие с клетками-мишенями. Одним из перспективных направлений является введение в состав носителя дофамина в качестве таргетного лиганда[4]. Подобная модификация позволяет увеличить избирательность доставки генетического материала, повысить уровень его клеточного захвата и, как

следствие, улучшить эффективность терапевтического воздействия. Таким образом, создание функционализированных полимерных систем доставки открывает новые возможности для разработки более точных и безопасных подходов к лечению заболеваний нервной системы средствами генной терапии.

В ходе работы были синтезированы и охарактеризованы блок-сополимеры различной структуры на основе комбинаций полиэтиленгликоля и полиаспартамида или полиглутамида, модифицированных различными аминами. Для полученных полимеров была изучена цитотоксичность по отношению к клеточным культурам HEK 293 и SH-SY5Y. Полимеры в основе которых используется полиаспартамид показывают более высокую биосовместимость. Наиболее безопасным себя показал полимер состава N_3-PEG_{114}-b-pAsp(DET)$_{62}$.

Затем изучали эффективность полимеров в качестве платформы для доставки модельного гена зеленого флуоресцирующего белка в составе плазмиды pTurboGFP-C на клеточных культурах HEK 293 и SH-SY5Y. Для полимера состава N3-PEG_{114}-b-pAsp(DET)$_{62}$ было подобрано оптимально соотношение числа первичных аминогрупп полимера к числу ортоэфирных групп нуклеиновой кислоты (N/P) равное 25, при котором полимер демонстрирует эффективность доставки в два раза большую чем PEG_{114}-pLL_{50}.

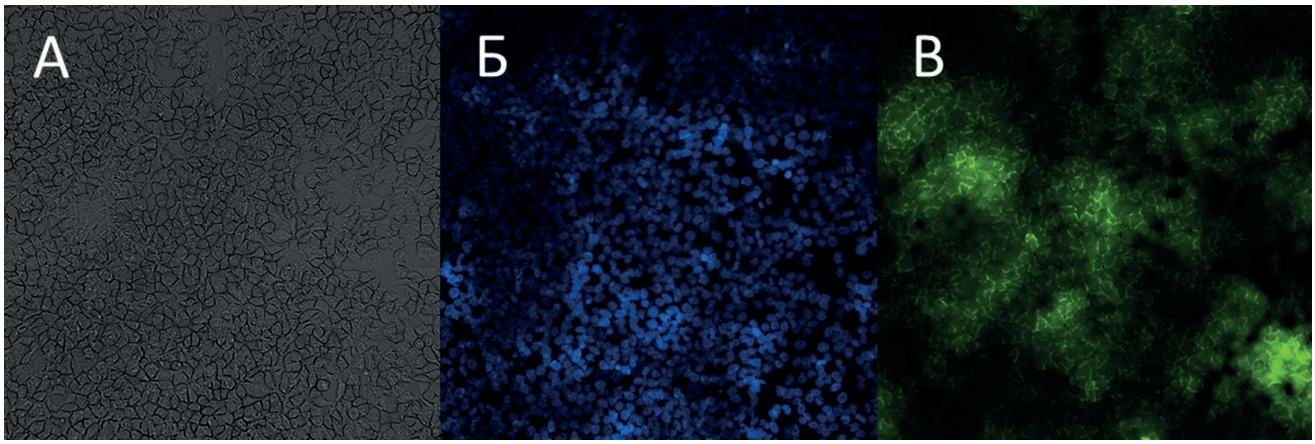


Рисунок 1. Фотографии трансфецированных клеток HEK 293 с помощью N_3-PEG_{114}-pAsp(DET)$_{62}$ с флуоресцентного микроскопа А – без фильтра, Б – λex 350 нм / λem 460 нм, В – λex 492 нм / λem 516 нм.

Эффективность включения дофамина в состав носителя для плазмиды изучалась на полимере состава N_3-PEG_{114}-b-pAsp(DET)$_{62}$, где азидная группа была замещена на дофамин с помощью реакции Cu(I)-катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения. В качестве модели нейрональных клеток использовалась культура SH-SY5Y. Также сравнили влияние замещения диэтилентриамина на спермидин. Как видно из данных представленных на рис.2 эффективность доставки плазмиды конъюгатом с дофамином превышает эффективность доставки с помощью немодифицированного полимера в 1,8 раз, аналогичным образом проявляет себя замена диэтилентриамина на спермидин, но вариант полимера со спермидином демонстрирует более высокую цитотоксичность.

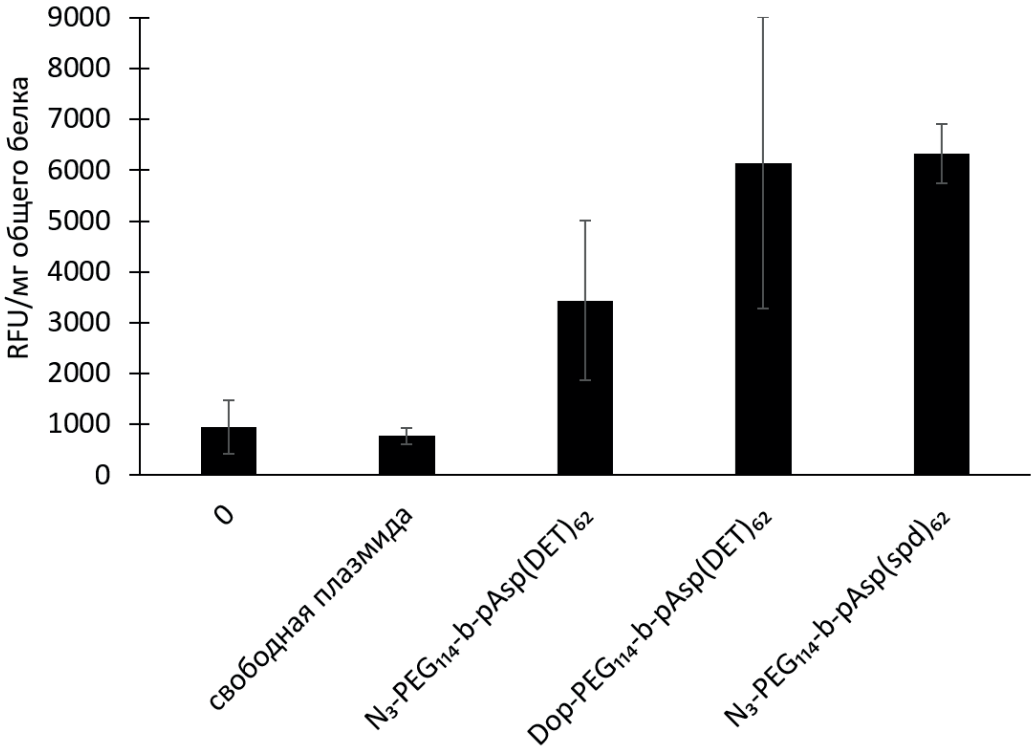


Рисунок 2. Удельная флуоресценция лизата клеток SH-SY5Y, нормированная на содержание общего белка, после инкубации с полиплексами состава pTurboGFP-C/блок-сополимер, приготовленными при соотношении N/P = 15.

Список литературы
1. Hamimed, S., Jabberi, M. & Chatti, A. Nanotechnology in drug and gene delivery // Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. – 2022. – Vol. 395. – No. 7. – P. 769–787
2. Wang, C., Pan C., Yong H., Wang F., Bo T., Zhao Y., Ma B., He W., Li M. Emerging non-viral vectors for gene delivery // Journal of Nanobiotechnology. – 2023. – Vol. 21. – No. 1. – Art. 272.
3. Zhang, J. Yang X., Chang Z., Zhu W., Ma Y., He H. Polymeric nanocarriers for therapeutic gene delivery // Asian Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2025. – Vol. 20. – No. 1. Art. 101015.
4. Zhou J., Meng N., Lu L., Lu J., Wu S., Ding Y., Wu S., Bao Y., Xu Q., Chen R., Wang J., Xie C., Wu J., Lu W. A novel peptide-drug conjugate for glioma-targeted drug delivery // Journal of Controlled Release. – 2024. – Vol. 369. – P. 722–733.

Работа частично поддержана грантом РНФ 22-13-00261П, темами с гос. регистрацией 121041500039-8 и 123032300028-0 и Программой развития МГУ (покупка приборов).

УДК 61:577.1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОЛИГОМЕРНОГО СОСТОЯНИЯ ГИБРИДНОГО БЕЛКА НА ОСНОВЕ ЦИТОХРОМА P450 CYP102A1 МЕТОДОМ АТОМНО СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Колесниченко А.В.[1], Краевский С.В.[1], Канашенко С.Л.[1], Пометун А.А.[2,3], Логинова А.А.[2,3], Плешакова Т.О.[1]

[1] ФГБНУ Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича г. Москва, РФ
[2] Химический факультет, кафедра химической энзимологии, МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
[3] ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, г. Москва, РФ
alenqw7@gmail.com

Аннотация. Представлены результаты исследований фьюжн-формы цитохрома P450 CYP102A1 с формиатдегидрогеназой (f-BM3) методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). Показана возможность определения мономерных и димерных форм фермента на основе анализа их высот и объемов, полученных при обработке данных сканирования с применением сверхострых зондов.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, цитохром P450 BM3 (CYP102A1), формиатдегидрогеназа.

В работе проведено определение олигомерного состояния (мономерных и димерных форм) f-BM3 с помощью атомно силовой микроскопии (АСМ). Определение олигомерного состояние важно при оценке активности фермента, т.к. данные цитохромы функционально активны в виде димеров [1]. Традиционным параметром, регистрируемым с помощью АСМ, является высота сорбированных молекул, которая может быть определена с субнанометровой точностью. Однако, при исследовании f-BM3 обнаружено значительное уменьшение высоты по сравнению с данными, полученными для белка, не содержащего формиатдегидрогеназу. Вследствие этого идентификация мономерных и димерных форм фермента f-BM3 только по высотам оказалась затруднительна. Поэтому был введен дополнительный параметр - оценка объемов визуализированных объектов, определение которых потребовало использование сверхострых зондов ($R_{закругления}$ < 3 нм) при сканировании.

Теоретически объем белка можно оценить [2] по формуле:

$$V_h = \frac{MW}{N_A}(V_2 + \delta V_1)$$

где MW - молекулярный вес белка, N_A - число Авогадро, V_2 – удельный объем белка (0,741 см^3/г), V_1 удельный объем воды (1 см^3/г), δ – гидратирование белка (около 0,3 – 0,4 г воды/г белка). Молекулярный вес f-BM3 около 150 кДа. В таком случае объемы мономеров и димеров, рассчитанные по указанной формуле, будут составлять ~ 250 нм^3 и ~500 нм^3 соответственно.

В результате обработки АСМ-изображений молекул f-BM3, полученных на воздухе, были выделены две группы объектов: первая (высотой около 3 нм, объемом до 1000 нм^3) предположительно включающая мономеры, вторая (высотой до 10 нм, объемом > 2000 нм^3) – олигомеры. Следует отметить, на поверхности, вокруг каждого объекта также визуализировалась протяженная структура высотой около 1 нм, предположительно, являющаяся кристаллами солей, образующихся при высыхании буфера.

Обработка АСМ-данных, полученных в жидкости также при сканировании сверхострым зондом, показала, что белок преимущественно визуализируется в мономерной и димерной форме: с высотой

в диапазоне (2,9 ± 0,8) нм и объемом в диапазоне от 200 нм^3 до 600 нм^3. В отличие от данных визуализации на воздухе, при визуализации в жидкости слои отсутствуют, что подтверждает гипотезу его солевого происхождения.

Сопоставление экспериментальных данных с теоретическими расчетами объемов позволило выделить группу функционально активных димеров (до 40 % в повторных измерениях).

Работа выполнена в рамках проекта «Влияние соединений, обладающих геропротективными свойствами, на единичные биомакромолекулы, модельные объекты и организм человека» при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2024-643). Эксперименты выполнены с использованием оборудования ЦКП "Протеом человека" и УНУ «Авогадро» Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича.

Список литературы

1. Kokorin, A., Parshin, P. D., Bakkes, P. J., Pometun, A. A., Tishkov, V. I., & Urlacher, V. B. Genetic fusion of P450 BM3 and formate dehydrogenase towards self-sufficient biocatalysts with enhanced activity //Scientific reports. – 2021. – Vol. 11. – №1. – P. 21706.

2. Fuentes-Perez M. E., Dillingham M. S., Moreno-Herrero F. AFM volumetric methods for the characterization of proteins and nucleic acids //Methods. – 2013. –Vol. 60, –№2, –P. 113-121.

УДК 376:15, 544.34, 544.45, 544.47

ЯДЕРНЫЙ СПИНОВЫЙ КАТАЛИЗ В ЖИВОЙ ПРИРОДЕ: НА СТЫКЕ ФИЗИКИ, ХИМИИ И БИОЛОГИИ

Кольтовер В.К.

Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН, Черноголовка, Московская обл., Россия
koltover@icp.ac.ru

Аннотация. В докладе представлены результаты исследований магнитно-изотопных эффектов в живых клетках и молекулярных моторах биоэнергетики: экспериментальные факты, физико-химические механизмы ядерного спинового катализа и перспективы применения стабильных магнитных изотопов в медицине для создания эффективных радиопротекторов и других антистрессовых препаратов, а также в медицинской физике низкочастотных электромагнитных полей.

Ключевые слова: магнитные изотопы, ядерный спиновый катализ, АТФ, биоэнергетика.

Многие химические элементы имеют стабильные изотопы двух типов – немагнитные (ядерный спин $I = 0$) и магнитные ($I > 0$). В химической физике давно известны магнитно-изотопные эффекты (МИЭ): скорость и выход продуктов реакции с участием свободных радикалов и/или ион-радикальных пар существенно зависят от степени обогащения исходных реагентов магнитными изотопами, например, ^{13}C, ^{17}O, ^{29}Si, ^{33}S, ^{73}Ge, $^{117,119}Sn$, $^{199,201}Hg$, ^{235}U [1]. Недавно были открыты МИЭ в экспериментах с клетками, обогащенными различными изотопами магния: магнитным (^{25}Mg, ядерный спин I = 5/2) или немагнитными (^{24}Mg, ^{26}Mg, $I = 0$). В экспериментах с бактериями E. coli было обнаружено, что в клетках, выросших в среде, обогащенной ^{25}Mg, активность супероксидисмутазы, важнейшего антиоксидантного фермента, на 40% ниже, чем в клетках, выросших в среде, обогащенной немагнитным изотопом ^{24}Mg [2]. Кроме того, у клеток, которые перед высевом на агар росли на магнитном изотопе, ^{25}Mg, колониеобразующая способность значительно выше, чем у клеток, выросших на немагнитных изотопах магния [3]. В экспериментах с другой общепринятой клеточной моделью, дрожжами *S. cerevisiae*, обнаружено, что константа скорости пострадиационного восстановления клеток, облученных ионизирующим излучением (300 Гр) или УФ-излучением (240 – 260 нм), в два раза выше, если клетки обогащены магнитным изотопом, ^{25}Mg, по сравнению с клетками, обогащенными немагнитным изотопом магния [4].

Каталитические эффекты магнитного ^{25}Mg обнаружены в реакции гидролиза АТФ, катализируемой миозином - важнейшим молекулярным мотором биоэнергетики. Скорость ферментативного гидролиза АТФ в среде с ^{25}Mg в два раза выше, чем в средах с немагнитными ^{24}Mg или ^{26}Mg. Аналогичный эффект обнаружен в экспериментах с цинком в качестве кофактора миозина. Скорость гидролиза АТФ с магнитным изотопом ^{67}Zn ($I = 5/2$) выше на 40-50 % по сравнению с немагнитными ^{64}Zn или ^{68}Zn [5, 6]. Небольшие, но статистически достоверные каталитические эффекты ^{25}Mg были обнаружены в реакции гидролиза АТФ, катализируемой митохондриальной H^+-АТФ-азой, встроенной в липосомы, и в реакции гидролиза АТФ, катализируемой Mg-зависимой АТФ-азой плазматических мембран миометрия [6]. Однако не обнаружены МИЭ в аналогичных экспериментах с креатинкиназой – ферментом, который катализирует реакцию синтеза креатинфосфата (перенос высокоэнергетической фосфатной группы $\sim P_i$ от АДФ на креатин) и реакцию гидролиза креатинфосфата с переносом $\sim P_i$ на АДФ с образованием АТФ. И хлорид магнитного изотопа (^{25}Mg) и хлорид обычного магния (природного изотопного состава) оказывают одинаковое влияние на активность фермента [7]. Не обнаружены МИЭ и в экспериментах по влиянию различных изотопов магния на активность люциферазы – фермента, который катализирует реакцию окисления люциферина молекулярным кислородом в присутствии комплекса Mg-АТФ. Ни кинетика реакции окисления люциферина, катализируемой люциферазой, ни спектры люминесценции от типа изотопа магния, магнитный vs немагнитный, не зависят [8].

Таким образом, ядерный спиновый катализ наблюдается в работе только тех ферментов, которые выполняют функции биомолекулярных моторов, а именно: используют химическую энергию гидролиза АТФ для выполнения механической работы полностью, как миозин, или хотя бы частично, как митохондриальная H^+-АТФ-аза и Mg-зависимая АТФ-аза плазматических мембран. Из химической физики известно, что МИЭ однозначно свидетельствует о том, что в изучаемом процессе имеется лимитирующая стадия, зависимая от электронного спинового состояния реагентов, и что эта стадия ускоряется ядерным спином магнитного изотопа [1]. Известно также, что в ферментативных реакциях, катализируемых биомолекулярными моторами, лимитирующей стадией является конформационная перестройка (конформационная релаксация) макромолекулы [9]. Имеются основания полагать, что ядерный спин изотопа, ^{25}Mg или ^{67}Zn, воздействуя на ядерные спины протонов воды, ускоряет конверсию *opmo/para*-изомеров воды (параллельные/антипараллельные спины протонов), необходимую для конформационной перестройки макромолекулы [10]. Детальные механизмы ядерного спинового катализа в биомолекулярных моторах и живых клетках – задачи дальнейших исследований. Результаты, полученные к настоящему времени, демонстрируют перспективы магнитных изотопов для создания эффективных радиопротекторов и радиомитигаторов, а также в медицинской физике низкочастотных электромагнитных полей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (государственное задание № 124020500019-2).

Список литературы

1. Зельдович Я.Б., Бучаченко А.Л., Франкевич Е.Л. Магнитно-спиновые эффекты в химии и молекулярной физике // Успехи физ. наук. – 1988. – Т. 155. – № 1. – С. 3-45.
2. Богатыренко Т.Н., Кудряшова Е.А., Туманова Л.В., Кольтовер В.К. Влияние различных изотопов магния на уровень активности супероксиддисмутазы при изучении кинетики роста Escherichia coli // V Междунар. когресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине». – Санкт-Петербург: Информнаука, 2009. – С. 92.
3. Кольтовер В.К., Шевченко У.Г., Авдеева Л.В., Ройба Е.А., Бердинский В.Л., Кудряшова Е.А. Магнитно-изотопный эффект магния в живой клетке // Доклады АН. – 2012. – Т. 442. – № 2. – С. 272-274.
4. Avdeeva L.V., Evstyukhina T.A., Koltover V.K., Korolev V.G., Kutlakhmedov Yu.A. Recovery of the yeast cells from radiation injuries by means of the magnetic isotopes: new trend in anti-radiation biomedicine // Nucl. Phys. At. Energy. – 2019. – Vol. 20. – No. 3. – P. 271-277.
5. Koltover V.K., Labyntseva R.D., Kosterin S.O. Stable magnetic isotopes as modulators of ATPase activity of smooth muscle myosin. Myosin: Biosynthesis, Classes and Function (Broadbent D., ed). – New York: Nova Science Publ. Inc., 2018. – P. 135-158. – ISBN 978-1-53613-817-7.
6. Кольтовер В.К., Лабынцева Р.Д., Карандашев В.К. Магнитно-изотопные эффекты магния и цинка в ферментативных реакциях гидролиза АТФ, катализируемых молекулярными моторами // Биофизика. – 2020. – Т. 65. – № 3. – С. 493-503.
7. Crotty D. et al. Reexamination of magnetic isotope and field effects on adenosine triphosphate production by creatine kinase // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2012. – Vol. 109. – No. 5. – P. 1437-1442.
8. Смирнова Д.А., Кольтовер В.К., Носенко С.В., Стрижова И.А., Угарова Н.Н. Люцифераза светлячков как инструмент для поиска и изучения магнитно-изотопных эффектов в АТФ-зависимых ферментативных реакциях // Вестн. Моск. ун-та, сер. 2 «Химия». – 2018. – Т. 59. – № 4. – С. 266–274.
9. Блюменфельд Л.А., Кольтовер В.К. Трансформация энергии и конформационные переходы в митохондриальных мембранах как релаксационные процессы // Мол. биология. – 1972. – Т. 6, – № 1. – С. 161-166.
10. Koltover V.K. Energy transformation and nuclear spin catalysis: From magnetic isotope effects in chemical physics to ATP-dependent molecular motors in bioenergetics // BioSystems. – 2026. – Vol. 259. – No. 1. – Art. 105657.

УДК 547.458

СЕЛЕКТИВНЫЕ СОРБЕНТЫ С РАСПОЗНАЮЩИМИ ПОЛОСТЯМИ НА ОСНОВЕ β-ЦИКЛОДЕКСТРИНА И ХИТОЗАНА: СИНТЕЗ И СОРБЦИОННЫЕ СВОЙСТВА

Копнова Л.Р.[1,2], Копнов А.Ю.[2], Копнова Т.Ю.[2], Кудряшова Е.В.[1,2]

[1] АНО ВО «Центральный университет», г. Москва, РФ
[2] Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
Yakupova.Linara@mail.ru

Аннотация. Разработаны молекулярно импринтированные полимеры на основе производных β-циклодекстрина и хитозана для селективного связывания аналитов (антибактериальные препараты, красители). Структура полимеров подтверждена ИК-спектроскопией Фурье. Оптимум сорбции достигнут при pH 3,0 (ёмкость до 75 мг/г, коэффициент селективности до 27,5). Полученные материалы перспективны для эфферентной терапии, биомедицинского анализа и систем контролируемой доставки лекарств.

Ключевые слова: молекулярно импринтированные полимеры, β-циклодекстрин, хитозан, левофлоксацин, меропенем, рифампицин.

В современной биомедицине, аналитической химии и экологическом мониторинге остро стоит задача создания сорбционных материалов, не только обладающих высокой сорбционной ёмкостью, но и способных обеспечивать избирательное извлечение целевых аналитов из сложных матриц. Классические сорбенты, такие как ионообменные смолы, кремнийсодержащие и т.д., характеризуются недостаточной селективностью, что существенно ограничивает их применение в аналитических целях. Перспективным решением данной проблемы выступает технология создания молекулярно импринтиных полимеров (MIPs), позволяющая получать синтетические материалы с спроектированными распознающими полостями [1]. Синтез таких полимеров осуществляется в три ключевые стадии: формирование нековалентного комплекса между молекулой-шаблоном и функциональным мономером, последующая пространственная фиксация комплекса бифункциональным сшивающим агентом и окончательное удаление шаблона. В результате в трехмерной полимерной матрице остаются полости, комплементарные целевой молекуле по форме, размеру и пространственной ориентации функциональных групп [2].

В качестве функциональных мономеров в данной работе предложено использовать производные β-циклодекстрина, обладающие уникальной гидрофильной внешней поверхностью и гидрофобной внутренней полостью, обеспечивающей высокую аффинность к различным классам органических молекул [3]. Их комбинация с хитозаном, имеющим поликатионную природу, позволяет оптимизировать архитектуру сорбента для эффективного связывания отрицательно заряженных биомолекул. Кроме того, оба вещества характеризуются высокой биосовместимостью и низкой токсичностью, что критически важно для биомедицинского и экологического применения. Для использования в качестве бифункциональных сшивающих агентов для взаимодействия с производными β-циклодекстрина выбраны диизоцианаты, обеспечивающие формирование уретановых связей, сочетающих достаточную механическую прочность и химическую стабильность с биодеградируемостью. В частности, толуилендиизоцианат (ТДИ) за счет ароматического фрагмента способствует формированию более жесткой полимерной сетки и дополнительному π–π взаимодействию с ароматическими фрагментами молекул-шаблонов, тогда как 1,6-гексаметилендиизоцианат (ГМД) содержит гидрофобный алкильный участок, усиливающий гидрофобные взаимодействия внутри импринтированных полостей. Для формирования трехмерной сети хитозанового компонента был применен генипин — природный реагент, обладающий рядом существенных преимуществ перед синтетическими линкерами: низкой цитотоксичностью,

способностью формировать прочные ковалентные поперечные связи с первичными аминогруппами хитозана в мягких водных условиях, а также полной биоразлагаемостью продуктов его превращения. Данные свойства делают генипин оптимальным для создания медицинских сорбентов и платформ доставки препаратов. Модельными объектами служили антибактериальные препараты (левофлоксацин, меропенем, рифампицин) и флуоресцентные красители (родамин 6Ж, флуоресцеин). Целью работы являлась разработка и оптимизация методик синтеза комбинированных MIPs на основе производных β-циклодекстрина и хитозана, а также комплексное исследование их структурных и сорбционных характеристик для потенциального применения в биомедицине.

Синтез полимеров проводили в три последовательные стадии. На первом этапе в водной среде при 37 °C осуществляли формирование нековалентных комплексов гидроксипропил-β-циклодекстрина (ГПЦД) с молекулами-шаблонами. Далее полученные комплексы пространственно сшивали подходящим бифункциональным линкером с образованием трехмерной полимерной матрицы. Завершающим этапом выступала очистка полимеров методом равновесного диализа, обеспечивающая мягкое и полное удаление непрореагировавших компонентов и молекул-шаблонов без разрушения сформированных распознающих центров (Рисунок 1). Структурная идентификация полученных полимеров осуществлялась методом ИК-спектроскопии Фурье. В спектрах всех синтезированных образцов зафиксированы характеристические полосы в области 1640–1740 $см^{-1}$, соответствующие валентным колебаниям карбонильной группы вновь образованных уретановых связей, что подтверждает успешное протекание реакции сшивания. Полосы в диапазоне 1000–1100 $см^{-1}$ свидетельствуют о сохранении гликозидных связей ГПЦД в полимерной матрице. Важным результатом стало полное отсутствие специфических полос, характерных для молекул-шаблонов, после диализной очистки, что подтверждает эффективность процедуры удаления молекулы-шаблона. Дополнительный анализ методом картирования ИК-микроскопом продемонстрировал равномерное распределение молекулы-шаблона по всему объему полимерной частицы, а также корреляцию между локальной плотностью сшивки и концентрацией захваченного аналита.

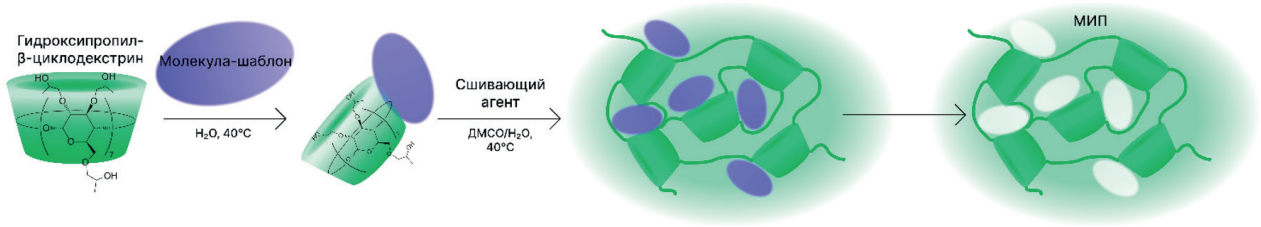


Рисунок 1. Схема синтеза MIPs.

Для всех синтезированных полимеров был исследован ζ-потенциал, характеризующий поверхностный заряд и коллоидную стабильность частиц. Установлено, что импринтированные полимеры ГПЦД–ГМД, обладают положительным ζ-потенциалом в диапазоне от 21,1±2,0 до +9,0±1,5 мВ, что вероятно обусловлено присутствием протонированных первичных аминогрупп, образующихся при гидролизе непрореагировавших изоцианатных фрагментов. Для полимеров ГПЦД–ТДИ значения ζ-потенциала также положительны, но существенно ниже и составляют от 8,8±0,3 до 12,4±0,2 мВ, что может быть связано с влиянием ароматических колец толуилендиизоцианата, формирующих более гидрофобную и компактную поверхность. В случае комбинированных систем с хитозаном, сшитых генипином, зафиксированы отрицательные значения ζ-потенциала: –13,1±1,9 мВ для неимпринтированного полимера и –31,5±1,84 мВ для импринтированного аналога. Существенное смещение потенциала в отрицательную область после импринтинга и удаления молекулы-шаблона свидетельствует о реорганизации поверхностных функциональных групп, что может способствовать усиленному электростатическому притяжению заряженных форм целевых молекул при кислых значениях pH. Полученные данные подтверждают, что варьирование природы сшивающего агента и наличие импринтированных центров позволяют целенаправленно модифицировать поверхностные свойства полимеров, оптимизируя их для селективного связывания целевых молекул.

Исследование сорбционных характеристик выявило выраженную pH-зависимость процессов связывания. Максимальная эффективность сорбции всех молекул-шаблонов наблюдается при pH 3,0, что в ряде случаев объясняется протонированием карбоксильных групп целевых молекул, способствующим усилению гидрофобных взаимодействий с полостями MIPs. При нейтральных и щелочных значениях pH сорбционная емкость снижается из-за депротонирования и возникновения электростатического отталкивания. Установлено, что плотность сшивки напрямую влияет на сорбционные свойства: оптимальный мольный избыток сшивающего агента обеспечивает баланс между доступностью центров и жесткостью полимерной матрицы. Изучение селективности полимеров методом равновесного диализа на примере левофлоксацина в присутствии структурно близкого аналога показало, что полимер на ГПЦД–ТДИ при мольном соотношении 1:1 обладает максимальной избирательностью, достигая коэффициента разделения α = 27,5. Анализ поляризации флуоресценции подтвердил формирование прочных комплексов «аналит–MIP», сопровождающееся существенным ограничением вращательной подвижности молекул левофлоксацина. Константы связывания для импринтированных полимеров существенно превышают параметры для мономерной формы ГПЦД. Отдельное внимание уделено созданию комбинированных систем с хитозаном, сшитых генипином. Оптимизация состава позволила достичь максимальной сорбционной емкости 75 мг/г для гибридного сорбента «хитозан–ГПЦД–генипин», причем импринтированные образцы демонстрировали более высокие значения сорбционной ёмкости и селективности по сравнению с контрольными полимерами. Полученные данные подтверждают перспективность разработанных платформ для создания селективных сорбентов эфферентной терапии и систем доставки препаратов.

Работа выполнена с использованием оборудования (ИК-Фурье-спектрометр Bruker Tensor 27, NTEGRA II и КД-спектрометр) по программе развития МГУ.

Список литературы

1. Leibl N., Haupt K., Gonzato C., Duma L. Molecularly imprinted polymers for chemical sensing: A tutorial review // Chemosensors. – 2021. – Vol. 9. – № 6. – P. 1–19.
2. Belbruno J.J. Molecularly Imprinted Polymers // Chem. Rev. – 2019. – Vol. 119. – № 1. – P. 94–119.
3. Kurkov S. V., Loftsson T. Cyclodextrins // Int. J. Pharm. – 2013. – Vol. 453. – № 1. – P. 167–180.

УДК 615.33:639.3

СИНТЕЗ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИМЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЛЕВОФЛОКСАЦИНА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В АКВАКУЛЬТУРЕ

Копнова Т.Ю., Копнова Л.Р., Белогурова Н.Г., Злотников И.Д., Кудряшова Е.В.

Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
tatiana.kopnowa@yandex.ru

Аннотация. Синтезированы полимерные комплексы левофлоксацина с хитозаном, энтеросгелем и силикагелем/гидроксипропил-β-циклодекстрином. Методами флуориметрии и диализа определена сорбционная ёмкость (до 1,0 мг/мг), эффективность загрузки (85–95%) и кинетика высвобождения. Антимикробная активность против *E. coli* и *B. subtilis* в 2–4 раза выше коммерческого аналога. Комплексы перспективны для аквакультуры.

Ключевые слова: левофлоксацин, полимерные комплексы, аквакультура, антимикробная активность, пролонгированное высвобождение.

В современной аквакультуре бактериальные инфекции, вызываемые грам-отрицательными патогенами (*Aeromonas hydrophila*, *Vibrio* spp. и др.), ежегодно приводят к потерям продуктивности до 20–30%. Антибиотики фторхинолонового ряда, включая левофлоксацин (ЛФ), сохраняют высокую эффективность, однако их неконтролируемое применение провоцирует развитие антибиотикорезистентности, накопление остаточных количеств в воде и рыбе, а также создаёт экологические риски для водных экосистем. Перспективным подходом к решению этой проблемы является использование полимерных и наноразмерных носителей, позволяющих формировать нековалентные комплексы с ЛФ, что обеспечивает пролонгированное и целенаправленное высвобождение антибиотика, снижение его токсичности и минимальные рабочие концентрации [1]. В связи с этим цель настоящей работы — синтез, физико-химическая характеристика и оценка антимикробной активности полимерных комплексов левофлоксацина для ветеринарного применения в аквакультуре.

Выбор носителей был обусловлен их биосовместимостью, стабильностью в водных средах и способностью к контролируемому высвобождению ЛФ. Хитозан как природный поликатион обеспечивает мукоадгезию и дополнительный антимикробный эффект за счёт положительного заряда; энтеросгель отличается высокой сорбционной ёмкостью и безопасностью для рыб; силикагель с гидроксипропил-β-циклодекстрином (ГПЦД) обладает пористостью и способностью включать ЛФ в полости циклодекстрина, защищая антибиотик от деградации [2]. Для усиления стабильности и эффективности были добавлены дигидрокверцетин, предотвращающий окисление ЛФ, и генипин, повышающий механическую прочность матрицы. В рамках работы синтезированы четыре типа препаратов с загрузкой ЛФ от 7 до 50% масс.: хитозан + ЛФ; хитозан + ЛФ + дигидрокверцетин, сшитый генипином (серия II); энтеросгель + ЛФ; а также силикагель + ГПЦД + ЛФ.

Наибольшая сорбционная ёмкость носителей наблюдалась у препаратов на основе силикагеля и энтеросгеля — до 0,7 и 1,0 мг ЛФ на 1 мг носителя соответственно, что объясняется высокой пористостью и удельной поверхностью силикагеля (до 1000 м²/г), обеспечивающей эффективное включение ЛФ в мезопоры, а также гидрогелевой природой энтеросгеля, проявляющего высокую аффинность к фторхинолонам. Хитозан, напротив, показал меньшую ёмкость (0,2–0,4 мг/мг) из-за своей полимерной природы, но компенсировал это мукоадгезивными свойствами и образованием ионных связей с молекулой ЛФ. Эффективность загрузки, определённая флуориметрически при $\lambda_{возб}$290 нм и $\lambda_{эмис}$ 350 нм, составила 85–95% для всех типов комплексов.

Растворимость полученных комплексов в фосфатном буферном растворе (PBS, pH 7,4) оказалась в 3–10 раз ниже, чем у чистого ЛФ — значения варьировались от 1,2 до 12 мг/мл в зависимости от типа носителя. Такое снижение растворимости обеспечивает защиту ЛФ от преждевременной деградации и вымывания. Наибольшее время полного растворения (до 72 ч) зафиксировано для серии II (хитозан + ЛФ + дигидрокверцетин + генипин), что связано с гидрофобностью сшивки генипином и антиоксидантным действием дигидрокверцетина. Кинетику высвобождения *in vitro* изучали методом диализа через мембрану 12–14 кДа в тех же условиях (PBS, pH 7,4, 25°C). Время полувысвобождения ЛФ варьировалось от 12 до 48 ч и коррелировало с гидрофобностью и структурной плотностью носителя: наиболее медленное высвобождение характерно для сшитых хитозановых комплексов (серия II), тогда как энтеросгель и силикагель обеспечивают более быстрое, но всё ещё пролонгированное высвобождение. Все комплексы демонстрируют профиль контролируемого высвобождения без выраженного «взрывного» эффекта в первые часы, что важно для поддержания терапевтической концентрации антибиотика.

Антимикробную активность оценивали по минимальной ингибирующей концентрации (МИК) методом диффузии в агар на тест-культурах *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis* в сравнении с коммерческим препаратом «Антибак» (свободный левофлоксацин). Было установлено, что зона ингибирования роста диаметром 8 мм достигается при концентрации ЛФ в комплексах 0,1–2 мкг/мл, тогда как для «Антибака» аналогичный эффект наблюдается при концентрациях 4–8 мкг/мл. Таким образом, разработанные полимерные комплексы обеспечивают снижение минимальной ингибирующей концентрации в 2–4 раза по сравнению со свободным антибиотиком. Этот эффект объясняется, во-первых, улучшенной доставкой ЛФ к бактериальным клеткам — особенно для хитозановых комплексов за счёт мукоадгезии и положительного заряда, способствующего электростатическому взаимодействию с отрицательно заряженными бактериальными мембранами, — а во-вторых, защитой ЛФ от преждевременной инактивации благодаря включению в полимерную матрицу.

Синтезированные и охарактеризованные полимерные комплексы левофлоксацина на основе хитозана, энтеросгеля и силикагеля с гидроксипропил-β-циклодекстрином демонстрируют высокую сорбционную ёмкость (до 1,0 мг/мг), эффективность загрузки 85–95%, сниженную в 3–10 раз растворимость в физиологических условиях и пролонгированное высвобождение с временем полувысвобождения от 12 до 48 ч. Антимикробная активность полимерных форм ЛФ против *E. coli* и *B. subtilis* в 2–4 раза превышает активность коммерческого аналога. Полученные результаты позволяют рассматривать разработанные комплексы как перспективную экологически безопасную альтернативу свободным антибиотикам для дальнейших полевых испытаний в аквакультуре.

Список литературы

1. Копнова Т.Ю. БИОМАТЕРИАЛЫ И ЭНТЕРОСОРБЕНТЫ КАК НОСИТЕЛИ ЛЕКАРСТВ В АКВАКУЛЬТУРЕ: СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ И ИССЛЕДОВАНИЯ // Научный спектр. 2025. № 3. С. 26–39.

2. Radhakrishnan A. Sustainable chitosan-based biomaterials for the future: a review // Polym. Bull. 2025. Vol. 82, № 3. P. 661–709.

УДК

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ УСНИНОВОЙ КИСЛОТЫ – ИНГИБИТОРОВ TDP1 В КАЧЕСТВЕ ВСПОМОГАТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ В КОМБИНАЦИИ С ТОПОТЕКАНОМ *IN VIVO*

Корниенко Т.Е.[1], Захаренко А.Л.[1], Фирсова А.А.[2], Лузина О.А.[2], Рогачев А.Д.[2], Попова Н.А.[3], Николин В.П.[3], Салахутдинов Н.Ф.[2], Лаврик О.И.[1]

[1] Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, РФ
[2] Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, г. Новосибирск, РФ
[3] Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, РФ
t.kornienko1995@gmail.com

Аннотация. В докладе представлена информация об исследовании возможности применения комбинированной терапии топотеканом с енаминовым производным усниновой кислоты OL9-116 – ингибитором TDP1. Показано, что OL9116 не обладает выраженной токсичностью, усиливает действие топотекана как *in vitro*, так и *in vivo* и позволяет снизить его дозу втрое без потери эффективности на моделях опухолей мышей.

Ключевые слова: репарация ДНК, тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1, ингибиторы тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1, топотекан, комбинированная химиотерапия.

Топотекан – полусинтетический лекарственный препарат, производное камптотецина и представитель ингибиторов топоизомеразы I (TOP1), широко применяемый в схемах лекарственной терапии метастатического рака яичников, рецидивирующего/персистирующего рака шейки матки, а также мелкоклеточного рака легкого [1]. Его фармакологический эффект обусловлен стабилизацией ковалентного комплекса TOP1–ДНК и блокированием религирования одноцепочечных разрывов, что при столкновении с репликативной вилкой приводит к формированию двуцепочечных разрывов, накоплению повреждений ДНК и запуску каскада реакций в быстро пролиферирующих опухолевых клетках, что приводит к их дальнейшей гибели [2].

Тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (TDP1) – фермент системы репарации ДНК, катализирующий гидролиз 3’-фосфотирозильных и других блокирующих аддуктов на 3›-концах ДНК, в том числе ковалентных комплексов TOP1–ДНК, стабилизированных камптотецином и его производными, такими как топотекан. За счет удаления TOP1–ДНК-аддуктов TDP1 способствует восстановлению целостности цепи ДНК и тем самым ослабляет цитотоксический эффект терапии ингибиторами TOP1, выступая одним из ключевых молекулярных факторов лекарственной резистентности опухолевых клеток к топотекану [3]. Таким образом, разработка ингибиторов TDP1 в качестве вспомогательной терапии в комбинации с топотеканом является перспективным направлением в лечении онкологических заболеваний, способным повысить эффективность химиотерапии и/или снизить его дозу.

Ранее нами были обнаружены эффективные ингибиторы TDP1 среди производных природных биологически активных соединений разных химических классов [4]. Одним из наиболее активных является соединение под лабораторным шифром OL9-116, представляющее собой енаминовое производное усниновой кислоты. Показано, что данное соединение не обладает выраженной собственной токсичностью в отношении пассируемых клеточных линий и лабораторных животных, при этом существенно усиливает противоопухолевое и антиметастатическое действие топотекана как в опытах *in vitro*, так и на моделях *in vivo* [6-8]. В рамках работы был проведен фармакокинетический анализ OL9-116

в образцах цельной крови, тканях органов и опухоли [9]. Полученные данные позволили определить время достижения максимальной концентрации вещества в крови, повысить эффективность комбинированной терапии топотеканом в сочетании с OL9-116 на экспериментальных моделях опухолей. Далее был экстраполирован из клинической практики на экспериментальные мышиные модели режим курсового дозирования топотекана. На основе полученных фармакокинетических данных и курса введения топотекана была разработана комбинированная схема терапии, позволившая снизить в 3 раза дозировку топотекана на фоне внутрибрюшинного введения OL9-116 без потери противоопухолевого и антиметастатического эффекта. Схема применена на моделях карциномы легкого Льюис (LLC) и рака шейки матки (РШМ-5).

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 25-74-30006).

Список литературы

1. U.S. Food and Drug Administration. Topotecan injection [Электронный ресурс]. – URL: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/022453s002lbl.pdf (дата обращения: 25.04.2026).
2. Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond //Nature Reviews Cancer. – 2006. – Vol. 6. – №. 10. – P. 789-802.
3. Comeaux E. Q., van Waardenburg R. C. A. M. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase I resolves both naturally and chemically induced DNA adducts and its potential as a therapeutic target //Drug metabolism reviews. – 2014. – Vol. 46. – №. 4. – P. 494-507.
4. Zakharenko A. L. et al. Natural products and their derivatives as inhibitors of the DNA repair enzyme tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 //International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24. – №. 6. – P. 5781.
6. Koldysheva E. V. et al. Antimetastatic activity of combined topotecan and tyrosyl-DNA phosphodiesterase-1 inhibitor on modeled lewis lung carcinoma //Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2019. – Vol. 166. – №. 5. – P. 661-666.
7. Nikolin V. P. et al. The influence of an enamine usnic acid derivative (a tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitor) on the therapeutic effect of topotecan against transplanted tumors in vivo //Clinical & Experimental Metastasis. – 2021. – Vol. 38. – №. 5. – P. 431-440.
8. Zakharenko A. et al. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors: Usnic acid enamines enhance the cytotoxic effect of camptothecin //Journal of natural products. – 2016. – Т. 79. – Vol. 11. – P. 2961-2967.
9. Okhina A. A. et al. Pharmacokinetic study of Tdp1 inhibitor resulted in a significant increase in antitumor effect in the treatment of Lewis lung carcinoma in mice by its combination with topotecan //Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2023. – Vol. 236. – P. 115731.

УДК 61:577.1

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ЕДИНИЧНЫХ МОЛЕКУЛ F-BM3 МЕТОДОМ СИЛОВОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Краевский С.В.[1], Колесниченко А.В.[1], Пометун А.А.[2,3], Логинова А.А.[2,3], Плешакова Т.О.[1]

[1] Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича г. Москва, РФ
[2] Химический факультет, кафедра химической энзимологии, МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
[3] ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, г. Москва, РФ
skraevsky@mail.ru

Аннотация. Предложен метод определения активности единичных молекул ферментов на основе силовой спектроскопии. В основе метода лежит регистрация частотных характеристик изменения конформационных изменений белка с помощью кантилевера атомно-силового микроскопа (АСМ). На примере белка f-BM3 показано, что подобные частотные характеристики отличаются у ферментов в присутствии и отсутствие субстрата.

Ключевые слова: BM3, атомно-силовая микроскопия, силовые кривые, активность единичной молекулы.

Традиционные методы исследования активности ферментов работают с ансамблями молекул. Энзимология единичных молекул относительно молодое направление биохимии начавшее активно развиваться в начале текущего столетия [1]. Особое место среди методов позволяющих исследовать активность единичных ферментов занимает АСМ [2,3], позволяющий работать с белками в условиях, близких к нативным, и измерять высоту отдельных биологических макромолекул с субнанометровой точностью.

В настоящей работе с помощью сканирующей зондовой микроскопии исследована активность гибридного белка f-BM3, состоящего из цитохрома P450 BM3 и формиатдегидрогеназы. BM3 является одним из самых активных среди других цитохромов P450, его k_{cat} может достигать 17100 мин$^{-1}$ при окислении арахидоновой кислоты [4]. У гибридного белка эта величина меньше и составляет k_{cat} = 75 мин$^{-1}$ по данным спектрофотометрии [5].

Чтобы определить такую активность, необходимо провести измерения с частотой дискретизации не менее 600 Гц, что невозможно реализовать, регистрируя АСМ изображения, даже отключив медленную ось (по аналогии с [3]), так как частота дискретизации будет ниже требуемой частоты Найквиста в 600 Гц. Однако можно воспользоваться методом силовой спектроскопии (силовых кривых), при котором кантилевер не совершает движения вдоль подложки, а двигается только в перпендикулярном направлении, касаясь поверхности и отдаляясь от неё. В таком режиме, АСМ будет работать как нанофонендоскоп, позволяя регистрировать колебания поверхности и объектов на ней с частотой дискретизации до 10 кГц.

Показано, что в присутствии субстрата частота колебаний единичных сорбированных молекул f-BM3 может достигать 225 Гц, при этом в отсутствии субстрата такие колебания не наблюдались. Предполагается, что изменение высоты молекулы белка связано с ферментативной активностью. Завышение активности единичного фермента по сравнению с измеренным по спектрофотометрии может быть связано со склонностью молекул к агрегации при высоких концентрациях, в отличии от работы единичной иммобилизованной молекулы, а также с тем, что на один такт работы фермента может приходиться несколько колебаний белка.

Работа выполнена в рамках проекта «Влияние соединений, обладающих геропротективными свойствами, на единичные биомакромолекулы, модельные объекты и организм человека» при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2024-643). Эксперименты выполнены с использованием оборудования ЦКП "Протеом человека" и УНУ «Авогадро» Научно-исследовательского института биомеицинской химии имени В.Н. Ореховича.

Список литературы

1. Xie X.S. Single Molecule Approach to Enzymology // Single Molecule. –2001. –Vol. 4. –P.229-236.
Ivanova, I.A.; Valueva, A.A.; Ershova, M.O.; Pleshakova, T.O. AFM for Studying the Functional Activity of Enzymes // *Biomolecules* –**2025**, –No. *15. –P.* 574.
2. Бухарина, Н. С. Визуализация и мониторинг активности цитохрома P450 BM3 с использованием атомно-силовой микроскопии : специальность 03.01.04 "Биохимия» : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Бухарина Наталья Сергеевна, 2014. – 109 с.
3.Noble MA, Miles CS, Chapman SK, Lysek DA, MacKay AC, Reid GA, Hanzlik RP, Munro AW. Roles of key active-site residues in flavocytochrome P450 BM3 // Biochem J. –1999. –Vol. 339. –P. 371-9.
4. Kokorin A, Parshin PD, Bakkes PJ, Pometun AA, Tishkov VI, Urlacher VB. Genetic fusion of P450 BM3 and formate dehydrogenase towards self-sufficient biocatalysts with enhanced activity // Sci Rep. –2021. –Vol.11. –P.21706.

УДК 577:325 2

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ БИОТЕСТЫ: ОТ ИДЕИ ДО ПРИМЕНЕНИЯ В ОЦЕНКЕ НЕФТЯНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

Кратасюк В.А.[1,2]

[1] *Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, РФ*
[2] *Сургутский государственный университет, г. Сургут, РФ*
valkrat@mail.ru.ru

Аннотация. Рассматриваются перспективы использования биолюминесцентных ферментативных биотестов для экспрессного экологического мониторинга водных экосистем, воздушной среды и нефтезагрязненных почв. Особое внимание уделено применению ферментативных биотестов для оценки токсичности загрязнителей и разработки подходов к экологическому мониторингу и ремедиации почв, загрязненных нефтепродуктами.

Ключевые слова: биосенсоры, биолюминесценция, люцифераза, светящиеся бактерии, ферментативные биотесты, экологический мониторинг, экологический мониторинг, нефтезагрязненные почвы, токсичность, нефтепродукты, ремедиация почв.

Классические биотесты для экологического мониторинга с использованием живых объектов (парамеций, водорослей, дафний, бактерий и т.п) имеют низкую точность измерений из-за необходимости поддержания стабильной бактериальной культуры во время измерений и при хранении. Для решения этих проблем разработаны ферментативные биотесты для экологического мониторинга, которые позволяют обнаружить неизвестные токсичные соединения в окружающей среде, и, также как классические биотесты, показывают влияние вредных веществ на функции живых организмов. Анализ состоит в обнаружении токсических свойств тестируемых веществ и смесей по их влиянию на интенсивность свечения биферментной системы: NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза +люцифераза (Red + Luc) [1,2].

Биотесты на основе биферментной системы Red + Luc были успешно использованы для анализа воды реки Енисей и её притоков, питьевой воды различных районов Красноярска и Алтайского края, соленого озера Шира (республика Хакасия), а также озера Байкал [3].

Получены данные, убедительно демонстрирующие возможности применения биолюминесцентных ферментных тестов для анализа токсичности не только воды, но и воздуха, снега [4] и почвы [5]. Определены составы такого теста для исследования загрязнения городских и сельскохозяйственных почв, на основе специфического действия токсикантов на ферменты. Для разработки новой методологии комплексного ферментативного биотеста, направленного на оценку токсикологических параметров при загрязнении почв нефтепродуктами, ключевым методологическим подходом является подбор оптимальных экстрагирующих веществ [6].

Особый интерес представляет применение ферментативных биотестов для оценки токсичности нефтепродуктов и комплексного анализа нефтезагрязненных почв северных территорий. Использование биолюминесцентных ферментативных систем позволяет проводить экспрессную интегральную оценку токсичности загрязнителей и контролировать эффективность процессов биоремедиации почв. Такие подходы особенно актуальны для территорий нефтедобычи Западной Сибири и Ханты-Мансийского автономного округа – Югры.

Показаны перспективы использования биолюминесцентных методов для экологического мониторинга, оценки токсичности нефтепродуктов, анализа загрязнения почв, качества сельскохозяйственной продукции и разработки технологий контроля эффективности ремедиации нефтезагрязненных экосистем.

Разработанные биолюминесцентные ферментативные системы обладают высокой чувствительностью к изменению компонентного состава исследуемых сред, что определяет перспективы их применения не только в экологическом мониторинге, но и в биомедицинских исследованиях. [7 -11].

Благодарности: Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 24-14-20030 (https://rscf.ru/project/24-14-20030/)

Список литературы

1. Кратасюк В.А. и др. Биолюминесцентные ферментативные биотесты для экологического мониторинга // Актуальные вопросы биологической физики и химии (научный журнал) - Том 10. - № 3 - 2025 - С.221-222
2. Esimbekova, E.N. et al. Design of bioluminescent biosensors for assessing contamination of complex matrices// Talanta - 2021. -V. 233.- N 122509.
3. Есимбекова Е.Н. и др. Ферментативное биотестирование: научные основы и применение // Сибирский экологический журнал – 2021 –Т.28, №3 –С. 365-382.
4. Rimashevskaya A.A. et al. Bioluminescence Inhibition Bioassay for Estimation of Snow Cover in Urbanised Areas within Boreal Forests of Krasnoyarsk City // Forests - 2024, -15, -P.1325.
5. Kolosova, E.M. et al. Bioluminescent-Inhibition-Based Biosensor for Full-Profile Soil Contamination Assessment // Biosensors. - 2022. -V 12. - P. 353.
6. Sutormin O.S. et al. Effects of Oil Contamination on Range of Soil Types in Middle Taiga of Western Siberia. //Sustainability -2024 – V.16 –P.1204.
7. Жукова Г.В. и др. Прогнозирование профессиональной успешности работника в условиях воздействия трудовых нагрузок: новый подход// Физиология человека - 2024, - т. 50, -№5- с. 87-94.
8. Есимбекова Е.Н. и др. Классификация типов взаимодействия пестицидов в смесях: результаты ингибиторного анализа//Доклады Российской академии наук. Науки о жизни.- 2025. -Т. 521.- № 1.- С. 293-298.
9. Esimbekova, E.N. et al. Current and prospective trends in the application of bioluminescent analysis in experimental brain studies// Talanta, -V.296, -1 January 2026, -128510
10. Kirillova M.A et al. Bioluminescent enzymatic biosensors: ways to manage their characteristics // Biophysical Reviews,- 2025.- Vol. 17 – P. 1511-1527.

УДК 577.151.01

ИБУПРОФЕН КАК ИНГИБИТОР ПРОСТАГЛАНДИН-Н-СИНТАЗЫ: ОСНОВНЫЕ КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ДЕТЕКЦИЯ В РАЗЛИЧНЫХ СРЕДАХ

Кривошей А.В., Вржещ П.В.

Международный учебно-научный биотехнологический центр
МГУ имени М.В.Ломоносова, г. Москва, РФ
krivoshey.alexr@gmail.com

Аннотация. В докладе представлена информация об исследовании кинетики ингибирования фермента простагландин-Н-синтазы (PGHS) ибупрофеном. Определены основные кинетические свойства системы (для быстрой стадии – K_i = 13 мкМ; для медленной стадии – время связывания 60 сек, IC_{50} = 1 мкМ), а также проведена детекция ибупрофена биокаталитическим методом в различных средах.

Ключевые слова: циклооксигеназа, НПВП, ибупрофен, ингибирование, кинетика.

Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) активно используются в медицине (лечение острых и хронических заболеваний), в пищевой промышленности (производство продуктов питания животного происхождения) и т.д. Широкая распространённость НПВП способствует их накоплению в окружающей среде. Всё это приводит к необходимости детекции НПВП в различных средах организма (сыворотка крови, грудное молоко, моча, волосы и др.), в кормах для животных, в тканях и жидкостях животного происхождения (молоко, кровь и др.), а также в природных средах (почва, речной ил и др.). Однако современные методы определения НПВП (жидкостная и газовая хроматография, масс-спектрометрия, спектрофотометрия, флуориметрия) индивидуальны для каждого вещества вследствие их различной химической природы. Например, оптические методы далеко не всегда подходят для детекции НПВП из-за свойств среды, в которой они растворены. Кроме того, концентрация НПВП в той или иной среде далеко не всегда коррелирует с их биологической активностью. Таким образом, разработка универсальной методики определения НПВП, применимой в рутинной лабораторной, клинической и производственной практике, является очень актуальной задачей.

Одним из возможных вариантов решения этой задачи является биокаталитический метод определения НПВП, а именно – детекция лекарственного препарата по его воздействию на фермент простагландин-Н-синтазу (PGHS). Фермент PGHS (К.Ф. 1.14.99.1; другое название – циклооксигеназа) является ключевым звеном синтеза простагландинов из арахидоновой кислоты (АА). PGHS катализирует две последовательные реакции – циклооксигеназную и пероксидазную. Фермент является биологической мишенью действия НПВП в организме млекопитающих, т.к. эти препараты ингибируют его циклооксигеназную активность [1].

В настоящей работе мы исследовали кинетику взаимодействия PGHS с одним из представителей НПВП – ибупрофеном. Для экспериментов использовали фермент PGHS-1 из везикулярных желёз барана. Циклооксигеназную реакцию (COX) детектировали амперометрическим методом по изменению концентрации растворённого кислорода. Измерения проводили при 25ºС в соответствующей реакционной системе: 50 мМ трис-HCl, pH = 8.0, 0.1% твин-20 (v/v), 1 мМ ферроцианида калия, 2 мкМ гемина (хлорида феррипротопорфирина IX), 270 мкМ кислорода. Концентрация АА – 100 мкМ (см. рисунки 1-2) или варьировалась (для определения K_i). Реакцию инициировали добавлением АА (см. рисунки 1-2) или добавлением фермента (для определения K_i). Концентрации ибупрофена варьировались для различных экспериментов. Полученные зависимости концентрации кислорода от времени анализировали с помощью программного пакета Origin.

Мы показали, что взаимодействие PGHS с ибупрофеном описывается двухстадийным механизмом с быстрой и медленной стадиями, аналогично другим ингибиторам [2]. Для быстрой стадии подтвер-

дили конкурентный тип ингибирования (данные не приведены). Получены значения константы Михаэлиса для субстрата (АА; K_M = 11 мкМ) и константы ингибирования для ибупрофена (K_i = 13 мкМ).

Медленную стадию детектировали по варьированию времени инкубации фермента с ибупрофеном для различных концентраций ингибитора (рисунок 1а) и по варьированию концентрации ингибитора при времени инкубации, достаточном для достижения практического равновесия (рисунок 1б).

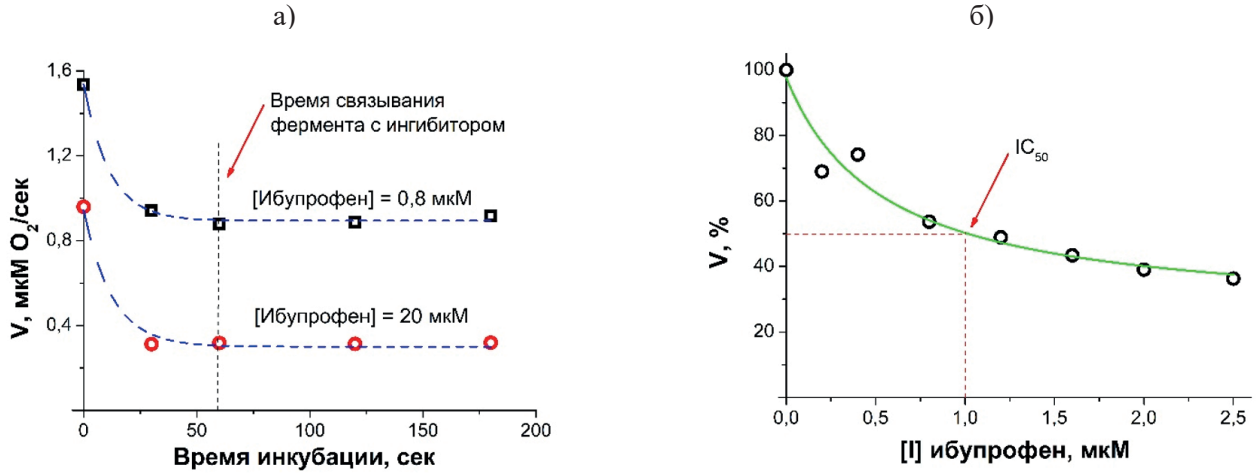


Рисунок 1а – Зависимость начальной скорости COX от времени инкубации фермента с ингибитором для 0.8 мкМ и 20 мкМ ибупрофена.

Рисунок 1б – Зависимость относительной скорости COX от концентрации ибупрофена (время прединкубации фермента с ингибитором составляет 60 сек).

Показано, что прединкубация в течение 60 сек является достаточной для практически полного связывания фермента с ингибитором (рисунок 1а). Эксперименты по варьированию концентрации ингибитора при 60 сек прединкубации показали, что значение IC_{50} для медленной стадии ингибирования ибупрофеном составляет 1 мкМ (рисунок 1б).

Далее было проверено, как состав среды, в которой растворяли ибупрофен перед добавлением в реакционную систему, влияет на ингибирование фермента (рисунок 2; время прединкубации фермента с ингибитором – 60 сек).

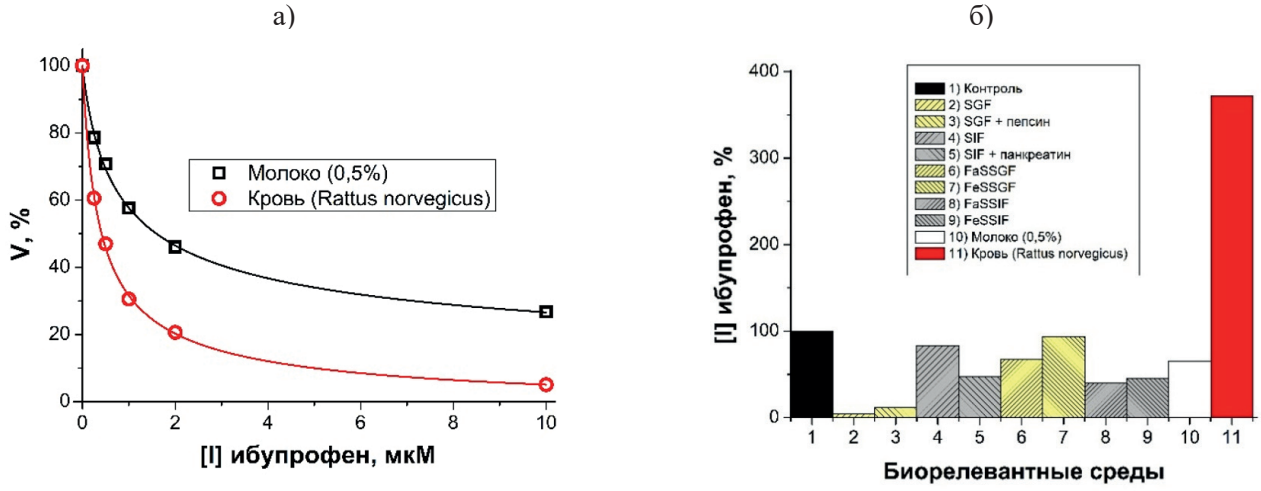


Рисунок 2а – Зависимость относительной скорости COX от концентрации ибупрофена в средах животного происхождения (1 – коровье молоко 0.5% жирности, 2 – кровь из организма крысы (Rattus norvegicus)). Концентрации ибупрофена рассчитывались по навеске.

Рисунок 2б – Концентрация ибупрофена в биорелевантных средах, рассчитанная биокаталитическим методом (по ингибированию PGHS). 1 – контрольная среда (50 мМ трис-HCl, pH = 8.0; концентрация принималась за 100%). 2 – SGF (модельный желудочный сок). 3 – SGF с пепсином. 4 – SIF (модельный кишечный сок). 5 – SIF с панкреатином. 6 – FaSSGF (модельный желудочный сок натощак). 7 – FeSSGF (модельный желудочный сок после приёма пищи). 8 – FaSSIF (модельный кишечный сок натощак). 9 – FeSSIF (модельный кишечный сок после приёма пищи). 10 – молоко 0.5%. 11 – крысиная кровь.

Объёмы аликвот с ингибитором, добавляемых в реакционную систему (рисунок 2), подбирали так, чтобы влияние среды, в которой растворяли ингибитор, на активность PGHS было минимальным. Видно, что если перед добавлением в реакционную систему ибупрофен растворять в крысиной крови, то эффект ингибирования проявляется значительно сильнее, чем при растворении ибупрофена в молоке (рисунок 2а). Далее мы определяли концентрации ингибитора биокаталитическим методом (т.е. по его биологической активности) при растворении ибупрофена в других биорелевантных средах (рисунок 2б). С помощью градуировочной кривой (рисунок 1б) рассчитывали концентрацию ингибитора в реакционной системе по измеренной относительной скорости реакции, и далее определяли концентрации ингибитора в исходных аликвотах (концентрации по навеске в этих пробах совпадали).

Очевидно, что описанный метод является достаточно универсальным, и его можно применять для других ингибиторов и различных сред сложного состава.

Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета.

Список литературы

1. Vane J.R., Botting R.M. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action // Inflammation Research. – 1998. – Vol. 47. – P. 78-87.

2. Callan O.H., So O.Y., Swinney D.C. The kinetic factors that determine the affinity and selectivity for slow binding inhibition of human prostaglandin H synthase 1 and 2 by indomethacin and flurbiprofen // Journal of Biological Chemistry. – 1996. – Vol. 271. – No. 7. – P. 3548-3554.

УДК: 547.42 + 571.27

ДИЗАЙН МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В СЕНСОРАХ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ГРИБКОВЫХ ПАТОГЕНОВ

Крылов В.Б., Кузнецов А.Н., Юдин В.И., Титова А.Д., Нифантьев Н.Э.

Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук
v_krylov@ioc.ac.ru

Аннотация. В последние десятилетия грибковые инфекции стали глобальной угрозой, превышающей по уровню смертности туберкулез и малярию. Современные методы выявления микозов характеризуются недостаточной чувствительностью и специфичностью, что обусловливает необходимость разработки новых диагностических платформ. В работе рассмотрен дизайн моноклональных антител для выявления грибковых патогенов. Для их получения использованы синтетические олигосахаридные антигены, родственные фрагментам β-глюкана, маннана и галактоманнана. Показано, что полученные антитела обладают высокой селективностью и перспективны для применения в сенсорных системах диагностики грибковых инфекций.

Ключевые слова: моноклональные антитела, грибковые инфекции, биосенсоры, олигосахариды, полисахариды клеточной стенки.

За последние десятилетия грибковые инфекции стали глобальной угрозой, превосходящей туберкулез и малярию по уровню смертности. По данным более чем из 120 стран, ежегодно регистрируется около 6,5 млн случаев инвазивных грибковых инфекций, из которых почти 3,8 млн заканчиваются летальным исходом [1]. Несмотря на высокую потребность в ранней диагностике микозов, существующие лабораторные методы выявления грибковых патогенов остаются недостаточно чувствительными и специфичными. Это обусловливает актуальность разработки новых высокочувствительных сенсорных систем, способных распознавать грибковые маркеры в ультранизких концентрациях.

Наиболее распространёнными методами диагностики грибковых инфекций являются иммуноферментный анализ (ИФА) и иммунохроматографический анализ (ИХА). Однако эффективность таких систем во многом ограничена качеством используемых антител. Традиционно антитела получают с использованием природных полисахаридов грибов, обладающих высокой структурной гетерогенностью, вариабельностью состава и широким диапазоном молекулярных масс. Кроме того, структура распознаваемых эпитопов во многих случаях остаётся неизвестной [2, 3].

Перспективным подходом к решению данной проблемы является применение синтетических углеводных олигосахаридов с точно заданной структурой, имитирующих определённые фрагменты грибковых полисахаридов [4, 5]. Использование таких соединений позволяет проводить рациональный дизайн антител с заранее определённой специфичностью к целевым маркерным структурам.

В настоящей работе рассматривается разработка моноклональных антител, позволяющих распознавать ключевых компоненты клеточной стенки грибов, включая β-(1→3)-глюкан, β-(1→6)-глюкан, маннан и галактоманнан. На первом этапе проводился анализ современных представлений об архитектуре грибковых полисахаридов и выбор наиболее перспективных маркерных структур. Далее осуществлялся синтез целевых олигосахаридных последовательностей и соответствующих конъюгатов, включающих иммуногены, антигены для ИФА и синтетические миметики природных полисахаридов. Получение моноклональных антител проводили с использованием гибридомной технологии. Для характеристики их свойств применяли комплекс иммунологических и физико-химических методов, позволяющих оценить аффинность и селективность связывания. Полученные антитела продемонстрировали высокую эффективность распознавания клинически значимых грибковых патогенов, включая *Candida albicans, Aspergillus fumigatus, Cryptococcus neoformans u Malassezia furfur.*

Таким образом, сочетание структурного анализа грибковых полисахаридов, методов органического синтеза, иммунологии и биотехнологии позволяет создавать высокоспецифичные моноклональные антитела для детекции грибковых маркеров. Разработанные подходы открывают перспективы для создания новых диагностических систем, в том числе основанных на принципах нанофотоники и электрохимии, обеспечивающих раннее и высокоточное выявление грибковых инфекций.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (FFZZ-2024-0004, соглашение № 075-03-2024-401/3 от 30 мая 2024 года).

Список литературы

1. Denning D.W. Global incidence and mortality of severe fungal disease // Lancet Infectious Diseases. – 2024. – Vol. 24. – No. 7. – P. E428–E438.
2. Krylov V.B., Solovev A.S., Puchkin I.A., Yashunsky D.V., Antonets A.V., Kutsevalova O.Y., Nifantiev N.E. Antibodies to fungal polysaccharides: specificity and diagnostic potential // Journal of Fungi. – 2021. – Vol. 7. – No. 6. – P. 504.
3. Krylov V.B., Solovev A.S., Argunov D.A., Latgé J.P., Nifantiev N.E. Structural aspects of fungal polysaccharides in immunodiagnostics // Heliyon. – 2019. – Vol. 5. – Art. e01173.
4. Gening M.L., Polyanskaya A.V., Kuznetsov A.N., Titova A.D., Yudin V.I., Yashunsky D.V., Tsvetkov Y.E., Yudina O.N., Krylov V.B., Nifantiev N.E. Synthetic oligosaccharides for generation of antifungal antibodies // Biochemistry (Moscow). – 2024. – Vol. 89. – P. 2070–2080.
5. Matveev A.L., Krylov V.B., Khlusevich Y.A., Baykov I.K., Yashunsky D.V. Synthetic carbohydrate antigens in fungal diagnostics // PLoS ONE. – 2019. – Vol. 14. – No. 5. – Art. e0215535.

УДК 577.2

КЛИНИКО-БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ЭФФЕКТОВ МУТАЦИЙ ГЕНА *ACE*

Буянова А.А. [1], **Крюкова О.В.**[2], **Репинская Ж.А.**[1]

[1] *Лаборатория геномики, ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России*
[2] *Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ*
anastasiiabuianova97@gmail.com

Аннотация. Варианты гена *ACE* влияют на концентрацию АПФ в крови и могут быть факторами риска болезни Альцгеймера. У 43 носителей 32 мутаций выявлено снижение уровня АПФ для 12 мутаций (<80%) и повышение для 11 (>120%). Мутации K126N и V394M дестабилизируют белок, C928S нарушает дисульфидную связь.

Ключевые слова: ангиотензин превращающий фермент (АПФ), шеддинг, *in silico* анализ, болезнь Альцгеймера, ProtScale, ген *ACE*.

Уровень ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) в крови у носителей различных мутаций в гене *ACE* был определён в наших предыдущих исследованиях [1-4]. Наибольший интерес представляли мутации, приводящие к снижению концентрации АПФ, так как подобные генетические варианты рассматриваются как потенциальные факторы риска развития болезни Альцгеймера. Однако влияние мутаций в гене *ACE* на функцию белка все еще остаётся малоизученным, особенно в отношении расположенных за пределами каталитического центра. Цель работы – расширить представление об этих эффектах, выполнив оценку патогенности с использованием вычислительных (*in silico*) алгоритмов.

В работе мы определили уровень АПФ в ЭДТА-плазме крови 43 носителей 32 различных мутаций в гене *ACE* (рис. 1) методом иммуносорбции [1]. Контрольную группу составили индивиды из той же выборки, не имеющие мутаций в гене *ACE*. Для 12 мутаций выявлено снижение уровня АПФ ниже 80% от нормы, что указывает на нарушение процессинга, отщепления или транспорта белка. Для 11 вариантов показатель превышал 120%, что может свидетельствовать о более активном шеддинге.

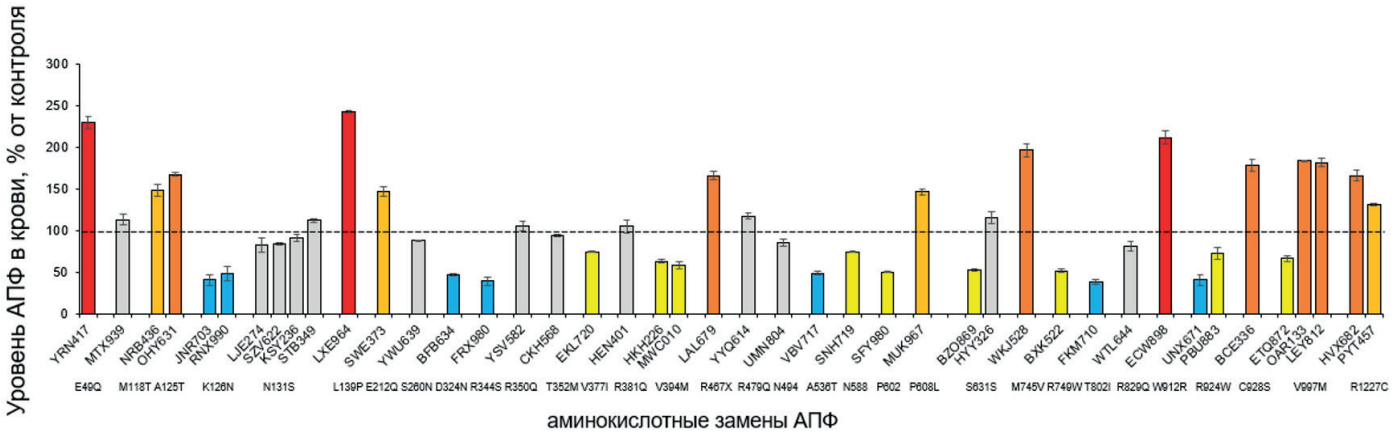


Рис.1 Уровень АПФ в ЭДТА-плазме крови носителей разных мутаций в гене *ACE*.

Белок АПФ осаждали из плазмы крови с ЭДТА с помощью моноклонального антитела 9B9, после чего его активность количественно определяли флуорометрически с использованием cbz-Phe-His-Leu в качестве субстрата [1-4]. Уровни АПФ представлены как среднее ± стандартное отклонение результатов нескольких независимых измерений образцов. Данные выражены в % от уровня АПФ, соответствующего значению в контрольной объединённой плазме доноров без мутаций АПФ. Оранжевые и темно оранжевые столбцы обозначают образцы с уровнем АПФ >120% и >150% от контроля соответ-

ственно. Жёлтые и синие столбцы – образцы с уровнем АПФ <80% и <50% от контроля соответственно. Серые столбцы – уровень АПФ в диапазоне от 80% до 120% от контрольных значений. Пунктирной линией отмечен контрольный базовый уровень 100%.

Среди всех мутаций наибольший интерес представляли три: K126N и V394M, ассоциированные с выраженным снижением уровня АПФ, а также C928S (приводит к разрушению дисульфидной связи [5]) (АПФ 178±7% от нормы). Был выполнен анализ изменений локальных физико-химических свойств мутантных белков с использованием онлайн-сервиса ProtScale [6]. Расчёты проводили с параметрами по умолчанию при размере окна 9 аминокислотных остатков (а.о.). Оценивали следующие характеристики: гидрофобность (шкала Kyte & Doolittle), предрасположенность к формированию элементов вторичной структуры (шкала Chou & Fasman), доступность остатков для растворителя и гибкость полипептидной цепи. Установлено, что мутация K126N приводит к локальному повышению гидрофильности на 0,4 ед., снижению склонности к образованию α-спирали на 0,49 ед. и уменьшению доступности остатков на 0,40 ед. Эти изменения дестабилизируют вторичную структуру и нарушают укладку белка, что объясняет снижение концентрации АПФ в крови. При мутации V394M происходит падение гидрофобности на 2,3 ед., резкое уменьшение предрасположенности к образованию β-листов (на 0,65 ед. в позиции 423) и снижение доступности остатков. Совокупность этих эффектов нарушает нативную укладку белка, что также ведёт к снижению уровня АПФ. В случае мутации C928S гидрофобность в позиции замены снижается на 3,3 ед., что означает переход от слабогидрофобного цистеина к гидрофильному серину. В окрестности 9 а.о. выявлены снижение гидрофобности на 0,367 ед., увеличение доступности остатков на 0,945 ед. и повышение средней гибкости на 0,018 ед. Это указывает на локальное «разрыхление» С-концевой области, вероятную потерю дисульфидного мостика и облегчение шеддинга, чем может объясняться повышенная концентрация АПФ в крови. Согласно корреляционному анализу Спирмена, связи между уровнем АПФ и результатами предсказаний патогенности (AlphaMissense, MetaRNN, EVE) не выявлено (для всех сравнений $p > 0,05$). Однако после преобразования уровней АПФ в абсолютную величину логарифмического отклонения от ближайшей границы нормы ($|\log_2(АПФ/80)|$ для значений ниже 80%, $|\log_2(АПФ/120)|$ для значений выше 120%, 0 для диапазона 80-120%) и рангового преобразования «3 – патогенный, 2 – неясного значения, 1 – доброкачественный» обнаружена значимая корреляция с предсказаниями EVE ($r = 0,52$; $p = 0,005$). Полученные данные расширяют понимание функциональной значимости редких вариантов гена *ACE* и могут быть использованы для уточнения риска развития ассоциированных сосудистых и нейродегенеративных состояний.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова, регистрационный номер 121041500039-8.

Список литературы

1. Kryukova O.V. et al. Effects of Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE) Mutations Associated with Alzheimer's Disease on Blood ACE Phenotype // Biomedicines. – 2024. – Vol. 12. – Art. 2410.
2. Kryukova O.V. et al. Effect of *ACE* Mutations on Blood ACE Phenotype Parameters // PLoS ONE. – 2024. – Vol. 19. – No. 10. – Art. e0308289.
3. Mironenko I.V. et al. ACE-Dependent Alzheimer's Disease: Circulating ACE Phenotypes in Heterozygous Carriers of Rare *ACE* Variants // International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – Vol. 26. – Art. 9099.
4. Buianova A.A. et al. ACE-Dependent Alzheimer's Disease: Blood ACE Phenotyping of the Most Prevalent and Damaging *ACE* Missense Mutation—Y215C (rs3730025) // Biomedicines. – 2026. – Vol. 14. – Art. 275.
5. Sturrock E.D. et al. Assignment of free and disulfide-bonded cysteine residues in testis angiotensin-converting enzyme: functional implications // Biochemistry. — 1996. — Vol. 35, No. 29. — P. 9560-9566. — doi: 10.1021/bi960243x.
6. ProtScale. URL: https://web.expasy.org/protscale/; дата обращения: 21.04.2026.

УДК 575.174

ЯВЛЯЕТСЯ ЛИ ПРОТЕИНАЗА ADAMTS13 СЕКРЕТАЗОЙ АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА?

Крюкова О.В.[1], Кост О.А.[1], Мироненко Я.В.[2], Чуров А.В.[2]

[1] Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
[2] Институт Изучения Старения, ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, ОСП «Российский геронтологический научно-клинический центр», Москва
so.b11onde@gmail.com

Аннотация. У части носителей мутаций в гене ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) уровень фермента в крови не соответствует ожидаемому, что может быть обусловлено мутациями в генах возможных секретаз АПФ. С целью идентификации потенциальных секретаз АПФ мы провели определение уровня АПФ в ЭДТА-плазме крови у 30 носителей 10 мутаций в гене ADAMTS13. Систематического влияния мутаций ADAMTS13 на уровень АПФ в крови не обнаружено. Гетерогенность эффектов мутаций ADAMTS13 не позволяет рассматривать ее как универсальную секретазу АПФ.

Ключевые слова: ангиотензин-превращающий фермент (АПФ), болезнь Альцгеймера (БА), ADAMTS*13*, секретаза АПФ, гетерогенность.

В предыдущих работах [1-4] мы показали, что уровень АПФ в крови существенно снижен у части носителей мутаций в гене АПФ, особенно у носителей мутации Y215C, ассоциированной с болезнью Альцгеймера (БА). Изначально мы рассматривали их как группу повышенного риска АПФ-зависимой БА на основании измерений АПФ в крови [2]. Хотя уровень АПФ в крови обычно отражает тканевую экспрессию фермента [5-6], в нашем последнем исследовании на 84 носителях мутации Y215C резкое снижение АПФ выявлено только у 63% из них [7]. Причина такой гетерогенности может быть в том, что у разных носителей мутации Y215C присутствуют дополнительные мутации, которые могут влиять на уровень АПФ, например, мутации в гене потенциальной (пока не идентифицированной) секретазы АПФ. Следовательно, для оценки риска БА необходимо напрямую измерять уровень АПФ в крови, а не полагаться только на наличие мутации Y215C, иначе можно получить ложные результаты. Интенсивный поиск предполагаемой(ых) секретазы(аз) АПФ проводился ещё в 1990-х годах (обзор [8]), но эта работа не привела к открытию данного фермента. Поэтому для поиска потенциальной секретазы нами был произведен углубленный анализ данных, предоставленных исследователями из компании deCODE genetics (Исландия). Эти авторы секвенировали геномы 35 559 исландцев и измерили концентрацию более 4900 аналитов (включая АПФ) в их крови с использованием технологии SomaScan (аптамеры) [9]. Полученные данные включали корреляцию между уровнями АПФ в крови и мутациями в 20 000+ генах человеческого генома. Однако на основании этой корреляции нам не удалось однозначно выявить секретазу АПФ, но мы составили список из 25 наиболее возможных кандидатов [7]. Интересно, что исследование, проведенное на клеточной модели HEK293 (эмбриональные клетки почки человека), показало, что мутация R421C в гене ADAMTS13 приводит не только к выраженному снижению активности фермента до 24%, а уровень АПФ до 22% от контроля [10]. Таким образом ADAMTS13 могла быть из возможных кандидатов на роль секретазы АПФ.

В работе мы определили уровень АПФ в ЭДТА-плазме крови 30 носителей 10 различных мутаций в гене ADAMTS13 (Рис.1) в сравнении с контрольной группой той же выборки, но без мутации в генах АПФ и ADAMTS13. Систематического влияния мутаций ADAMTS13 на уровни АПФ обнаружено не было, даже среди семи носителей одной мутации R421C. Четыре из них продемонстрировали

значительное снижение уровня АПФ, тогда как у трёх других наблюдалось его резкое повышение. При мутации P457L снижение АПФ в крови наблюдалось у двух из трёх доноров. Мутация P618A (восемь образцов): у двух уровень АПФ был понижен, у трёх — повышен. Среди шести носителей мутации A1033E только один демонстрировал пониженный уровень АПФ, тогда как у двух он был повышен. Таким образом, гетерогенность эффектов мутаций ADAMTS13 не позволяет рассматривать ее как универсальную секретазу АПФ.

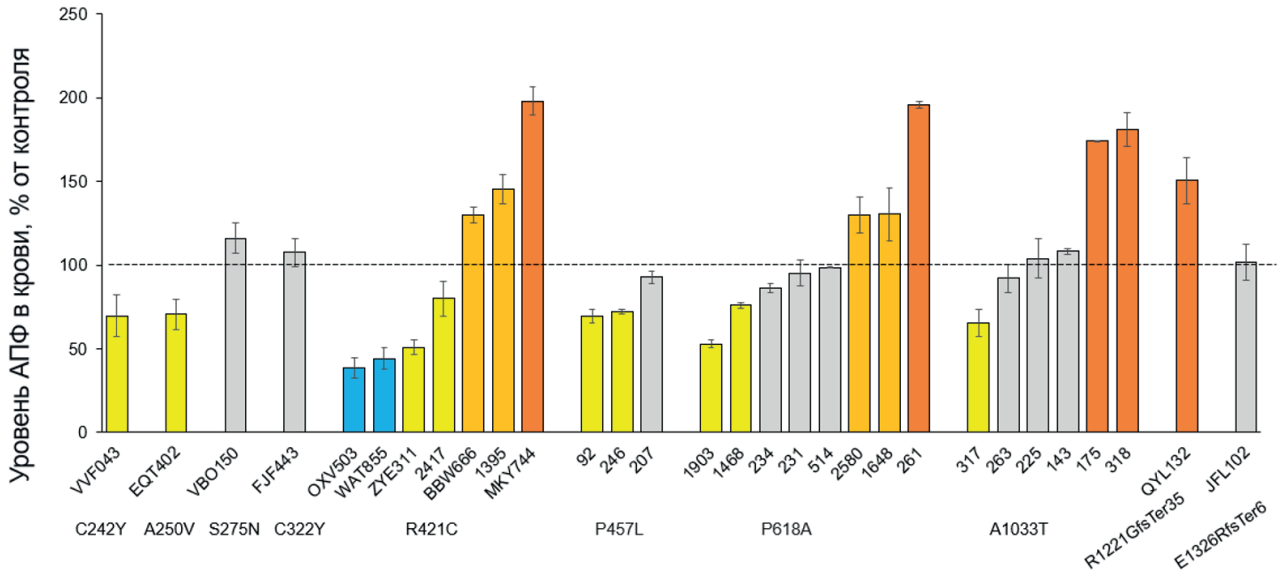


Рис.1. Уровень АПФ в ЭДТА-плазме крови носителей разных мутаций в гене ADAMTS13. Белок АПФ осаждали из плазмы крови с ЭДТА с помощью моноклонального антитела 9B9, после чего его активность количественно определяли флуорометрически с использованием cbz-Phe-His-Leu в качестве субстрата [1-4]. Уровни АПФ представлены как среднее ± стандартное отклонение результатов нескольких независимых измерений образцов. Данные выражены в % от уровня АПФ, соответствующего значению в контрольной объединённой плазме доноров без мутаций АПФ. Оранжевые и темно оранжевые столбцы обозначают образцы с уровнем АПФ >120% и >150% от контроля соответственно. Жёлтые и синие столбцы — образцы с уровнем АПФ <80% и <50% от контроля соответственно. Серые столбцы — уровень АПФ в диапазоне от 80% до 120% от контрольных значений. Пунктирной линией отмечен контрольный базовый уровень 100%.

Одна и та же мутация по-разному влияет на уровень АПФ в крови. Это подтверждает, что для оценки риска болезни Альцгеймера важнее измерять сам уровень АПФ (фенотип), а не просто смотреть на наличие мутации (генотип). Уровень АПФ складывается из множества генетических вариантов, поэтому он и должен быть главным показателем риска. Мутации в гене АПФ имеет смысл анализировать только вместе с другими мутациями и с реальным уровнем АПФ в крови. Полученные в работе данные не позволяют подтвердить ADAMTS13 как однозначную секретазу АПФ.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова, регистрационный номер 121041500039-8.

Список литературы

1. Kryukova O.V. et al. Effects of Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE) Mutations Associated with Alzheimer's Disease on Blood ACE Phenotype // Biomedicines. – 2024. – Vol. 12. – Art. 2410.
2. Kryukova O.V. et al. Effect of ACE Mutations on Blood ACE Phenotype Parameters // PLoS ONE. – 2024. – Vol. 19. – No. 10. – Art. e0308289.

3. Korf E.A. et al. ACE-Dependent Alzheimer's Disease: Further Assessment of the Impact of ACE Mutations on Blood ACE Levels // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. – 2025. – Vol. 1871. – Art. 167817.
4. Mironenko I.V. et al. ACE-Dependent Alzheimer's Disease: Circulating ACE Phenotypes in Heterozygous Carriers of Rare ACE Variants // International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – Vol. 26. – Art. 9099.
5. Costerousse O. et al. Angiotensin I-Converting Enzyme in Human Circulating Mononuclear Cells: Genetic Polymorphism of Expression in T-Lymphocytes // Biochemical Journal. – 1993. – Vol. 290. – P. 33–40.
6. Danser A.H.J. et al. Angiotensin-Converting Enzyme in the Human Heart: Effect of the Deletion/Insertion Polymorphism // Circulation. – 1995. – Vol. 92. – P. 1387–1388.
7. Buianova A.A. et al. ACE-Dependent Alzheimer's Disease: Blood ACE Phenotyping of the Most Prevalent and Damaging ACE Missense Mutation—Y215C (rs3730025) // Biomedicines. – 2026. – Vol. 14. – Art. 275.
8. Parkin E. et al. Secretase-Mediated Cell Surface Shedding of the Angiotensin-Converting Enzyme // Protein and Peptide Letters. – 2004. – Vol. 11. – P. 423–432.
9. Ferkingstad E. et al. Large-Scale Integration of the Plasma Proteome with Genetics and Disease // Nature Genetics. – 2021. – Vol. 53. – P. 1712–1721.
10. Pagliari M.T. et al. Next-Generation Sequencing and In Vitro Expression Study of ADAMTS13 Single Nucleotide Variants in Deep Vein Thrombosis // PLoS ONE. – 2016. – Vol. 11. – No. 11. – Art. e0165665.

УДК 577.15:615.015

РАЗРАБОТКА ЛИПОСОМАЛЬНОЙ КОМПОЗИЦИИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ ТАРГЕТНОГО ДЕЙСТВИЯ ВНУТРИ РАКОВЫХ КЛЕТОК

Кудряшова Е.В.[1,2]

[1] *Центральный университет, г. Москва, РФ*
[2] *Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ*
helenakoudriachova@yandex.ru

Аннотация. Цель работы - изучение механизмов действия L-аспарагиназы и ее ограничений, рассмотрение роли полиаминов и PTS в лейкозных клетках, анализ исследований по конъюгации L-аспарагиназы с полиаминами и ее влияния на поглощение и цитотоксичность, оценка потенциальных преимуществ и недостатков данного подхода, а также определение направлений для дальнейших исследований в этой области.

Ключевые слова: липосомы, специфические лиганды, рецепторы раковых клеток, аргиназа, аспарагиназа, эндоцитоз, противоопухолевая эффективность, иммуногенность.

Раковые клетки, в отличие от здоровых, неспособны самостоятельно синтезировать ряд аминокислот, аспарагин, аргинин, метионин, серин, гистидин и фенилаланин и ряд др. и поэтому они критически зависимы от импорта этих незаменимых аминокислот из внешней среды. Так, L-Аспарагиназы (АСП) –известный класс противораковых препаратов первой линии терапии острого лимфобластного лейкозы (ОЛЛ). Аспарагиназы расщепляют аспарагин в системном кровотоке, что приводит к метаболическому шоку и апоптозу лейкозных клеток.

Несмотря на значительные успехи, применение L-аспарагиназы в клинической практике сопряжено с рядом проблем и ограничений. Существующие противоопухолевые ферменты (в том числе, ПЭГилированные) неоптимальны из-за проблем с переносимостью – чужеродный для человека белок. АСП в системном кровотоке вызывает иммунную реакцию. В итоге терапию приходится прерывать преждевременно, либо переходить на суб-оптимальные дозировки. Требуется разработке новых подходов, направленных на повышение эффективности и снижение токсичности L-аспарагиназы.

Исследуя мутантные и нативные ферменты с противоопухолевой активностью, из разных источников, в первую очередь, аспарагиназы (АСП) и аргиназы (АРГ), мы обнаружили, что аномально высокую противораковую активность проявляют ферменты, имеющие большую склонность интернализироваться внутрь раковых клеток.

В последние годы значительное внимание исследователей привлекают полиамины – небольшие органические молекулы, такие как путресцин, спермидин и спермин, которые играют важную роль в регуляции клеточного роста, пролиферации и метаболизма, в том числе и в раковых клетках. В раковых клетках часто наблюдается повышенный уровень полиаминов и активности ферментов, участвующих в их синтезе. Полиаминная транспортная система (PTS) представляет собой клеточный механизм, обеспечивающий поглощение полиаминов из внеклеточной среды, и ее активность также часто бывает значительно повышена в раковых клетках, включая лейкозные. Повышенная активность PTS в раковых клетках может быть использована для адресной доставки противоопухолевых препаратов, конъюгированных с полиаминами, непосредственно в опухолевые клетки. Дисрегуляция метаболизма полиаминов и повышенная экспрессия PTS в раковых клетках делают эту систему привлекательной мишенью для разработки новых терапевтических стратегий в онкологии.

Нам удалось найти способ усилить способность ферментов проникать внутрь раковых клеток с использованием специфических лигандов к рецепторам, которые сверх-экспрессированы на лейкозных

клетках, такие как рецепторы Полиамин транспортной системы (ПТС), гепариновый рецептор, рецептор гиалуроновой кислоты (CD44). Мы показали, что интернализация ферментных препаратов в раковые клетки за счет рецепторного эндоцитоза повышает селективность и эффективность их действия, снижая при этом иммуногенность.

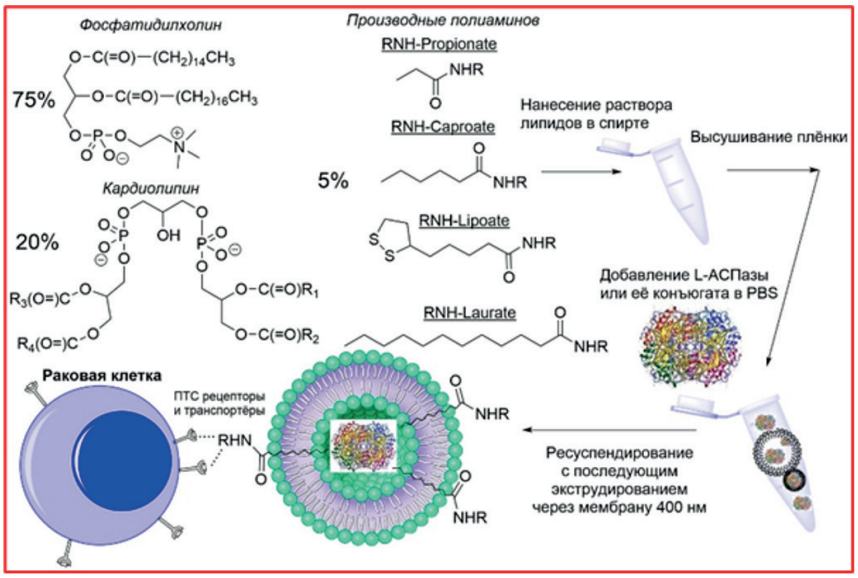


Рисунок 1. Таргетные липосомальные системы доставки противоопухолевых ферментов со специфическими лигандами к рецепторам полиамин транспортной системы (ПТС)

Кроме того, мы продемонстрировали, что действие Аспарагиназы в композиции с Аргиназой приводит к синергетическому повышению противоопухолевой активности, что лежит в основе разработки высокоэффективных противоопухолевых препаратов нового поколения.

Расщеплять незаменимые для раковых клеток аминокислоты не в системном кровотоке, а там, где это на самом деле нужно – внутри раковых клеток – это перспектива значительно повысить специфичность, эффективность и переносимость противораковой терапии. Используя разработанный подход таргетных липосомальных формуляций продемонстрирована возможность и целесообразность применения комбинации синергетически действующих ферментов. Двойной подход показал высокую эффективность в экспериментах на клетках лимфомы человека. Противораковая активность новой системы оказалась на порядок выше, чем у контрольных систем (свободных ферментов). С помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии продемонстрировано, что липосомы, подобно троянскому коню, проникают в раковые клетки и высвобождают фермент, который сохраняет активность внутри клеток. Разработанный подход создает научные основы создания высокоэффективного и безопасного противолейкозного препарата нового поколения.

Список литературы

1. Zlotnikov, I.D.; Ezhov, A.A.; Borisov, A.V.; Lukyanov, A.V.; Babkov, D.A.; Kudryashova, E.V. Liposomal Formulations of L-Asparaginase Conjugated with Cationic Polymers for Enhanced Internalization into Cancer Cells. Macromol. 2025, 5, 54. https://doi.org/10.3390/ macromol5040054

2. Zlotnikov I.D., Ezhov A.A., Dobryakova N.V., Kudryashova E.V. Disulfide cross-linked polymeric redox-responsive nanocarrier based on heparin, chitosan and lipoic acid improved drug accumulation, increased cytotoxicity and selectivity to leukemia cells by tumor targeting via “Aikido” principle. GELS, 2024 DOI: 10.3390/gels10030157

3. Zlotnikov I.D., Kudryashova E V. Targeted Polymeric Micelles System, Designed to Carry a Combined Cargo of L-Asparaginase and Doxorubicin, Shows Vast Improvement in Cytotoxic Efficacy, Polymers, 2024 DOI: 10.3390/polym16152132

УДК 577.352.2:615.277.3

ФОЛАТ-КОНЪЮГИРОВАННЫЕ КАТИОННЫЕ ЛИПОСОМЫ ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ ДОСТАВКИ ДОКСОРУБИЦИНА

Куликова Д.И.[1, 2], Гилева А.М.[1, 2], Колоскова О.О.[3], Шмендель Е.В.[4], Себякин Ю.Л.[4], Дроздова М.Г.[1], Клячко Н.Л.[5], Марквичева Е.А.[1]

[1] ГНЦ ФГБУН Институт биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, г. Москва, РФ
[2] Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, г. Москва, РФ
[3] ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, г. Москва, РФ
[4] Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова РТУ МИРЭА, г. Москва, РФ
[5] Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
dk.2003lll@mail.ru

Аннотация. Цель работы – получение и изучение катионных фолат-конъюгированных липосом (FLp) для таргетной доставки доксорубицина (DOX). В докладе представлено исследование и сравнение физико-химических параметров и цитотоксичности нескольких FLp, полученных с использованием двух разных методов.

Ключевые слова: катионные липосомы, фолиевая кислота, доксорубицин, клетки HeLa, цитотоксичность, таргетная доставка.

Липосомы получали двумя методами, различающиеся механизмами встраивания фолатных лигандов (5 % масс.) в липидную основу (95 % масс.) (Рисунок 1): (А) классическая методика гидратации тонкой липидной пленки (FLp-ТП), состоящей из смеси обычных (без лигандов) и фолат-конъюгированных липидов (Рисунок 1А). При этом часть лигандов попадает во внутреннюю полость липосомы и уменьшает внутренний объем, необходимый для инкапсулирования препаратов; (Б) метод пост-модификации, основанный на реакциях «click»-химии (FLp-ПМ): сначала получают «базовые» липосомы, загруженные препаратом, а затем модифицируют их поверхность лигандами (Рисунок 1Б).

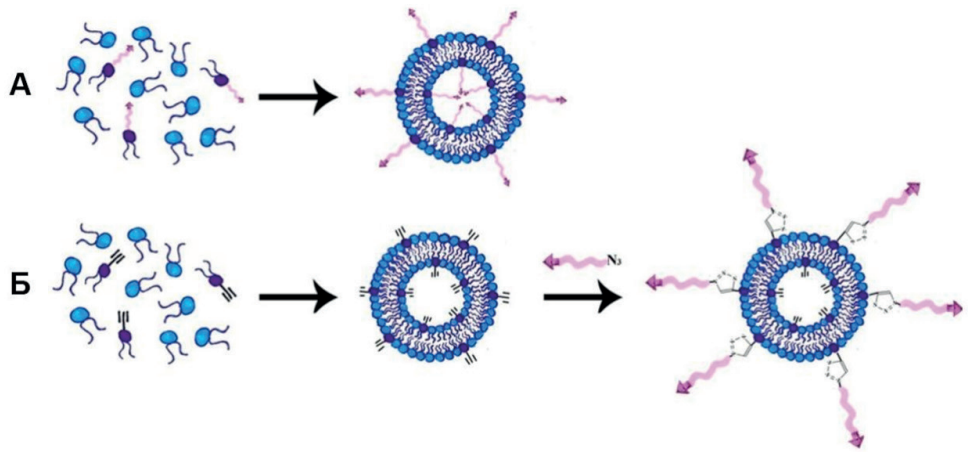


Рисунок 1. Методы формирования фолат-конъюгированных липосом:
А – метод гидратации тонкой липидной пленки, Б – метод пост-модификации.

Методом А были синтезированы катионные липиды без лигандов – катионный липопептид (1) и смесь поликатионного амфифила (2) с фосфолипидом диолеоилфосфатидилэтаноламином (DOPE; 1:2, % масс.), а также два фолат-конъюгированных липида – производное (3) на основе глицерина и фолиевой кислоты; производное (4) на основе липопептида (1), ПЭГ и фолиевой кислоты.

Методом Б в липопептид (1) был введен линкерный участок с активными группами, содержащими концевую тройную связь. На основе этого липопептида получали «базовые» липосомы, поверхность которых затем модифицировали аналогом фолат-конъюгированного липида (4), содержащим азидопропильные фрагменты.

Таким образом, было получено четыре образца липосом, загруженных DOX: три образца FLp-ТП получены методом гидратации тонкой липидной пленки и один образец FLp-ПМ был получен методом пост-модификации. Все полученные FLp были загружены DOX (40 % масс.), эффективность загрузки составила 91–95 % для всех образцов. Физико-химические параметры FLp представлены в Таблице 1. Липосомы без лигандов (Lp), полученные из DOPE (100 % масс.) – контроль.

Таблица 1. Физико-химические параметры фолат-конъюгированных липосом.

Образец и метод получения	**Липидный состав, % масс.**	**Средний диаметр, нм**	**PDI**	**ζ-потенциал, мВ**
FLp-ТП	**(1) + (3)** 95,0 : 5,0	254	0,15	47 ± 11
	(2) + DOPE + (3) 32,6 : 62,4 : 5,0	238	0,10	16 ± 5
	(2) + DOPE + (4) 32,6 : 62,4 : 5,0	270	0,10	28 ± 8
FLp-ПМ	**(1) + (4)** 95,0 : 5,0	135	0,04	51 ± 10
Lp (контроль)	**DOPE** 100,0	95	0,09	58 ± 6

Показано, что средний диаметр FLp напрямую зависел от метода их получения. Так, размер образцов FLp-ТП был в среднем вдвое больше, чем диаметр образца FLp-ПМ. Такую разницу можно объяснить попаданием части лигандов и спейсерных фрагментов во внутреннюю полость FLp-ТП, что закономерно приводило к увеличению их диаметра. В то же время, на ζ-потенциал влиял не столько метод получения липосом, сколько их липидный состав. Так, максимальные ζ-потенциалы наблюдали для липидной основы (1). Все липосомы были стабильны в течение минимум 3 недель, в течение которых высвобождение DOX составляло менее 5 %.

Цитотоксичность FLp сравнивали на клетках рака шейки матки человека (HeLa), характеризующихся оверэкспрессией фолатных рецепторов. Результаты МТТ-теста в монослойной культуре клеток представлены на Рисунке 2 и в Таблице 2. Все образцы FLp+DOX, проявляли цитотоксический эффект, сопоставимый с действием свободного DOX, уже в первые 24 ч, причем максимальные значения IC50 (полуингибирующая концентрация, вызывающая гибель 50 % клеток) были установлены для образца FLp-ПМ (1)+(4)+DOX. При этом пустые FLp (без DOX) с липидной основой (1) были не цитотоксичны для клеток (IC50 > 100 мкМ), тогда как пустые липосомы с липидной основой (2) проявляли некоторую токсичность через 48 ч.

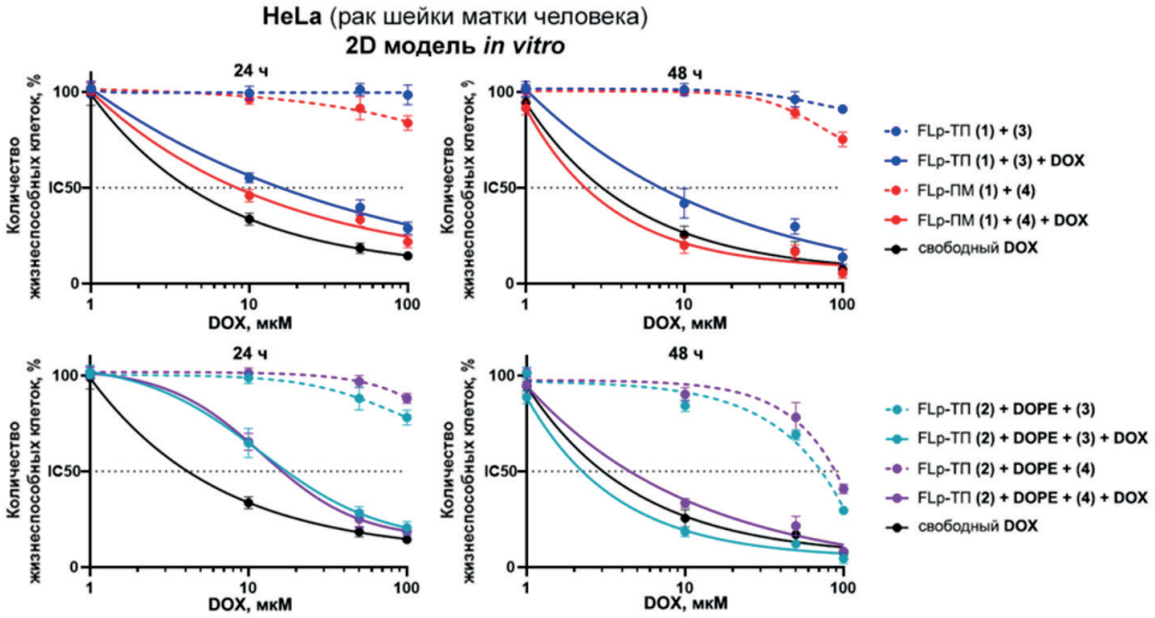


Рисунок 2. Цитотоксичность FLp. Контроли: свободный DOX; липосомы без DOX; необработанные клетки (100 % жизнеспособных клеток). Результаты МТТ-теста.

Таблица 2. Значения IC50 для фолат-конъюгированных липосом после 24 и 48 ч инкубации с монослойной культурой клеток HeLa. Результаты МТТ-теста.

Образец и метод получения	**Липидный состав, % масс.**	**Состав**	**IC50, мкМ, 24 ч**	**IC50, мкМ, 48 ч**
FLp-ТП	**(1) + (3)** 95,0 : 5,0	+ DOX	10,8 ± 2,0	7,9 ± 1,2
		пустые (без DOX)	>100,0	
	(2) + DOPE + (3) 32,6 : 62,4 : 5,0	+ DOX	11,0 ± 2,6	1,4 ± 0,2
		пустые (без DOX)	>100,0	75,6 ± 8,5
	(2) + DOPE + (4) 32,6 : 62,4 : 5,0	+ DOX	10,6 ± 1,9	3,8 ± 0,4
		пустые (без DOX)	>100,0	92,4 ± 11,0
FLp-ПМ	**(1) + (4)** 95,0 : 5,0	+ DOX	8,4 ± 1,5	1,4 ± 0,3
		пустые (без DOX)	>100,0	
свободный **DOX** (контроль)	–	–	4,2 ± 0,9	2,1 ± 0,6

Таким образом, наиболее перспективным оказался образец FLp-ПМ (1)+(4), поскольку он не проявлял цитотоксичности до загрузки DOX, эффективно вызывал гибель раковых клеток HeLa после загрузки DOX, а также обладал наиболее привлекательными физико-химическими параметрами.

Работа частично поддержана из гранта РНФ №№23-15-00468-П (получение и исследование физико-химических свойств липосом) и из гранта РНФ № 22-13-00261Р (все эксперименты с клетками).

УДК 343.42

МОЛЕКУЛЯРНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ МЕТОДАМИ КОЛЕБАТЕЛЬНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Курочкин И.Н.[1,2]

[1]*ФГБУН ИБХФ им. Н.М. Эмануэля РАН, г. Москва, РФ*
[2]*Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ*
ikur@sky.chph.ras.ru

Аннотация. В докладе рассмотрены виды и методы молекулярного профилирования для раннего выявления и мониторинга патологических процессов в организме. Особое внимание уделено методам колебательной спектроскопии для картирования метаболических профилей и построению классифицирующих моделей ранней диагностики и путей развития ряда заболеваний. Рассмотрены проблемы, возникающие при интерпретации спектральных данных из-за перекрытия полос, шумовых помех и изменчивости интенсивности сигнала в сложных смесях.

Ключевые слова: комбинационное рассеяние, ИК-спектроскопия, машинное обучение, метаболическое профилирование.

Молекулярное профилирование — это комплексный анализ биологических молекул пациента, таких как ДНК, РНК, белки, метаболиты, для определения уникальных характеристик заболевания или биологического состояния человека, чтобы выявить особенности, связанные с заболеваниями, наследственными изменениями или ответом на лечение. Этот передовой подход выходит за рамки традиционных методов диагностики и является краеугольным камнем персонализированной медицины, позволяющим врачам подбирать лечение с учетом индивидуальных особенностей пациента [1]. Молекулярное профилирование объединяет комплекс методов, которые позволяют детально изучить молекулярный «портрет» образца (ткани, крови, клеток). Основными методами молекулярного профилирования являются: полимеразная цепная реакция, флуоресцентная гибридизация *in situ*, секвенирование нового поколения, масс-спектроскопия, иммуногистохимия. Особое место среди методов картирования метаболических профилей (так называемое метаболическое профилирование) занимает масс-спектроскопия, получившая широкое распространение в начале XXI века, позволяющая идентифицировать объект на основе специфического набора ионов в масс-спектре без идентификации отдельных компонент (нецелевая масс-спектроскопия) [2,3]. Такой подход предоставляет информацию о нескольких аналитах и метаболических путях, а также о динамических изменениях в одном образце. Таким образом, эти модули совместно регулируемых метаболитов объединяют скоординированные молекулярные наборы в валидированные панели. Поскольку патологические процессы часто затрагивает целые метаболические пути, а не отдельные узлы, такие панели позволяют лучше дифференцировать состояния, при которых отдельные маркеры пересекаются.

Перспективной альтернативой и дополнением масс-спектроскопии является использование методов колебательной спектроскопии: инфракрасной (ИК), комбинационного рассеяния (КР) и гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) [4,5]. Последние достижения в этих областях спектроскопии и интеграция алгоритмов машинного обучения [6] существенно повышают точность и эффективность диагностики позволяет использовать методы колебательной спектроскопии в клинической практике как надежный диагностический инструмент. В докладе рассмотрены результаты использования методов колебательной спектроскопии при профилировании метаболома сыворотки крови человека при развитии инсульта, ряда онкологических заболеваний, сепсиса, а также результаты идентификации конкретных аналитов и их концентраций в сложных образцах.

Особое внимание в докладе уделено проблемам предварительной обработки и интерпретации спектральных данных. Трудности возникают из-за таких проблем, как перекрывающиеся пики, шумовые

помехи и изменчивость интенсивности сигнала, особенно в смесях или при сверхнизких концентрациях анализируемых веществ. В этом отношении следует уделять снижению спектральной вариативности и обеспечению согласованности результатов экспериментов за счет стандартизации процедуры проведения экспериментов, подготовки образцов, калибровки приборов и сбора данных. В докладе рассмотрены методы коррекции базовой линии, сглаживание, шумоподавление, нормализация [7], спектральное выравнивание, обнаружение аномалий и отбраковки некорректных спектров. Проведение кластерного анализа, детализация спектров и построение классифицирующих моделей для большого набора спектров рассмотрено на примере использования ИК, КР и ГКР для высокочувствительного иммуноанализа, быстрой оценки устойчивости бактериальных клеток к действию лекарственных препаратов, определения транскриптов при развитии онкологических заболеваний, идентификации вирусных частиц и белковых молекул.

Приведенные в докладе результаты получены в рамках выполнения Государственного задания по темам: №122041400080-0 и №075-00422-24-02.

Список литературы

1. Massive Bio [Электронный ресурс] https://massivebio.com/molecular-profiling-bio/ (дата обращения 24.06.2026).
2. Д. Г. Иванов и др. Новые возможности масс-спектрометрии для сопровождения онкологических операций // Химическая физика. – 2020. – Т. 39. – No. 6. – С. 41–46.
3. Moon-Ju et al. Biomolecular profiling for noninvasive health monitoring // Nature Biotechnology. – 2026. – V. 44. – C 934–947.
4. Weiwei Fu et al. Raman spectroscopy and machine learning for early detection of gastric cancer and *Helicobacter pylori* with gastric juice // Scientific Reports. – 2025. – V. 15. N. 36332. P. 1 – 13.
5. Schiemer R et al. Infrared and Raman spectroscopy of blood plasma for rapid endometrial cancer detection // British Journal of Cancer. – 2025. – V. 133. – P. 194–207.
6. Bingsen Xue et al. Deep spectral component filtering as a foundation model for spectral analysis demonstrated in metabolic profiling // Nature Machine Intelligence – 2025 – V. 7. – P. 743–757.
7. *Evtushenko E. G., Kurochkin I. N.* Extended multiplicative signal correction of noisy raman spectra // *Journal of Chemometrics*. — 2026. — Vol. 40, no. 4. — P. e70123.

УДК 541.18

СОВРЕМЕННАЯ УЛЬТРАМИКРОСКОПИЯ: ПРЯМОЙ МЕТОД ХАРАКТЕРИЗАЦИИ НАНООБЪЕКТОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ И МОДЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Курьяков В.Н.

Институт проблем нефти и газа РАН, г. Москва, РФ
Vladimir.kuryakov@ipng.ru

Аннотация. В докладе рассмотрены возможности метода ультрамикроскопии для визуализации отдельных наночастиц (нанообъектов) в жидкостях. Метод позволяет измерять численную концентрацию и размеры нанообъектов, исследовать процессы агрегации, детектировать нанопузырьки и контролировать чистоту растворителей. Приводятся конкретные примеры исследований различных наноразмерных объектов в жидкостях.

Ключевые слова: ультрамикроскопия, наночастицы, агрегация, контроль чистоты

Современная ультрамикроскопия (нобелевская премия по химии 1925 года, Рихард Зигмонди), развивающая принципы темнопольной микроскопии с лазерным освещением и цифровой регистрацией, превратилась в высокочувствительный метод прямого анализа нанообъектов в жидких средах. В отличие от динамического светорассеяния или электронной микроскопии, метод позволяет непосредственно, в режиме реального времени, визуализировать отдельные наночастицы размером от нескольких нанометров, измерять их численную концентрацию в диапазоне от 10^5 частиц/мл и одновременно оценивать гидродинамический радиус по броуновскому движению. Важным преимуществом является работа с нативными образцами без вакуумирования или высушивания, а также отсутствие необходимости в калибровке по оптическим свойствам частиц. В настоящее время метод реализован в ряде коммерческих приборов (NanoSight, ZetaView, российский NP Counter) и успешно применяется для решения широкого круга научных и прикладных задач.

Метод ультрамикроскопии позволяет с высокой чувствительностью осуществлять контроль стабильности коллоидных систем. На примере модельных нефтяных систем с асфальтенами показано преимущество метода ультрамикроскопии по чувствительности в сравнении с методом динамического рассеяния света.

Метод также позволяет оценивать размер наночастиц оригинальным способом через массовую и численную концентрацию при известной плотности материала. При заранее известном размере нанообъектов открывается возможность оценки плотности (пористости) материала наночастиц [1].

В области исследований нанопузырьков, относительно молодого объекта исследований, ультрамикроскопия является одним из немногих методов прямой визуализации таких объектов в экспресс-режиме. Исследование свойств нанопузырьков особенно важно для биомедицины, очистки воды и горнодобывающей промышленности.

Ультрамикроскопия востребована для контроля чистоты особо чистых жидкостей. Анализ серии проб воды с удельным сопротивлением 18.2 МОм·см, полученных на лабораторных системах обратного осмоса (Milli-Q, Аквалаб и др.), выявил наличие наночастиц с концентрацией до 10^7 частиц/мл, что критически важно для микроэлектроники и фармацевтики. Даже в реакционно-чистых растворителях, прошедших специальную очистку, таких как деионизованная вода и изопропанол для микроэлектроники, могут присутствовать наночастицы размером более 20 нм с концентрацией до 10^6 частиц/мл [2].

В биологии и медицине метод (часто под названием Nanoparticle Tracking Analysis, NTA) стал «золотым стандартом» для характеризации внеклеточных везикул, позволяя одновременно измерять концентрацию, распределение по размерам в диапазоне 10-1000 нм и с помощью флуоресцентного детектирования идентифицировать специфические субпопуляции [3].

Таким образом, современная ультрамикроскопия представляет собой мощный аналитический инструмент для наноиндустрии, материаловедения и биомедицины. Прямое измерение численной концентрации, высокая чувствительность к агрегации, возможность работы с металлическими, оксидными, органическими частицами и газовыми пузырьками, а также экспрессность измерений и малый требуемый объем образца (0.5 мл) делают метод перспективным для дальнейшего развития приборной базы и методического обеспечения в российской науке и промышленности.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИПНГ РАН № 125020501404-4.

Список литературы

1. Kuryakov V.N. et al. Measurement of Gold Nanoparticle Sizes by Ultramicroscopy // High Energy Chem. – 2025. – Vol. 59. – P. S52–S54.
2. Popov K. et al. Potential Nano/Microcenters of Crystal Nucleation in Reagent-Grade Purity Solvents and Their Differentiation by Fluorescent-Tagged Antiscalant // Crystals. – 2024. – Vol. 14. – P. 650.
3. Pashirova T.N. et al. Creation of Efficient Biocatalytic Nanoscavengers for Detoxification of Organophosphorus Compounds: Influence of Nanoparticle Type // Colloid Journal. – 2025. – Vol. 87. – P. 970–980.

УДК 616.71-006.3.04-08-036.8:616.15-074

ПОКАЗАТЕЛИ ВЫЖИВАЕМОСТИ БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ КОСТЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЕЙ ММП-2, 7 И ТИМП-1, 2 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Черномаз И.С.[1,2], Прищеп П.Л.[1], Герштейн Е.С.[1], Кушлинский Н.Е.[1]

[1] ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия
[2] ФГБУ «Центральная клиническая больница с поликлиникой» Управления делами Президента РФ
marvel2602@mail.ru

Аннотация. Представлены данные отдаленных результатов лечения больных злокачественными опухолями костей с учетом содержания матриксных металлопротеиназ (ММП-2, ММП-7) и их тканевых ингибиторов (ТИМП-1, ТИМП-2) в сыворотке крови для выявления возможной взаимосвязи с прогнозом заболевания. Исследования ММП и ТИМП проведены до начала специфического лечения иммуноферментным методом. Установлено, что определение уровня ММП и ТИМП в сыворотке крови может служить дополнительным фактором в оценке прогноза злокачественных опухолей костей.

Ключевые слова: злокачественные **опухоли** костей, прогноз, ММП, ТИМП.

Матриксные металлопротеиназы (ММП) - это ферменты, которые расщепляют белки и требуют присутствия активных атомов металла. Существует более 20 типов ММП, и они способствуют миграции клеток посредством протеолитической деградации внеклеточной основы. ММП имеют три консервативных домена: про-ММП, каталитический и гемопексиновый. Через эти домены ММП расщепляют матрикс и межклеточные барьеры. Следовательно, ММП расщепляют весь внеклеточный матрикс (ВКМ) [1]. ММП можно разделить на шесть групп в зависимости от субстратной специфичности и структурных различий: коллагеназы, желатиназы, стромелизины, матрилизины, металлоэластазы и мембранные ММП [2]. Благодаря разнообразию субстратов, ММП участвуют в различных гомеостатических функциях, таких как ремоделирование костной ткани, заживление ран и нескольких аспектах иммунитета. Однако ММП также участвуют в ряде патологических процессов, таких как прогрессирование опухолей, фиброз, хроническое воспаление, разрушение тканей и многое другое. Ключевым этапом в регуляции протеолиза ММП является превращение зимогена в активную протеиназу. Несколько проММП активируются в пути секреции фуриновыми пропротеинконвертазами, но для большинства механизмы активации в значительной степени неизвестны [3]. Наиболее важными физиологическими ингибиторами функции ММП являются тканевые ингибиторы металлопротеиназ (ТИМП). ТИМП блокируют катализ матриксных металлопротеиназ (ММП) и обладают дополнительными биологическими свойствами, включая регуляцию роста и дифференцировки клеток, апоптоз, ангиогенез и онкогенез [4].

Нами было установлено, что наиболее эффективным в оценке прогноза злокачественных опухолей костей является комплекс лабораторных показателей в сыворотке крови: ММП-2, ММП-7, ТИМП-1 и ТИМП-2. Мы обнаружили, что уровни исследованных ММП в сыворотке крови больных злокачественными опухолями костей, статистически значимо ассоциированы с показателями выживаемости.

При низких (менее 150 нг/мл) концентрациях ММП-2 в группе больных остеосаркомой (ОС) с I-II стадиями опухолевого процесса выявлено статистически значимое снижение общей выживаемости ($p=0,03$). У больных саркомой Юинга с исходными уровнями ММП-2 <150 нг/мл 3-летняя общая выживаемость снижалась на 72%, безрецидивная на 48%.

У больных остеосаркомой с содержанием ММП-7 ≥3,4 нг/мл в сыворотке крови показатели 5-летней общей выживаемости статистически значимо снижались на 34% (p=0,038), при хондросаркоме 5-летняя безрецидивная выживаемость снижалась на 66% (p<0,05).

По данным многофакторного анализа, нами было установлено, что пороговые уровни ТИМП-1 более 343 нг/мл и ТИМП-2 более 120 нг/мл можно рассматривать в качестве значимых и независимых факторов неблагоприятного прогноза общей выживаемости больных саркомами костей.

Таким образом, при ведении больных злокачественными опухолями костей определение белков ММП-2, ММП-7, ТИМП-1 и ТИМП-2 в сыворотке крови до начала лечения может служить дополнительным фактором в оценке прогноза заболевания. Все изучаемые белки в той или иной степени имеют прогностическое значение, при этом выявленные закономерности были различны для общей и безрецидивной выживаемости при разных вариантах гистологического строения опухолей костей.

Список литературы

1. Kim I.S., Yang W.S., Kim C.H. Physiological Properties, Functions, and Trends in the Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Inflammation-Mediated Human Diseases // Curr. Med. Chem. – 2023. – Vol. 30. – No. 18. – P. 2075-2112. doi: 10.2174/0929867329666220823112731.

2. Almutairi S., Kalloush H.M., Manoon N.A., Bardaweel S.K. Matrix Metalloproteinases Inhibitors in Cancer Treatment: An Updated Review (2013-2023) // Molecules. – 2023 Jul 21. – Vol. 28. – No. 14. – P. 5567. doi: 10.3390/molecules28145567.

3. Ra H.J., Parks W.C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity // Matrix Biol. – 2007 Oct. – Vol. 26. – No. 8. – P. 587-596. doi: 10.1016/j.matbio.2007.07.001.

4. *Герштейн Е.С.*, *Кушлинский Н.Е.* Клинические перспективы исследования ассоциированных с опухолью протеаз и их тканевых ингибиторов у онкологических больных // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2013. – № 5. – С. 16–27.

УДК 543.95; 579.6

БИОМИМЕТИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ «КЛЕТКИ В ОБОЛОЧКЕ» ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ЭФФЕКТИВНЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ В БИОТЕХНОЛОГИИ И БИОМЕДИЦИНЕ

Гуркина Е.С., Лаврова Д.Г.

ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», г. Тула, РФ
daria.g.lavrova@gmail.com

Аннотация. Предложен биомиметический подход к инкапсуляции живых клеток дрожжей и бактерий в гидрогель из полиэтиленгликолята кремния (Si-ПЭГ), синтезируемый в физиологических условиях без цитотоксичных продуктов. Материал обладает полимерной структурой, высокой биосовместимостью и эффективностью инкапсуляции ≥70%, сохраняя метаболическую активность микроорганизмов на уровне 80% в течение 7–10 суток.

Ключевые слова: биомиметики, биосовместимость, золь-гель синтез, метаболическая активность, биокатализаторы.

Разработка функциональных материалов на основе инкапсулированных живых клеток является приоритетным направлением биотехнологии, нацеленным на создание стабильных биокаталитических систем [1]. Традиционные методы иммобилизации часто ограничены применением биодеградируемых полимеров или алкоксидных прекурсоров, выделяющих цитотоксичные спирты и требующих экстремальных значений pH, что ведет к потере жизнеспособности микроорганизмов [2]. В данной работе предложен переход к биомиметическому подходу [3] с использованием полиэтиленгликолята кремния (Si-ПЭГ), который позволяет проводить синтез в мягких физиологических для клеток условиях, обеспечивая формирование архитектуры «клетка в оболочке» (рис. 1).

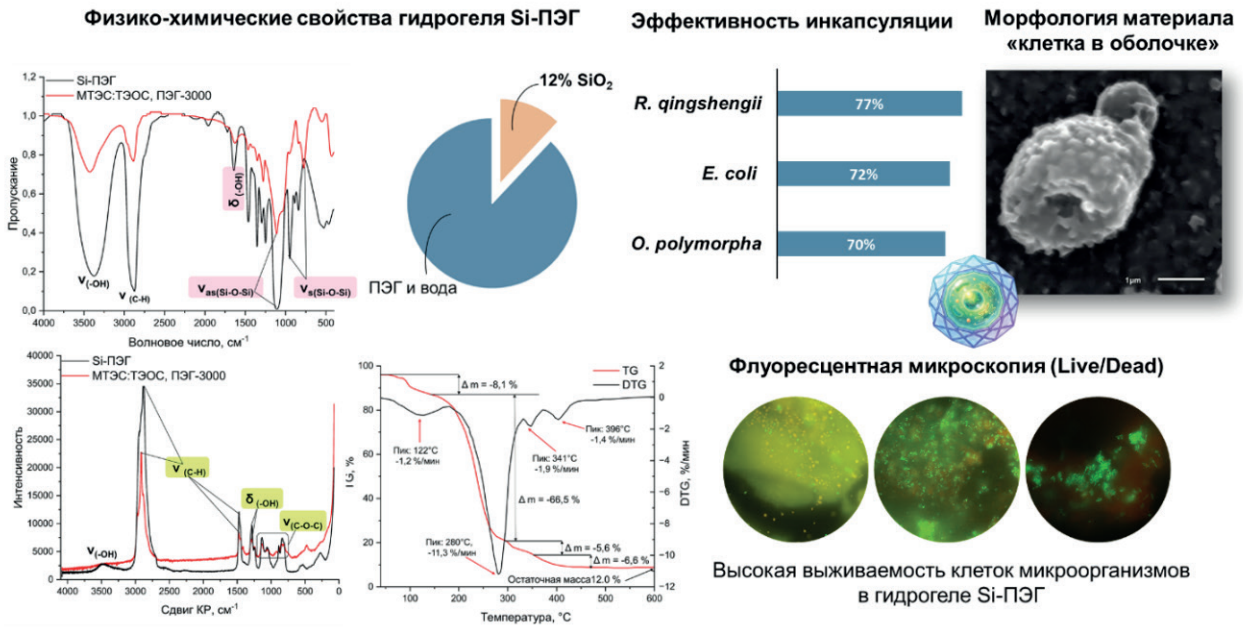


Рисунок 1. Физико-химические свойства полученного гидрогеля Si-ПЭГ, выживаемость микроорганизмов при инкапсуляции и морфология поверхности биогибридных материалов типа «клетка в оболочке»

Методами ИК- и КР-спектроскопии установлен полимерный характер получаемых гидрогелей Si-ПЭГ, в которых органическая часть (ПЭГ) ковалентно связана с неорганическими фрагментами через связи Si–O–C. Согласно данным термогравиметрического анализа, остаточная масса неорганической фазы в системе составляет около 12%, что подтверждает значительное преобладание органической составляющей, предотвращающей синерезис гидрогеля. Такой состав обеспечивает высокую биосовместимость материала: при оценке методом диффузии в агар зон ингибирования роста дрожжей и бактерий не обнаружено.

Эффективность инкапсуляции микроорганизмов в гидрогель Si-ПЭГ составляет не менее 70% для дрожжей *Ogataea polymorpha* и бактерий *Escherichia coli* и *Rhodococcus qingshengii*. Использование флуоресцентной микроскопии с окрашиванием Live/Dead подтвердило высокую выживаемость интактных клеток внутри матрицы. Биолюминесцентный анализ внутриклеточного АТФ показал, что метаболическая активность иммобилизованных систем в гидрогель Si-ПЭГ сохраняется на уровне 79–93% от показателей свободных культур, что свидетельствует о функциональной сохранности биокатализаторов.

Биокаталитическая эффективность созданных материалов охарактеризована с применением биосенсорного подхода на основе кислородного электрода Кларка. Инкапсулированные в Si-ПЭГ микроорганизмы сохраняют стабильное дыхание в течение 7–10 суток при использовании в качестве субстратов метанола для дрожжей и глюкозы для бактерий.

Практическая значимость исследования заключается в создании стабильных биокаталитических элементов для экологического мониторинга и промышленного синтеза. Гидрогель Si-ПЭГ не только обеспечивает механическую защиту, но и эффективно стабилизирует метаболическую активность клеток, предотвращая их незамедлительную гибель. Разработанные системы «клетка в оболочке» позволяют перенаправлять метаболизм микроорганизмов на синтез целевых продуктов и могут быть использованы в качестве основы для долгоживущих биосенсоров и непрерывных биореакторов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-24-20032, https://rscf.ru/project/24-24-20032/ и правительства Тульской области

Список литературы

1. Satchanska G., Davidova S., Petrov P.D. Natural and Synthetic Polymers for Biomedical and Environmental Applications // Polymers. – 2024. – Vol. 16. – No. 8. – P. 1159.

2. Ashfaq A., Jacob J., Bano N., Nabi M.A.U., Ali A., Ahmad W., Mahmood K., Arshad M.I., Ikram S., Rehman U., et al. A Two Step Technique to Remove the Secondary Phases in CZTS Thin Films Grown by Sol - Gel Method // Ceramics International. – 2019. – Vol. 45. – No. 8. – P. 10876–10881.

3. Lai W.-C., Huang P.-H. Self-Assembly Behaviors of Dibenzylidene Sorbitol Hybrid Organogels with Inorganic Silica // Soft Matter. – 2017. – Vol. 13. – No. 17. – P. 3107–3115.

УДК 546.722

РАЗРАБОТКА БИОПЛЁНОК С МАГНИТНЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ ВЛИЯНИЯ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК

Лапаник А.Д.[1], Дорощенко А.В.[1], Сажнев Н.А.[2], Лопухов А.В.[1], Чудосай Ю.В.[1], Скуредина А.А.[1], Прусов А.Н.[3] Клячко Н.Л.[1]

[1] Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия
[2] Российский государственный университет им. А.Н. Косыгина, институт химических технологий и промышленной экологии, Москва, Россия
[3] Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Москва, Россия
anya73anya@gmail.com

Аннотация. В докладе представлена информация об оптимизации условий получения полимерных матриксов с включенными внутрь магнитными наночастицами и исследовании их влияния на выживаемость клеток. Были подобраны условия для получения матриц с синтезированными и коммерческими магнитными частицами различного размера и состава, изучена их цитотоксичность в присутствии низкочастотного переменного магнитного поля на различных линиях клеток.

Ключевые слова: магнитные наночастицы, магнитомеханический эффект, полимерные матрицы, регенерация

Магнитные нано- и микрочастицы (МНЧ) обладают рядом важных свойств: высокой биосовместимостью, возможностью химической модификации и контролируемой морфологией, задаваемой на этапе синтеза. Одной из ключевых характеристик МНЧ является способность проявлять магнитомеханические эффекты при воздействии низкочастотного переменного магнитного поля (ПМП). Под действием такого поля МНЧ могут вызывать деформацию клеточной мембраны или коллоидных частиц. Благодаря этому, варьируя их физико-химические параметры и режимы ПМП, можно целенаправленно управлять биологическим ответом [1]. Совокупность этих свойств определяет использование МНЧ в биомедицине в двух основных направлениях: как носителей для адресной доставки активных веществ и как самостоятельных терапевтических агентов. В результате открываются возможности для создания неинвазивных систем регенеративной медицины, а также платформ для селективного апоптоза опухолевых клеток [2].

В последнее время активно исследуется вопрос о создании биосистем на основе матриц, содержащих МНЧ, которые потенциально могут быть использованы для in vitro формирования имплантируемого предшественника ткани для регенеративной медицины или терапии онкологических заболеваний [3]. Основным ограничением применения магнитных скаффолдов является недостаточный контроль физико-химических свойств магнитных наночастиц и их биологического поведения, включая гетерогенность, потенциальную цитотоксичность и нестабильность в составе матрицы, что затрудняет их стандартизацию и ограничивает клиническое использование. Поэтому актуальным является оптимизация методики получения стабильных МНЧ и матриксов, позволяющих проводить воспроизводимые эксперименты на клетках.

Целью данной работы является оптимизация методики получения полимерных матриц с включенными в них МНЧ и изучение их влияния на жизнеспособность эукариотических линий клеток.

В данной работе были синтезированы МНЧ, покрытые олеиновой кислотой (МНЧ-Ol) на основе магнетита, диаметр которых составил 9 ± 1 нм, PdI 0.01 (рис. 1, слева). Структура магнетита была подтверждена РФА. Также было подтверждено, что полученные МНЧ обладают очень низким значением

остаточной намагниченности и высоким значением максимальной намагниченности, что характерно для суперпарамагнетиков (рис. 2, справа). Полученные МНЧ были гидрофилизированы 3,4-дигидроксифенилуксусной кислотой (DOPAC) или дофамином (DOPA), часть МНЧ была модифицирована фактором роста IGF-1. Полученные наночастицы были охарактеризованы методом ДСР и ИК спектроскопии. Также для получения матриц были взяты коммерческие магнитные частицы компании Spherotech размером 100–1000 нм, функционализированные карбокси- и аминогруппами.

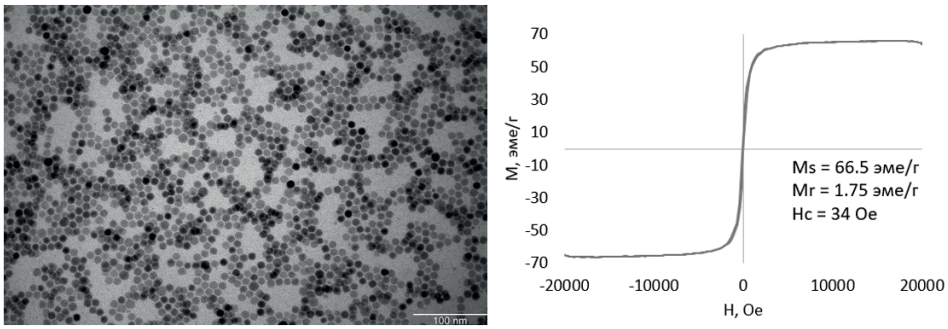


Рис. 1. микрофотография ПЭМ синтезированных МНЧ-Ol (слева) и результаты измерений магнитостатических свойств МНЧ-Ol (справа).

Матрицы получали смешиванием поливинилового спирта (ПВС) и Хитозана (Хит) в разных соотношениях в смеси с МНЧ, полученный гель сшивали глутаровым альдегидом или дженипином. Были подобраны оптимальные условия для создания матриц, содержащих коммерческие и синтезированные МНЧ. Готовые матрицы осаждали на дно 48-луночного планшета и инкубировали с эукариотическими линиями клеток (HEK293 или L8) 96 часов. На 2, 3, 4 день инкубации систему обрабатывали низкочастотным ПМП (19 Гц, 100 мТл, режим: 10 мин обработка, 10 мин пауза, повтор 3 раза). На 4 день определяли выживаемость клеток спектрофотометрически с помощью водорастворимого реагента WST-1. Было показано, что в зависимости от состава пленок и лиганда на поверхности МНЧ, а также размера частиц под действием ПМП наблюдается как повышение, так и понижение жизнеспособности клеток по отношению к контрольным без МНЧ.

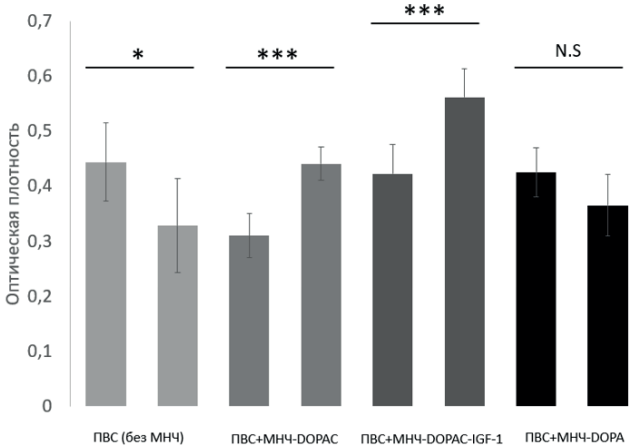


Рис. 2. Результаты эксперимента по определению цитотоксичности и биологической активности биополимерных плёнок на основе ПВС, сшитых глутаровым альдегидом (без МНЧ, с МНЧ-DOPAC, МНЧ-DOPAC-IGF-1 и МНЧ-DOPA) по отношению к клеткам линии L8 под действием ПМП (19 Гц, 100 мТл) и без него. Данные представлены как mean ± SD по результатам 3 независимых измерений. Для анализа значимости использовался двусторонний t-критерий Уэлча (Welch's t-test), обозначения: ✱ – p-value < 0,05, ✱✱ – p-value < 0,01, ✱✱✱ – p-value < 0,001

Таким образом, в данной работе было показано, что в присутствии ПМП на пленках с отрицательно заряженными МНЧ заметно **уменьшилась выживаемость**, в то время как для пленок без МНЧ и плёнок с МНЧ-DOPA – отличие было незначительным. В случае **МНЧ-DOPAC-IGF-1** наблюдалось ожидаемое увеличение жизнеспособности по сравнению с **МНЧ-DOPAC**. В случае плёнок **ПВС:Хит с коммерческими МНЧ** значимого эффекта в присутствии ПМП не наблюдалось. Необходимо варьировать параметры ПМП, концентрацию и состав МНЧ, а также свойства пленок для изучения возможного цитотоксического эффекта.

Работа частично поддержана грантом РНФ 22-13-00261П, темами с гос. регистрацией 121041500039-8 и 123032300028-0 и Программой развития МГУ (покупка приборов и использование детектора LYNXEYE).

Список литературы

1. Golovin Y., Gribanovsky S., Golovin D., Klyachko N., Majouga A., Master A., Kabanov A. Towards nanomedicines of the future: Remote magneto-mechanical actuation of nanomedicines by alternating magnetic fields // J. of Controlled Release. – 2015. – Vol. – 219. – P. 43-60.
2. Lodi M.B., Fanti A. Biomedical Applications of Biomaterials Functionalized with Magnetic Nanoparticles // Smart Nanosystems for Biomedicine, Optoelectronics and Catalysis. – 2019.
3. V. Goranov. Biomaterials functionalized with magnetic nanoparticles for tissue engineering: Between advantages and challenges // Biomaterials and Biosystems. – 2024. – V. 15.

УДК 616-074:577.21

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ПРИ ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ ПРОТИВ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ИНГИБИТОРАМИ ТИРОЗИНКИНАЗ

Лебедева Ю.Л., Шаронова А.И., Черкашин Е.А., Акимкин В.Г.

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва, РФ
j_kuzmina@pcr.ms

Аннотация. В докладе представлен обзор современных подходов в молекулярной диагностике миелопролиферативных заболеваний, основанных на методах амплификации нуклеиновых кислот. Проведен сравнительный анализ данных методов, дана оценка преимущественному использованию в соответствие с текущим состоянием процедуры мониторинга и клиническими рекомендациями в отношение миелопролиферативных заболеваний.

Ключевые слова: ингибиторы тирозинкиназ, цифровая полимеразная цепная реакция, полимеразная цепная реакция, хронический миелоидный лейкоз.

Ингибиторы тирозинкиназ (ИТК) — это класс таргетных препаратов, которые избирательно блокируют активность тирозинкиназ — ферментов, передающих сигналы роста и пролиферации в клетках. Их применение стало революцией в лечении миелопролиферативных заболеваний (МПЗ), особенно хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ) и Ph-негативных МПЗ. Тирозин-специфичные протеинкиназы переносят фосфатную группу с молекулы АТФ на аминокислоту тирозин в белках-субстратах, запуская каскады реакций сигнальных путей, регулирующих пролиферацию, выживаемость и дифференцировку клеток. Ингибиторы тирозинкиназ, в свою очередь, блокируют этот процесс, конкурируя с АТФ за связывание с киназным доменом или модулируя его конформацию. В ходе терапии хронического миелоидного лейкоза мишенью является химерный белок BCR-ABL1, обладающий конститутивной тирозинкиназной активностью, в результате чего происходит подавление таких сигнальных путей, как RAS/MAPK, PI3K/AKT, STAT, что приводит к остановке пролиферации и индукции апоптоза онкогенных клеток [1, 2]. Клинический результат контролируется на уровне достижения цитогенетического и молекулярного ответа и нормализации гемопоэза.

Однако, одной из ключевых проблем в терапии миелопролиферативных заболеваний является всевозрастающая резистентность к препаратам ингибиторов тирозинкиназ. Несмотря на их высокую эффективность, у 15–40% пациентов развивается первичная или вторичная резистентность, требующая изменения тактики лечения [3].

Применение методов амплификации нуклеиновых кислот стало ключевым инструментом молекулярного мониторинга эффективности терапии ингибиторами тирозинкиназ при миелопролиферативных заболеваниях. Методы амплификации позволяют количественно измерять конкретный химерный транскрипт, что даёт прямую оценку фармакодинамического эффекта терапии. Внедрение новых технологий, таких как цифровая ПЦР (dPCR) и секвенирование нового поколения (NGS), может произвести революцию в лечении пациентов с хроническим миелолейкозом, резистентным к ингибиторам тирозинкиназы и трансформировать подход к терапии МПЗ ингибиторами тирозинкиназ: от эмпирического подбора до прецизионного, динамически корректируемого лечения в контексте персонализации доз ИТК и раннего выявления клональной эволюции [4, 5].

Дальнейшее внедрение цифровых платформ (dPCR), интеграция с жидкой биопсией и ИИ-аналитикой закрепят эти методы как основу управления МПЗ в эпоху персонализированной онкогематологии.

Список литературы

1. Yazeed Alekrish, Salman Alotaibi, Zafar Iqbal, Aamer Aleem. Mechanisms of Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in Myeloid Leukemias // Cureus – 2025. - Jun18; 17(6): e86322
2. Tara Shammas, Malalage N Peiris, April N Meyer, Daniel J Donoghue. BCR-ABL: The molecular mastermind behind chronic myeloid leukemia // Cytokine Growth Factor Rev – 2025. - Jun:83:45-58
3. Кустова Д.В., Мотыко Е.В., Кириенко А.Н., Герт Т.Н., Леппянен И.В., Бакай М.П., Ефремова Е.В., Морозова Е.В., Ломаиа Е.Г., Шуваев В.А., Сидоркевич С.В., Мартынкевич И.С. Ретроспективный анализ собственного многолетнего опыта исследования мутационного статуса киназного домена гена BCR::ABL у пациентов с хроническим миелолейкозом // Онкогематология – 2024 – Том 19(3):45–60
4. Camille C.B. Kockerols, Peter J.M. Valk, Mark-David Levin, Niels Pallisgaard, Jan J Cornelissen, Peter E Westerweel. Digital PCR for *BCR-ABL1* Quantification in CML: Current Applications in Clinical Practice // Hemasphere - 2020 - Nov 24;4(6):e496
5. Mary Alikian, Alexandra S. Whale, Susanna Akiki, Kim Piechocki, Celia Torrado, Thet Myint, Simon Cowen, Michael Griffiths, Alistair G. Reid, Jane Apperley, Helen White, Jim F. Huggett, Letizia Foroni. RT-qPCR and RT-Digital PCR: A Comparison of Different Platforms for the Evaluation of Residual Disease in Chronic Myeloid Leukemia // Clin Chem - 2017 Feb;63(2):525-531

УДК 571.27

БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ, АНТИМИКРОБНЫЕ БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ МЛЕКОПИТАЮЩИХ, СВОЙСТВА И ВОЗМОЖНОСТИ АКТИВАЦИИ. ПЕРСПЕКТИВНЫЕ АЛЬТЕРНАТИВЫ В БОРЬБЕ С БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ, ВКЛЮЧАЯ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНУЮ

Левашов П.А., Климов Д.А., Смирнов С.А.

Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
p.a.levashov@mail.ru

Аннотация. В докладе обобщены результаты новейших исследований антимикробных белковых и пептидных факторов млекопитающих. Обсуждаются возможности комбинации и активации антимикробных факторов для борьбы с бактериальной инфекцией, включая антибиотикорезистентную. Для борьбы с опасной бактериальной инфекцией обозначены новые перспективные пути разработки методов лечения как на основе антибактериальных белков и пептидов, так и на основе низкомолекулярных безопасных веществ, пищевых добавок, активирующих внутренние антимикробные факторы организма.

Ключевые слова: лизоцим, интерлейкин-2, компонент системы комплемент С2, трансферрин, бактериолитическая активность.

В последние годы появилось много новой информации о функционировании различных антимикробных белков млекопитающих [1,2]. Была открыта бактериолитическая активность интерлейкина-2, компонента С2 комплемента, трансферрина, схожая по характеру действия на бактерии с действием лизоцима, имеющая pH оптимум действия на бактерии, но в сравнении с лизоцимом обладающая иной субстратной специфичностью действия против разных бактерий [3-5]. Недавно было открыто, что бактериолитическая активность лизоцима и интерлейкина-2 существенно усиливается в присутствии некоторых низкомолекулярных добавок, а именно ряда заряженных аминокислот, однако перечень активаторов для этих двух антимикробных факторов не полностью совпадает, например, только лизоцим активируется в присутствии глицина и лизина, только интерлейкин-2 активируется милдронатом, при этом и лизоцим и интерлейкин-2 оба активируются аргинином и глутаматом [6]. Было показано, что комбинации нескольких заряженных аминокислот и глицина многократно усиливают бактериолитическую активность лизоцима [7]. Выяснилось, что лизоцим эффективно связывает эндотоксины грамотрицательных бактерий [8], существенно ухудшающие прогноз лечения при заражении крови. Также лизоцим потенциально может выступать в роли опсонина, улучшающего распознавание патогенных бактерий иммунными клетками [8,9]. Высокая эффективность действия комбинации интерлейкина-2 и лизоцима с добавками аминокислот глутамата, глицина и аргинина была показана на множестве клинических образцов ультрапатогенной *Escherichia coli*, устойчивой к антибиотикам и образующей бактериальные плёнки [10].

Новые данные о свойствах антибактериальных бактериолитических факторов млекопитающих открывают блестящие перспективы для разработки подходов, альтернативных применению антибиотиков для лечения в случае бактериальных инфекций, включая антибиотикорезистентную инфекцию. При разработке новых лекарственных препаратов могут применяться как сами комбинации антибактериальных белковых и пептидных факторов, так и низкомолекулярные пищевые добавки, активирующие внутренние антибактериальные факторы организма.

Доклад и статья подготовлены при поддержке гранта Российского научного фонда № 25-26-00144 «Активация антибактериальных бактериолитических белков молока низкомолекулярными добавками» https://rscf.ru/project/25-26-00144/.

Список литературы

1. Levashov P., Zaitsev I., Zaitsev S., Gasanova D. Non-specific Protein and Peptide Antibacterial Factors of Mammals // Protein J – 2026. – Vol. 45. – P. 83–99.
2. Klimov D.A., Levashov P.A. Structural Features and Properties of Transferrins: A Review // Appl Biochem Microbiol – 2025. – Vol. 61. – P. 1003–1033.
3. Sedov S.A., Belogurova N.G., Shipovskov S.V., Semenova M.V., Gitinov M.M., Levashov A.V., Levashov P.A. Bacteriolytic enzymes from the blood plasma of the sheep // Russ J Bioorg Chem – 2012. – Vol. 38. – No. 3. – P. 274–281.
4. Levashov P.A., Sedov S.A., Belogurova N.G., Shipovskov S.V., Levashov A.V. Bacteriolytic activity of human interleukin-2. // Biochemistry Moscow – 2012. – Vol. 77. – No. 11. – P. 1312–1314.
5. Levashov P.A., Ovchinnikova E.D., Morozova O.A., Matolygina D.A., Osipova Y.E., Cherdyntseva T.A., Savin S.S., Zakharova G.S., Alekseeva A.A., Belogurova N.G., Smirnov S.A., Tishkov V.I., Levashov A.V. Human Interleukin-2 and Hen Egg White Lysozyme: Screening for Bacteriolytic Activity against Various Bacterial Cells // Acta Naturae. – 2016. – Vol. 8. – No. 1. – P. 98-102.
6. Levashov P.A., Matolygina D.A., Ovchinnikova E.D., Atroshenko D.L., Savin S.S., Belogurova N.G., Smirnov S.A., Tishkov V.I., Levashov A.V. Bacteriolytic Activity Of Human Interleukin-2, Chicken Egg Lysozyme In The Presence Of Potential Effectors // Acta Naturae. – 2017. – Vol. 9. – No. 2. – P. 82–87.
7. Rastriga N.V., Klimov D.A., Gasanova D.A., Levashov P.A. Comparison of the individual and combined actions of charged amino acids and glycine on the lysis of Escherichia coli cells by human and chicken lysozyme // Process Biochemistry. – 2023. – Vol. 125. – P. 190–197.
8. Levashov P.A., Matolygina D.A., Dmitrieva O.A., Ovchinnikova E.D., Adamova I.Yu., Karelina N.V., Nelyub V.A., Eremeev N.L., Levashov A.V. Covalently immobilized chemically modified lysozyme as a sorbent for bacterial endotoxins (lipopolysaccharides) // Biotechnology Reports. – 2019. – Vol. 24. – P. e00381.
9. Daniel M.P., Gaikwad V., Verghese M. Abraham R., Kapoor R. Serum Lysozyme (Muramidase) Levels in Intra-Abdominal Abscesses: An Experimental Study // Indian J Surg. – 2015. – Vol. 77. – P. 117–119.
10. Gizinger O., Radzinskiy V., Sorokin Y., Sachivkina N., Letifov G., Gaziev A., Kornova N., Burgasova O., Taranova M., Ibragimova A., Bobunova A. The effects of interleukin-2 substances (glutamate, glycine, arginine) on biofilm formation in multidrug-resistant uropathogenic *Escherichia coli* in women with previous reproductive losses // International Journal of Agriculture and Biosciences. – 2024. – Vol. 13. – No. 4. – P. 753–762.

УДК: 615.281.9

МЕХАНИЗМЫ СИНЕРГЕТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЛИЗИНОВ GRC-BC01 И GRC-ML07 В ОТНОШЕНИИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Лендел А.М., Антонова Н.П., Абдуллаева С.Д., Васина Д.В.

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия
kazejosei@gmail.com

Аннотация. С помощью микробиологических и молекулярных методов исследован механизм синергетического действия ферментной композиции, состоящей из бактериоцина GRC-BC01 и модифицированного эндолизина GRC-ML07, в отношении *Staphylococcus aureus*. Показано, что помимо прямого гидролитического действия GRC-BC01 на пептидогликан, фермент GRC-ML07 в составе композиции повышает проницаемость цитоплазматической мембраны бактерии, а также препятствует ингибированию GRC-BC01 пептидогликаном.

Ключевые слова: энзибиотики, лизины, *Staphylococcus aureus,* комбинация ферментов, синергизм

В рамках преодоления кризиса, вызванного распространением бактериальных инфекций с множественной лекарственной устойчивостью патогенов, особое внимание уделяют энзибиотикам – препаратам на основе ферментов бактериофагов и бактерий, в частности, их пептидогликан-литических ферментов (лизинов). Важное преимущество лизинов как антимикробных соединений – это воздействие на консервативные молекулярные мишени, что значительно затрудняет развитие резистентности у бактерии. Однако применения лекарственного средства, состоящего из одного индивидуального лизина, может быть недостаточно для достижения клинически значимого эффекта, и более актуально изучать комбинации ферментов или лизинов с другими антибактериальными молекулами [1]. Ранее мы показали, что ферменты **GRC-ML07** (мурамидаза, активная против широкого спектра грамотрицательных бактерий) и **GRC-BC01** (эндопептидаза пептидогликана (**ПГ**) Staphylococcus spp.) в комбинации проявляют синергизм в отношении S. aureus. Цель настоящей работы – изучение механизмов в основе этого синергетического действия.

Общая антибактериальная активность лизинов GRC-BC01 и GRC-ML07 (далее - BC01 и ML07), по отдельности и в комбинации, в массовом соотношении ML07/BC01 – 100:1, была исследована с помощью метода серийных двукратных разведений в бульоне [2]. Активность оценивали в отношении *S. aureus* ATCC 29213 дикого типа **(WT)** и его устойчивого к BC01 мутанта **0608/2**. В ходе работы определяли минимальные бактерицидные **(МБК)** концентрации лизинов и комбинации, индекс фракционной бактерицидной активности комбинации (∑**ФБК**) [3]. Показано, что BC01 обладал выраженным антибактериальным эффектом в отношении WT (МБК = 6,3 мкг/мл), в то время как активность в отношении 0608/02 была ниже в 2,5 раза (МБК = 16 мкг/мл). Ожидаемо, ML07 не оказывал значимого антибактериального действия в отношении WT и его мутанта (МБК>512 мкг/мл). Синергетическое бактерицидное действие композиции ML07/BC01 наблюдалось и в случае мутанта, и в случае WT, но коррелировало с уровнем чувствительности: МБК композиции составили 6,3+0,06 мкг/мл ($\sum ФБК_{мин}$ = 0,021) и 100+1 мкг/мл ($\sum ФБК_{мин}$ = 0,063) в отношении WT и 0608/2, соответственно.

Далее оценили специфическое литическое действие лизинов и комбинации по способности формировать зоны лизиса в месте нанесения препарата на застывшем агаре, смешанном с суспензией (**КС**) автоклавированных клеток WT или мутанта 0608/2. Под действием BC01 в препарате КС WT формировались обширные прозрачные зоны лизиса, в то время как в КС 0608/2 образовывались значительно менее выраженные зоны (**рис. 1**). По всей видимости, устойчивость 0608/2 может быть обусловлена модификациями клеточной стенки. При этом комбинация демонстрировала синергический эффект

литического действия в отношении КС 0608/2, но не WT. Таким образом, ML07 способен снижать влияние защитных структурных изменений клеточной стенки мутанта *S. aureus*, но не позволяет полностью преодолеть их, что может быть связано с иными механизмами адаптации бактериальной клетки к действию лизинов (например, метаболическим перестройкам).

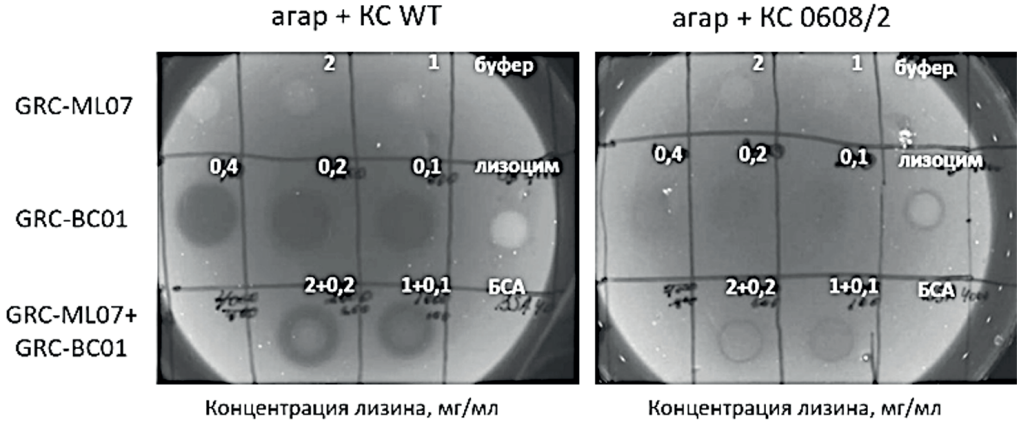


Рис 1. Литическая активность лизинов в отношении инактивированных клеток чувствительного WT (слева) и резистентного *0608/2 S. aureus* (справа).

Данная особенность композиции была подтверждена с использованием отдельных структурных компонентов – очищенного ПГ и синтетической цитоплазматической мембраны (**ЦМ**) бактерии. Пентаглициновые мостики ПГ *S. aureus* – это специфический субстрат BC01, в то время как ML07 менее специфичен и может действовать на связи в гликановой цепи. Оба лизина содержат в структуре домены связывания ПГ, что потенциально может снижать их активность при связывании. Используя метод подсчета колониеобразующих единиц (**КОЕ**), мы изучили снижение антибактериального действия лизина и комбинации при связывании с ПГ *S. aureus* (ПГ SA). Инкубация BC01 с ПГ и последующее осаждение сформировавшихся агрегатов привели к снижению антибактериальной активности BC01 в супернатанте (**рис. 2а**). И, напротив, активность ML07/BC01 была сопоставимой с активностью раствора композиции без ПГ. На основании этих данных, можно предположить, что ML07, вероятно, препятствует агрегации BC01 на ПГ и его инактивации.

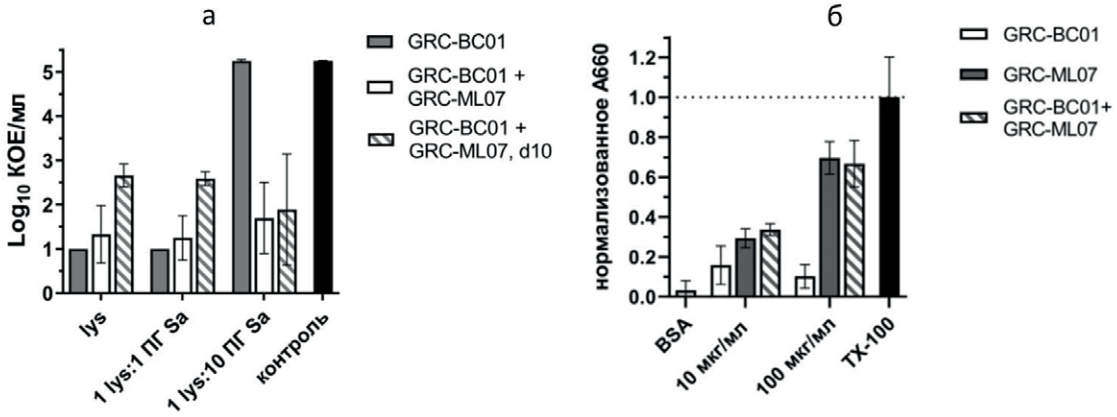


Рис 2. а) Антистафилококковое действие GRC-BC01 и комбинации после обработки препаратами ПГ и б) МП действие лизинов, выраженное в количестве вышедшего из липосом красителя МС (A_{660}). BSA, отрицательный контроль – образец, обработанный 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, TX-100, положительный контроль – обработанный 0,1% Тритоном X-100.

Для оценки пермеабилизующего (**ПМ**) действия сконструировали липосомы, содержащие краситель метиленовый синий (**МС**) в качестве индикатора проницаемости. Их инкубировали с исследуемыми

образцами, осаждали и оценивали оптическое поглощение супернатанта при 660 нм. Лизин BC01 действовал на уровне контрольного альбумина, лишенного ПМ свойств (**рис. 2б**). Мурамидаза ML07 и композиция, напротив, дозозависимым образом способствовали выходу МС из липосом. При 100 мкг/мл ML07 и в индивидуальном виде, и в комбинации, уровень МС в образцах достигал 60-70% положительного контроля, что говорит о ПМ активности, определяемой только ML07.

Таким образом, высокая эффективность композиции лизинов против чувствительных и устойчивых к BC01 вариантов *S. aureus* обусловлена синергическим действием двух ферментов на клеточные структуры. Данная композиция лизинов в значительно меньшей степени подвержена ингибированию субстратом (ПГ), а за счет ML07 – обладает дополнительным мембран-пермеабилизующим действием.

Список литературы

1. Vasina D. V. Antonova, N. P., Shidlovskaya E. V., et al. Alginate gel encapsulated with enzybiotics cocktail is effective against multispecies biofilms //Gels. – 2024. – Vol. 10. – No. 1. – P. 60.

2. Wiegand I., Hilpert K., Hancock R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances // Nat. Protoc. – 2008. – Vol. 3. – No. 2. – P. 163-175.

3. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents //Clin. Microbiol. Infect. – 2000. – Vol. 6. – No. 9. – P. 503-508.

УДК 577.332.23

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ СЕНСОР НА ОСНОВЕ ЖИВЫХ КЛЕТОК БАКТЕРИЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ КИНЕТИКИ И МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ-АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Ломакина Г.Ю., Угарова Н.Н.

МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, РФ
lomakinagalina@yahoo.com

Аннотация. Мы показали перспективность использования биолюминесцентного сенсора на основе живых клеток *E. coli*, продуцирующих термостабильную pH-резистентную люциферазу светляков для изучения эффективности действия антибиотиков одного класса (аминогликозидов) уже на начальном этапе взаимодействия. Метод позволяет одновременно регистрировать изменение жизнеспособности клеток, энергетического статуса, активности рибосом, проницаемости клеточной мембраны в режиме реального времени по содержанию АТР и люциферазы. Метод удобен для быстрого определения МИК, а также незаменим для выявления некультивируемых форм микроорганизмов (персистеров).

Ключевые слова: люцифераза светляков, АТР, жизнеспособность, синтез белка, аминогликозиды

Одной из эффективных мишеней действия антибактериальных агентов являются рибосомы - макромолекулярные платформы, осуществляющие синтез белка, протекающие в четыре стадии: инициация, элонгация, терминация и рециклинг. Несмотря на большие размеры рибосомы, существует небольшое количество участков связывания с антибиотиками, которые на 30S субъединице сгруппированы вдоль пути мРНК и тРНК. На 50S субъединице антибиотики связываются вблизи пептидилтрансферазного центра, где происходит образование пептидных связей. Большинство рибосомных антибиотиков (аминогликозиды, хлорамфениколы, макролиды, линкозамиды, тетрациклины и пр.) нацелены на различные стадии элонгации - доставку аминоацилированной тРНК (аа-тРНК) к А-сайту рибосомы с помощью фактора элонгации Tu (EF-Tu), образование пептидной связи между тРНК А- и Р-сайтов, транслокация тРНК, катализируемая EF-G, и удлинение пептидной цепи. Аминогликозиды, структурной основой которых является 2-дезокси-D-стрептамин, такие как канамицин, гентамицин и неомицин, ингибируют стадию транслокации и расщепление субъединиц на стадии рециклинга рибосом. Кроме того, они могут вызывать трансляционные ошибки считывания. Ингибирование антибиотиком одной из стадий приводит к нарушению синтеза белка и, в конечном счете, к нарушению функционирования клеток и их гибели.

Одним из быстрых, высокочувствительных и селективных методов изучения внешних стимулов на функционирование живых организмов является метод биолюминесцентной АТР-метрии с использованием биолюминесцентной системы светляков, позволяющий позволяющего быстро и точно фиксировать малейшие колебания АТР [1]. Использование в качестве биосенсора живые клетки *Escherichia coli*, продуцирующие мутантную термостабильную люциферазу светляков [2] дает возможность оценить эффективность функционирования рибосом по скорости ее синтеза на рибосомах в режиме реального времени. Учитывая, что антибактериальные агенты воздействуют на АТР-зависимые мишени, измерение уровня АТР и люциферазы внутри и вне клеток (ATP_{in}, ATP_{ex}, Luc_{in}, Luc_{ex}) позволит прогнозировать бактерицидную эффективность агентов и выявлять бактериальную толерантность к антибиотикам

В работе проведено сравнение эффективности действия антибиотиков аминогликозидного ряда - гентамицина, канамицина и неомицина методом биолюминесцентного скрининга на основе живых рекомбинантных клеток *E. coli* BL-21 (DE3) Codon Plus, экспрессирующих термостабильную люциферазу светляков *Luciola mingrelica*, нечувствительную к изменению pH. В процессе роста клеток (37ºC,

10^6 - 10^8 КОЕ/мл) в аэрированных условиях изучали кинетику изменения содержания АТР и активности люциферазы внутри и вне клеток в присутствии аминогликозидов (0 – 100 мкг/мл) [3]. В качестве контроля использовали классический метод посевов разведений на агаризованную питательную среду LB или инокуляцию жидкой ростовой среды.

Определение удельной скорости роста E. coli на начальном этапе взаимодействия

Удельная скорость роста микроорганизмов на начальном этапе инкубации клеток *E. coli* (200 млн КОЕ/мл) в питательной среде LB, определенная по увеличению концентрации ATP_{in}, не зависела от присутствия и природы антибиотиков и составила 0,0153±0,0017 $мин^{-1}$. Скорость увеличения люциферазной активности в тех же образцах составила 0,0127±0,0018 $мин^{-1}$. Однако, длительность линейного участка зависела от структуры и концентрации аминогликозида. Чем он активнее и чем быстрее он проникал внутрь клетки, тем раньше заканчивался начальный линейный участок, после которого наблюдался нелинейный спад ATP_{in} и Luc_{in} и проявлялось его ингибирующее действие. Так, при концентрации агентов 14 мкг/мл продолжительность линейного участка составила 35±3, 45±6 и 55±4 соответственно, для гентамицина, неомицина и канамицина. Механизм проникновения аминогликозидов в клетку до конца не изучен, возможно, используются такие каналы, как mscL [4] задолго до потери целостности мембраны. Тем не менее, хорошо известно, что через 1 ч инкубации практически весь антибиотик перемещается в цитоплазму. Таким образом, надежными аналитическими показателями для оценки эффективности действия стрессора являются показатели, полученные через 1 ч инкубации.

Сравнение эффективности действия аминогликозидов (гентамицина, неомицина и канамицина) на АТР и люциферазу внутри и вне клеток E. coli

В отсутствие эффекторов в питательной среде наблюдался рост клеток - концентрация ATP_{in} и активность люциферазы Luc_{in} в течение 4 ч инкубации закономерно увеличивались, вне клеток активность Luc_{ex} практически отсутствовала и наблюдался незначительный рост концентрации ATP_{ex}, обычно сопровождающий деление клеток. В присутствии антибиотиков наблюдалось доза-зависимое снижение содержания внутриклеточного ATP_{in} и Luc_{ex}, что свидетельствует о подавлении антибиотиками роста клеток и ингибировании рибосом. О необратимой гибели клеток и дисфункции клеточной мембраны свидетельствует накопление Luc_{ex} и ATP_{ex} во внеклеточном пространстве. Следует отметить, что в отличие от мембрано-активных антибиотиков, в присутствии аминогликозидов не наблюдалось падения ATP_{in} до нулевых значений, остаточное содержание ATP_{in} свидетельствует о сохранении клетками жизнеспособности.

Определение МИК гентамицина, неомицина и канамицина.

Расчет минимальных ингибирующих концентраций (МИК) аминогликозидов был проведен по изменению концентрации ATP_{in} и Luc_{in} через 3 ч инкубации с клетками *E. coli* при концентрации клеток 200 млн КОЕ/мл. Рассчитанные МИК по ATP_{in} составили 1,8, 2,0 и 3,5 и по Luc_{in} – 2,0, 2,3 и 3,8 мкг/мл для гентамицина, неомицина и канамицина, соответственно. Полученные значения МИК согласуются с литературными данными и позволяют выявлять отличия в эффективности действия антибиотиков одной группы, имеющих сходное строение. Число и положение гидрокси- и аминогрупп играют существенную роль в активности аминогликозидов. Гидроксильные группы антибиотика улучшают проницаемость клеточной стенки, обеспечивая транспорт внутрь клетки. Аминосахарное кольцо обеспечивает молекулам высокое сродство к А-сайту прокариот. Добавление аминов к неаминовому ядру обычно приводит к значительному увеличению сродства связывания с РНК по сравнению с исходным псевдодисахаридом. Тем не менее, канамицин показал более низкую эффективность по сравнению с остальными агентами. Возможно, внутриклеточная ферментативное фосфорилирование и аденилирование гидроксильных групп и ацетилирование аминогрупп канамицина снижает его действие.

Влияние концентрации клеточной суспензии на эффективность действия антибиотиков

Анализ кинетических зависимостей концентрации АТР и активности люциферазы внутри и вне клеток, полученных при двух концентрациях клеточной суспензии (30 и 250 млнКОЕ/мл) показал,

что при низкой концентрации клеточной суспензии наблюдается существенно более высокая эффективность действия аминогликозида, чем при высокой, и, по-видимому, зависит от его насыщающей концентрации внутри клетки. При этом увеличение времени инкубации не привело к снижению показателей ATP_{in} и A_{in} – часть клеток клетки сохранили жизнеспособность. Действительно, после отделения антибиотика от клеточной массы, ее ресуспендирования в свежей LB среде клетки возобновили деление. Очевидно, при высокой концентрации клеток и низкой концентрации эффектора он ингибирует только часть рибосом, и клетки продолжают функционировать. При высокой концентрации антибиотика происходит полное ингибирование рибосом и запускается механизм клеточной гибели.

Таким образом, эффективность действия антибиотиков является результатом нескольких факторов – транспортом эффектора внутрь клетки, соотношением рибосом и антибиотика, его возможной внутриклеточной модификацией и запуском механизма клеточной гибели.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова (тема № 121041500039-8).

Список литературы

1. Lomakina G. Y., Ugarova N. N. Bioluminescent test systems based on firefly luciferase for studying stress effects on living cells // Biophysical Reviews. — 2022. — Vol. 14. — P. 887–892.
2. Ugarova N. N., Lomakina G. Y. Bioluminescent test systems based on viable cells expressing bacterial luciferase or firefly luciferase // Russian Chemical Bulletin. — 2025. — Vol. 74, no. 8. — P. 2303–2311.
3. Lomakina G. Y., Kaminskaya S. S., Ugarova N. N. A bioluminescent test system based on recombinant *L. mingrelica* firefly luciferase as a means of investigating the efficacy of the gentamicin effect on live e. coli cells // Biophysics. — 2024. — Vol. 69, no. 3. — P. 477–484.
4. Wray R, Iscla I, Gao Y, Li H, Wang J, Blount P. Dihydrostreptomycin Directly Binds to, Modulates, and Passes through the MscL Channel Pore // PLoS Biol. – 2016. – Vol. 14, no. 6. - e1002473

УДК 619:57.088.1:59.083:614.91

ПРИНЦИПЫ УВЕЛИЧЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БЫСТРЫХ ИММУНОХИМИЧЕСКИХ ТЕСТОВ

Лыпенко И.Д., Саушкин Н.Ю., Самсонова Ж.В.

Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
ilya.lypenko@gmail.com

Аннотация. В настоящей работе рассмотрены подходы к увеличению чувствительности иммунофильтрационного анализа (ИФиА) на примере определения сорбированных IgY кур. Для получения визуального сигнала в качестве меток использовали наночастицы золота (НЧЗ) или фермент (пероксидазу хрена, ПХ). Для ферментной метки рассматривали разные варианты субстратов, усиление сигнала для НЧЗ достигали за счет укрупнения частиц. Среди рассмотренных подходов наиболее эффективным было укрупнение НЧЗ, что позволило снизить визуальный предел обнаружения на два порядка.

Ключевые слова: ИФиА, наночастицы золота, пероксидаза хрена, увеличение чувствительности.

Введение. Быстрые тесты, как правило, обладают меньшей чувствительностью, чем инструментальные методы анализа [1]. Увеличение чувствительности таких тестов является одним из приоритетных направлений развития экспресс-диагностики. Основные подходы к увеличению чувствительности – это использование разнообразных меток, таких как магнитные или флуоресцентные метки [2], а также субстратов, например, хемилюминесцентных [3], и их выявление высокочувствительными инструментальными методами. Также описаны подходы к усилению сигнала в аналитической зоне после первичного связывания метки, а именно: усиление металлами [1], укрупнение связавшихся НЧЗ [1,4]. Описан метод, основанный на увеличении числа связавшихся в аналитической зоне НЧЗ за счет их предварительной модификации [5].

Цель работы состояла в сравнении различных подходов к снижению предела визуальной детекции иммунофильтрационного анализа (ИФиА) на модельной системе определения IgY кур, сорбированных на аналитическую мембрану. В работе рассматривали два вида меток (НЧЗ или фермент) и несколько субстратных растворов.

Материалы и методы. Для использования в ИФиА растворы IgY кур с последовательно уменьшающейся концентрацией (от 500 мкг/мл) сорбировали в виде матрицы круговых зон размером 475±30 мкм на нитроцеллюлозной мембране CLW-040-SH34, диаметр пор 0,8 мкм («MDI», Индия). Нанесение IgY на мембраны проводили на приборе «XactII Microarray System» («LabNEXT», США). ИФиА проводили, используя пластиковые кассеты, в которые была помещена аналитическая и впитывающие мембраны. Конъюгат антивидовых антител против IgY кур с меткой наносили сверху мембраны и после полного впитывания, проводили стадию промывки. Усиление визуального сигнала для НЧЗ-метки (красная окраска) проводили с использованием реакции восстановления золотохлористоводородной кислоты (ЗХВК) гидроксиламином (ГА) на поверхности НЧЗ (красно-черная окраска). Для получения колориметрического сигнала (синяя окраска) использовали субстратные растворы для ПХ на основе 3,3′,5,5′-тетраметилбензидина (ТМБ) и перекиси водорода (водный и водно-органический). Для ПХ также использовали субстратную смесь на основе люминола и перекиси водорода для осуществления реакции усиленной хемилюминесценции.

Основные результаты.

В работе проводили выявление IgY кур, сорбированных на аналитической мембране в круговых зонах с последовательно уменьшающейся концентрацией, посредством взаимодействия с конъюгатом антивидовых антител с меткой, ПХ или НЧЗ. После проведения анализа на аналитической мембране формируются окрашенные круговые зоны, интенсивность окраски которых зависит от количества иммобилизованных IgY и эффективности системы детекции. При использовании ПХ в качестве метки необходима дополнительная стадия генерации аналитического сигнала за счет окисления субстрата

(колориметрический или хемилюминесцентный сигнал). В случае использования НЧЗ визуальный сигнал может быть усилен за счет укрупнения частиц.

Внешний вид аналитических мембран после проведения анализа представлен на рис. 1. Для ферментной метки использование водного раствора ТМБ (рис. 1Г) обеспечивало визуальную регистрацию сигнала преимущественно в области высоких и средних концентраций IgY. Применение водно-органического раствора ТМБ с повышенным содержанием растворённого субстрата (рис. 1Д) сопровождалось увеличением интенсивности окраски и снижением предела визуального обнаружения в 20 раз (табл. 1). При использовании хемилюминесцентного субстрата на основе люминола (рис. 1Е) чувствительность ИФиА уступала другим исследованным вариантам, что, вероятно, связано с недостаточной оптимизацией состава реакционной смеси и параметров регистрации сигнала. При использовании НЧЗ возможно проводить определение IgY с визуальным перелом обнаружения сравнимым с использованием ферментной метки (табл. 1), при этом не требуется дополнительной стадии генерации сигнала. При этом, после обработки НЧЗ оптимизированной усиливающей смесью на основе ЗХВК/ГА интенсивность сигнала резко возрастала за счет укрупнения наночастиц в составе иммунокомплекса и изменения окраски на более контрастную (рис. 1Б и1В), а число визуально видимых точек было максимальным среди всех исследованных методов детекции. Данный подход позволил снизить предел визуального обнаружения в 100 раз по сравнению с немодифицированным НЧЗ-конъюгатом.

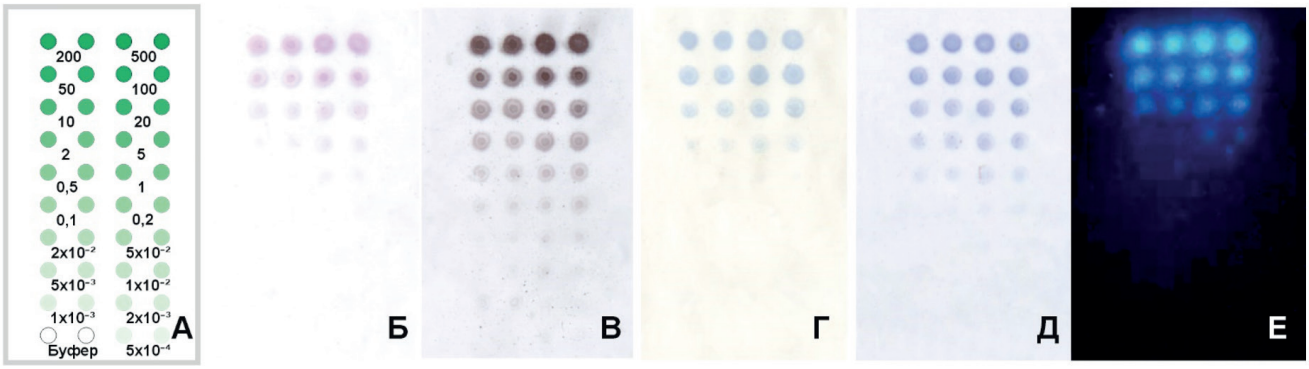


Рисунок 1. Внешний вид аналитической мембраны после проведения анализа с использованием различных систем детекции. А – схема нанесения IgY (мкг/мл) на аналитическую мембрану; Б – НЧЗ; В – НЧЗ, усиленные ГА; Г – ПХ и водный ТМБ; Д - ПХ и водно-органический ТМБ; Е –ПХ и субстрат на основе люминола.

Таблица 1. Сравнение различных методов получения аналитического сигнала.

Метка	Аналитический сигнал	Кол-во стадий	Время анализа, мин	Предел визуального обнаружения IgY, мкг/мл	Особенности проведения анализа
НЧЗ	Визуальный	1	6	1	Нет дополнительных стадий для получения визуального сигнала
НЧЗ	Усиление сигнала с использованием ГА	2	27	0,01	Дополнительная стадия укрупнения НЧЗ
ПХ	Субстратный раствор на основе ТМБ (водный раствор)	2	21	2	Дополнительная стадия для проведения колориметрической реакции

ПХ	Субстратный раствор на основе ТМБ (водно-органический раствор)	2	21	0,1	-«-
ПХ	Субстратный раствор на основе люминола	2	21	5	Дополнительная стадия для получения люминесцентного сигнала, необходима съемка в темноте на смартфон

Таким образом, было проведено сравнение различных способов получения аналитического сигнала в ИФиА с использованием фермента или НЧЗ в качестве меток. Показано, что наибольшую чувствительность обеспечивает использование НЧЗ с последующим усилением сигнала за счет укрупнения частиц в составе иммунокомплекса. Использование реакции усиленной хемилюминесценции обуславливает необходимость проведения как оптимизации субстратной смеси для проведения мембранного анализа, так и параметров регистрации сигнала для полной реализации потенциала данного подхода.

Исследование выполнено в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова, регистрационный номер 121041500039-8.

Список литературы

1. Panferov V.G., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Post-assay chemical enhancement for highly sensitive lateral flow immunoassays: A critical review // Biosensors. – 2023. – Vol. 13. – No. 9. – Art. 866.
2. Mirica A-C et al. Latest trends in lateral flow immunoassay (LFIA) detection labels and conjugation process. // Frontiers Bioengineering and Biotechnology. – 2022. – Vol. 10. – Art. 992772.
3. Calabria D. et al. Recent advancements in enzyme-based lateral flow immunoassays. // Sensors. – 2021. – Vol. 21. – No. 10. – Art. 3358.
4. Presnova G.V., Zhdanov G.A., Filatova L.Y., Ulyashova M.M., Presnov D.E., Rubtsova M.Y. Improvement of seed-mediated growth of gold nanoparticle labels for DNA membrane-based assays. // Biosensors. – 2023. – Vol. 13. – No. 1. Art. 2.
5. Самсонова Ж.В., Лыпенко И.Д., Саушкин Н.Ю., Осипов А.П. Агломераты золотых наночастиц на основе системы биотин–стрептавидин для латерального проточного иммуноанализа. // Российские нанотехнологии. – 2024. – Т. 19. - № 2. – С. 251-263.

УДК 577.15+612.017+623.459.82

БИОКАТАЛИТИЧЕСКАЯ ДЕТОКСИФИКАЦИЯ МИКОТОКСИНОВ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПОТЕНЦИАЛ ДЛЯ ЖИВОТНОВОДСТВА

Лягин И.В., **Ефременко Е.Н.**

Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
lyagin@enzyme.chem.msu.ru

Аннотация. В докладе приведен обзор современного состояния исследований в области очистки сельскохозяйственных кормов, контаминированных смесями различных микотоксинов. Биокаталитическая конверсия таких мультисубстратных смесей возможна, но пока что слабо представлена в виде конкретных продуктов. Имеется значимый потенциал для активного роста в этой области агротехнологий.

Ключевые слова: биодеградация, добавка, микотоксин, сельское хозяйство, фермент.

Микотоксины продуцируются различными грибами и обладают самой разнообразной структурой и токсичностью. Многие или даже все из них могут быть эффективно детоксифицированы с помощью ферментных биокатализаторов [1]. Так как помимо эффективности действие многих ферментов ещё и специфично, то интерес к таким каталитическим системам только увеличивается, а число успешных примеров – постоянно растёт. Уровень современного развития в данной области уже позволил перейти к лабораторным испытаниям на животных моделях, за которыми должно следовать уже внедрение на практике в ближайшей перспективе. В данной работе представлены примеры высокой степени готовности, которые показали позитивные результаты и выглядят многообещающе для практической реализации.

Одним из главных отличий реальных систем от тестовых лабораторных является наличие матрицы, которая контаминирована сразу несколькими микотоксинами [2]. Как следствие, биокаталитическая система оказывается оптимизирована для действия в отношении единичных субстратов. Кроме того, упоминавшаяся субстратная специфичность ферментов в случае смесей микотоксинов начинает выглядеть скорее отрицательной характеристикой. Конечно, ряд ферментов – наподобие лакказ, пероксидаз и других оксидоредуктаз [3] – способен проявлять широчайшую субстратную специфичность, но обычно это сопровождается резким снижением удельной активности. Простейшим решением является объединение нескольких высокоактивных ферментов в одном препарате [4]. Так, комбинация 0,01 мг/кг термолизина и 0,01 мг/кг гексагистидин-содержащей органофосфатгидролазы [5] позволила нивелировать токсическое действие смеси 1,5 мг/кг дезоксиниваленола (DON), 1,5 мг/кг охратоксина А (OCH) и 7,5 мг/кг зеараленона (ZEN) на модели крыс. Для сравнения: эти уровни в 1,5–300 раз превышали уровни, допустимые в пищу и/или корма. Также следует отметить, что эти ферменты вводились в корм в виде фермент–полиэлектролитных комплексов, которые могут включать ряд других ферментов [6].

Помимо комбинаций нескольких ферментов, возможно их объединение с химическими агентами, например: зеараленонгидролаза ZenA (0,6 г/кг) и $Na_2S_2O_5$ (2,5 г/кг) [7]. Фермент должен был гидролизовать ZEN (0,24 мг/кг), в то время как пиросульфит – сульфатировать DON (2,6 мг/кг). Однако на модели поросят, которые к тому же обладают гиперчувствительностью к эстрогеноподобной токсичности ZEN, такая комбинация оказалась недостаточно эффективной.

Гораздо большее количество работ посвящено использованию ферментов в комбинации одновременно с неорганическими носителями, бактериями, дрожжами и прочими экстрактами. Пожалуй, одной из первых основательных работ было исследование 20 различных существовавших на тот момент на рынке «биологически активных» добавок [8]. Показательно, что лишь одна из этих добавок (в концентрации 5 мг/л и лишь в анаэробных условиях) одновременно элиминировала DON (5 мг/л) и

ZEN (2 мг/л). Это дало толчок интенсивным исследованиям, которые увенчались разработкой добавки Mycofix, которая помимо перечисленных выше компонентов содержит фумонизингидролазу FumD [9]. В исследовании молочных коров (голштинской породы) непрерывно кормили кормом, контаминированным DON (0,9 мг/кг), фумонизинами B (FB, 1,25 мг/кг), афлатоксином B1 (AFB, 0,5 мкг/кг), HT-2 токсином (6,1 мкг/кг), OCH (1,5 мкг/кг), T-2 токсином (47 мкг/кг) и ZEN (31 мкг/кг), т.е. в пределах норм. Это негативно сказалось на их продуктивности, качестве молока и физиологическом состоянии, что удалось отчасти компенсировать добавкой Mycofix в дозе 35 г/сут. В той работе не контролировалось содержание микотоксинов в самих животных, что было компенсировано в последующей [10]: потребление корма, контаминированного смесью AFB (0,4 мг/сут), DON (5,03 мг/сут), FB (8,05 мг/сут), T-2 (0,2 мг/сут) и ZEN (2,03 мг/сут), приводило к их детектируемым количествам в крови, моче и особенно в молоке. Добавка Mycofix в дозе 30 г/сут. снижала AFB до минимальных концентраций, а остальные микотоксины – ниже уровня их детекции. Причём более чем двукратное увеличение AFB (0,95 мг/сут) и FB (30,4 мг/сут) совместно с двукратной дозой Mycofix (60 г/сут.) [11] приводило к 36-кратному росту концентрации AFB и его метаболитов в молоке и плазме крови. Это свидетельствует о достижении максимальной ёмкости вводимого адсорбента, и чтобы сорбировать более высокие концентрации микотоксинов, требуется кратно увеличивать его количество. Ещё более эффективным было бы введение ферментативных компонентов, действующих на эти типы микотоксинов.

Похожие результаты с добавкой Mycofix (2 г/кг и 12 мг/кг FumD) были получены на модели цыплят бройлеров [12], потреблявших корм, контаминированный AFB и FB (0,22 и 17,4 мг/кг, соответственно), а также кур-несушек (0,55 и 7,9 мг/кг, соответственно) [13]: некоторое улучшение агротехнологических характеристик наблюдалось, но оно было весьма ограниченное, так как AFB не подвергался дополнительной биокаталитической детоксификации. Как следствие, в ещё более сложной смеси AFB (3 мкг/кг), DON (1,2 мг/кг), FB (2,3 мг/кг), OCH (4 мкг/кг), T-2 токсином (64 мкг/кг) и ZEN (64 мкг/кг) эта добавка (в дозе 1,5 г/кг) оказалась практически бесполезной [14].

Таким образом, требуется исчерпывающая детоксификация всех микотоксинов, присутствующих в смеси – от наиболее токсичных до малотоксичных – так как они могут проявлять, в том числе, синергетическое действие. Существующие комплексные добавки можно считать скорее бесполезными, и требуется их качественная модернизация.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В.Ломоносова (121041500039-8).

Список литературы

1. Ефременко Е.Н., Лягин И.В., Степанов Н.А., Маслова О.В., Сенько О.В., Асланлы А.Г., Домнин М.В. Ферменты против микотоксинов. – М.: Издательский дом «НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА», 2025. – 286 с. – ISBN 978-5-907954-24-3.
2. Lyagin I., Efremenko E. Enzymes for Detoxification of Various Mycotoxins: Origins and Mechanisms of Catalytic Action // Molecules. – 2019. – Vol. 24. – No. 13. – Art. e2362, doi: 10.3390/molecules24132362.
3. Lyagin I., Maslova O., Stepanov N., Senko O., Efremenko E. Reassessing of enzymes degrading mycotoxins at acidic pH // Int. Biodeter. Biodegr. – 2025. – Vol. 198. – Art. e105994, doi: 10.1016/j.ibiod.2024.105994.
4. Lyagin I., et al. Not a Mistake but a Feature: Promiscuous Activity of Enzymes Meeting Mycotoxins.// Catalysts. – 2022. – Vol. 12. – No. 10. – Art. e1095, doi: 10.3390/catal12101095.
5. Lyagin I., Maslova O., Stepanov N., Efremenko E. Degradation of mycotoxins in mixtures by combined proteinous nanobiocatalysts: *In silico*, *in vitro* and *in vivo* // Int. J. Biol. Macromol. – 2022. – Vol. 218. – P. 866–877, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.07.179.
6. Lyagin I., Efremenko E. Computer-aided design of enzyme–polyelectrolyte complexes for mycotoxin degradation at acidic pH // Bioorg. Chem. – 2025. – Vol. 165. – Art. e108944, doi: 10.1016/j.bioorg.2025.108944.
7. Dänicke S. et al. Inactivation of zearalenone (ZEN) and deoxynivalenol (DON) in complete feed for weaned piglets: Efficacy of ZEN hydrolase ZenA and of sodium metabisulfite (SBS) as feed additives // Mycotoxin Res. – 2023. – Vol. 39. – No. 3. – P. 201–218, doi: 10.1007/s12550-023-00486-2.
8. Hahn I. et al. Aerobic and anaerobic in vitro testing of feed additives claiming to detoxify deoxynivalenol and zearalenone // Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess. – 2015. – Vol. 32. No.

6. – P. 922–933, doi: 10.1080/19440049.2015.1023741.
9. Gallo A. et al. A mycotoxin-deactivating feed additive counteracts the adverse effects of regular levels of Fusarium mycotoxins in dairy cows // J. Dairy Sci. – 2020. – Vol. 103. – No. 12. – P. 11314-11331, doi: 10.3168/jds.2020-18197.
10. Vieira D.J.C. et al. Anti-mycotoxin feed additives: Effects on metabolism, mycotoxin excretion, performance, and total-tract digestibility of dairy cows fed artificially multi-mycotoxin-contaminated diets // J. Dairy Sci. – 2024. – Vol. 107. – No. 10. – P. 7891–7903, doi: 10.3168/jds.2023-24539.
11. Kemboi D. et al. Efficacy of Bentonite and Fumonisin Esterase in Mitigating the Effects of Aflatoxins and Fumonisins in Two Kenyan Cattle Breeds // J. Agric. Food Chem. – 2023. – Vol. 71. – No. 4. – P. 2143–2151, doi: 10.1021/acs.jafc.2c08217.
12. Ochieng P.E. et al. Effects of Aflatoxins and Fumonisins, Alone or in Combination, on Performance, Health, and Safety of Food Products of Broiler Chickens, and Mitigation Efficacy of Bentonite and Fumonisin Esterase // J. Agric. Food Chem. – 2023. – Vol. 71. – No. 36. – P. 13462–13473, doi: 10.1021/acs.jafc.3c01733.
13. Ochieng P.E. et al. Aflatoxins and fumonisins co-contamination effects on laying hens and use of mycotoxin detoxifiers as a mitigation strategy // Mycotoxin Res. – 2025. – Vol. 41. – No. 1. – P. 63–75, doi: 10.1007/s12550-024-00566-x.
14. Riboty R., Huaringa D. Evaluation of Two Mycotoxin-Detoxifying Agents in Broilers Fed Naturally Contaminated Corn with Elevated Mycotoxin Levels // J. Appl. Poult. Res. – 2026. – Vol. 35. – Art. 100644, doi: 10.1016/j.japr.2025.100644.

УДК 577.151 : 544.473 : 579.24

УГЛЕРОДНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ КАК НОСИТЕЛИ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ: ОТ БИОКАТАЛИЗА ДО АНТИБИОПЛЕНОЧНЫХ АГЕНТОВ

Максимова Ю.Г.[1,2], **Панькова А.А.**[1,2], **Максимов А.Ю.**[1,2]

[1] *«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, г. Пермь, РФ*
[2] *Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, РФ*
yul_max@mail.ru

Аннотация. Доклад посвящен возможностям использования углеродных наноматериалов в биокатализе. Рассматривается иммобилизация нитрилгидратаз и амидаз, а также микробных клеток с этими ферментативными активностями на углеродных наночастицах, оценено влияние функционализации углеродных нанотрубок на связывание биокатализатора и сохранение активности. Установлено, что протеазы, конъюгированные с наноуглеродом, могут служить антибиопленочными агентами и снижать биомассу формирующихся и зрелых биопленок *E. coli*.

Ключевые слова: углеродные наноматериалы, многостенные углеродные нанотрубки, биокатализ, протеазы, нитрилгидратаза, амидаза, биопленки

Углеродные наноматериалы, к которым относятся углеродные нанотрубки, графен и его производные (оксид и его восстановленная форма), а также фуллерены, обладают уникальными физико-химическими свойствами, большой площадью удельной поверхности, инертностью и биосовместимостью [1]. При этом известно антимикробное и антибиопленочное действие этих материалов [2, 3]. Иммобилизация биокатализаторов значительно улучшает технологические характеристики процесса и обеспечивает защиту фермента от воздействия окружающей среды. В зависимости от целей – выбор носителя для иммобилизации биокатализатора или разработка антибиопленочных агентов – был проведен скрининг углеродных наноматериалов.

Цель исследования заключалась в сравнении углеродных наноматериалов и выборе наиболее предпочтительных для иммобилизации ферментов и бактериальных клеток, осуществляющих гидратацию нитрилов и гидролиз амидов, с целью сохранения их активности, а также в разработке нанобиокатализаторов на основе протеаз, конъюгированных с углеродными наночастицами, для воздействия на биопленки грамотрицательных бактерий.

Ферментный препарат грубой очистки, содержащий нитрилгидратазу и амидазу, получали из клеток *Rhodococcus ruber* gt 1 и *Alcaligenes faecalis* 2. Белок адсорбировали на многостенных углеродных нанотрубках (МУНТ), функционализированных группами -OH, -NH_2 и -SH. Массу адсорбированного белка определяли методом Бредфорда по разнице концентрации в растворе до и после иммобилизации. Клетки *R. ruber* gt 1 и *A. faecalis* 2 агрегировали с наноматериалами. Активность ферментов оценивали в реакции трансформации акрилонитрила до акриламида и акриламида до акриловой кислоты. Концентрацию продуктов реакции определяли методом ВЭЖХ на хроматографе Infinity II LC 1260 (Agilent, Германия).

Протеазы адсорбировали на карбоксилированных многостенных углеродных нанотрубках (МУНТ-СООН, Нанотехцентр, Россия), графеновых нанопластинах, оксиде графена и восстановленном оксиде графена (Русграфен, Россия). Углеродный наноматериал, сочетающий высокую адсорбционную способность по отношению к белку и наилучшие технологические характеристики, использовали для разработки антибиопленочного агента. Биомассу биопленок оценивали по $ОП_{540}$ экстрагированного красителя кристаллического фиолетового.

Определена масса клеток, агрегированных с МУНТ, содержащими группы -OH, -NH_2 и -SH, а также нитрилгидратазная и амидазаная активность иммобилизованных биокатализаторов [4]. Установлено, что наибольшая масса клеток (70-80 мг/г) агрегировала с МУНТ-NH_2, при этом наибольшая амидазная активность была выше у клеток, агрегированных с МУНТ-SH (рис. 1 а, б).

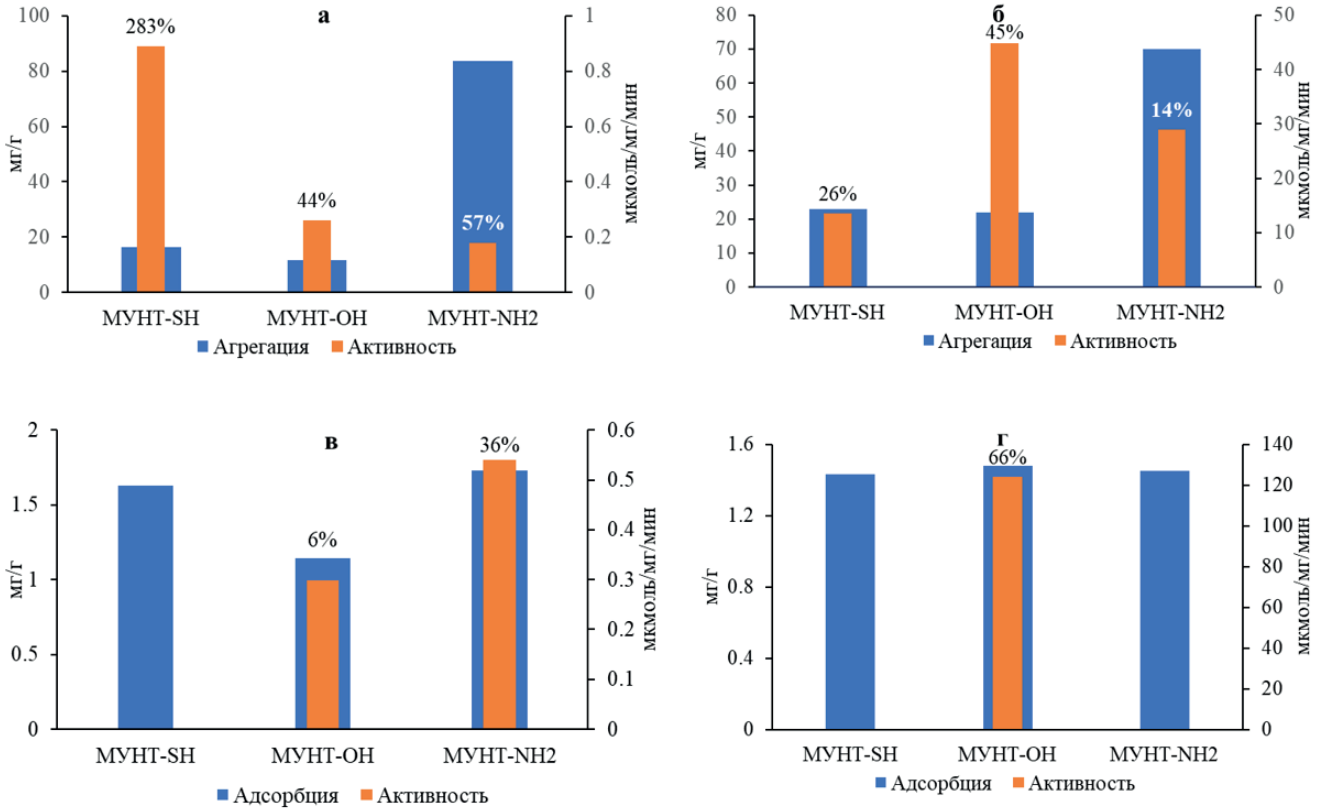


Рисунок 1. Величина агрегации (мг/г) клеток *A. faecalis* 2 (а) и *R. ruber* gt 1 (б); адсорбции (мг/г) амидазы (в) и нитрилгидратазы (г) и активность иммобилизованных биокатализаторов (мкмоль/мг/мин). На диаграммах показано сохранение активности клеток (фермента) при иммобилизации (%)

Агрегация *A. faecalis* 2 и *R. ruber* gt 1 с МУНТ-OH и МУНТ-SH находилась в пределах от 11 до 23 мг/г, наибольшую нитрилгидратазную активность у клеток отмечали при связывании с МУНТ-OH. В целом, активность агрегированных с МУНТ клеток не ингибируется.

Величина адсорбции амидазы на разных наноматериалах отличалась незначительно, но активность ферментов на МУНТ-SH не проявлялась (рис. 1, в). Наибольшую активность амидазы отмечали при адсорбции на МУНТ-NH_2. Таким образом, для клеток все изученные носители могли быть применимы, тогда как наиболее предпочтительным для адсорбции нитрилгидратазы и амидазы и сохранения активности ферментов был МУНТ-OH; МУНТ-NH_2 также мог быть использован для иммобилизации амидазы.

Установлено, что наибольшей сорбционной емкостью (до 80%) по отношению к щелочной протеазе обладает восстановленный оксид графена. Также значительная сорбционная емкость по отношению к этому ферменту наблюдается у оксида графена и МУНТ-COOH. Однако МУНТ-COOH не только эффективно сорбировал белок, но и обладал хорршей диспергируемостью, что позволило сделать выбор в пользу этого наноматериала. Кислые и щелочные протеазы конъюгировали с МУНТ-COOH, при этом эффективность иммобилизации кислой протеазы была выше, чем щелочной. Иммобилизованная на МУНТ-COOH кислая протеаза снижала формирование биопленки *E. coli* более чем в 2,7 раза по сравнению с контролем и нативным ферментом, тогда как по сравнению с нативной щелочной протеазой ее конъюгаты снижали биомассу биопленки *E. coli* в меньшей степени. Нативная щелочная протеаза и ее конъюгаты на МУНТ-COOH разрушали зрелые биопленки *E. coli*: биомасса снижалась в два и пять раз соответственно. В то же время кислая протеаза была неэффективна для разрушения биопленок.

Несмотря на то что ее иммобилизация на МУНТ-COOH усиливала этот процесс, общая биомасса биопленки оставалась на уровне контроля.

Таким образом, функционализированные МУНТ являются перспективным носителем для иммобилизации ферментов, как для целей биокатализа, так и для воздействия на нежелательные микробные биопленки, которое выражается в предотвращении их образования и разрушении зрелых структур.

Работа поддержана госзаданием, номер госрегистрации 124020500028-4 и грантом РНФ 24-24-20008, Пермский край, https://rscf.ru/en/project/24-24-20008/.

Список литературы

1. Thakur A., Bharti R., Sharma, R. Carbon nanotubes: Types, synthesis, cytotoxicity and applications in biomedical // Materials Today: Proceedings. – 2022. – Vol. 50. – P. 2256–2268.
2. Young Y.-F., Lee H.-J., Shen Y.-S., Tseng S.-H., Lee C.-Y., Tai N.-H., Chang H.-Y. Toxicity mechanism of carbon nanotubes on *Escherichia coli* // Materials physics and chemistry. – 2012. – Vol. 134. – P. 279–286.
3. Rodrigues D.F., Elimelech M. Toxic effects of single-walled carbon nanotubes in the development of *E. coli* biofilm // Environmental Science & Technology. – 2010. – Vol. 44. – P. 4583–4589.
4. Maksimova Yu.G., Shklyaeva E.V., Pyankova E.V., Smolentseva O.M., Trushina U.A., Maksimov A.Yu. On the functionalization of multi-walled carbon nanotubes and their application in nanobiocatalysis // Nanobiotechnology Reports. – 2024. – Vol. 19. – No. 6. – P. 929–936.

УДК 579.222.4

УСТОЙЧИВЫЙ КАТАЛИЗАТОР НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОК *RHODOCOCCUS RHODOCHROUS* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ (–)-ИЗОПУЛЕГОЛА

Мальцева П.Ю.[1,2], Плотницкая Н.А.[1,2], Чудинова А.А.[2], Ившина И.Б.[1,2]

[1] Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН, г. Пермь, РФ
[2] Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, РФ
inbox.98@bk.ru

Аннотация. Разработан стабильный катализатор на основе иммобилизованных в матрицу ПВС клеток *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 1362 для получения биоактивных производных (–)-изопулегола. Полученный биокатализатор сохраняет высокую функциональную активность в течение 13 циклов эксплуатации и способствует повышению общего выхода целевых продуктов с 54 до 87% за один цикл.

Ключевые слова: биотрансформация, (–)-изопулегол, иммобилизация, поливиниловый спирт, *Rhodococcus rhodochrous.*

(–)-Изопулегол – монотерпеновый спирт, широко применяемый в качестве молекулярного каркаса для синтеза биологически активных веществ благодаря своей низкой стоимости и высокой степени доступности [1]. Ранее нами был отобран штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362, способный к трансформации (–)-изопулегола (**1**) с образованием (1*R*,2*S*,5*R*)-5-(гидроксиметил)-2-(проп-1-ен-2-ил)циклогексанола (диол **2**) и (1*R*,3*R*,4*S*)-3-гидрокси-4-(проп-1-ен-2-ил)циклогексанкарбоновой кислоты (гидроксикислота **3**) [2] (Рисунок 1). Для обоих соединений была спрогнозирована противоопухолевая и аналептическая активность. Однако общий выход целевых продуктов составлял 25%, что представляет относительно низкое значение и указывает на необходимость оптимизации технологического процесса. Одним из распространенных и активно применяемых способов оптимизации бактериальной трансформации сложных органических соединений является иммобилизация бактериальных клеток на поверхности или в матрице носителя [3,4]4-diethoxybenzylidene.

Цель настоящей работы – оптимизация процесса биотрансформации (–)-изопулегола с использованием иммобилизованных клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 для получения биоактивных соединений.

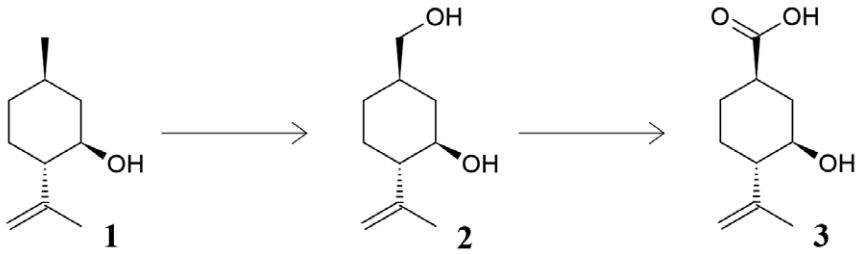


Рисунок 1. Биотрансформация (–)-изопулегола свободными клетками R. rhodochrous ИЭГМ 1362 [2]

На основе иммобилизованных в криогель поливинилового спирта (ПВС) родококков разработан устойчивый биокатализатор, обеспечивающий увеличение общего выхода целевых продуктов (–)-изопулегола с 54 до 87% за один цикл по сравнению со свободными клетками. Основными продуктами

биотрансформации являлись диол (**2**), гидроксикислота (**3**) и (*S*)-эпоксид изопулегола с преимущественным образованием гидроксикислоты (Рисунок 2). Биокатализатор сохраняет высокую функциональную активность в течение 13 циклов эксплуатации, что отвечает требованиям промышленной биотехнологии.

С использованием методов электронной микроскопии и элементного картирования установлено, что иммобилизованные клетки характеризуются отсутствием эндогенных резервных включений, а также высоким содержанием внутриклеточного железа.

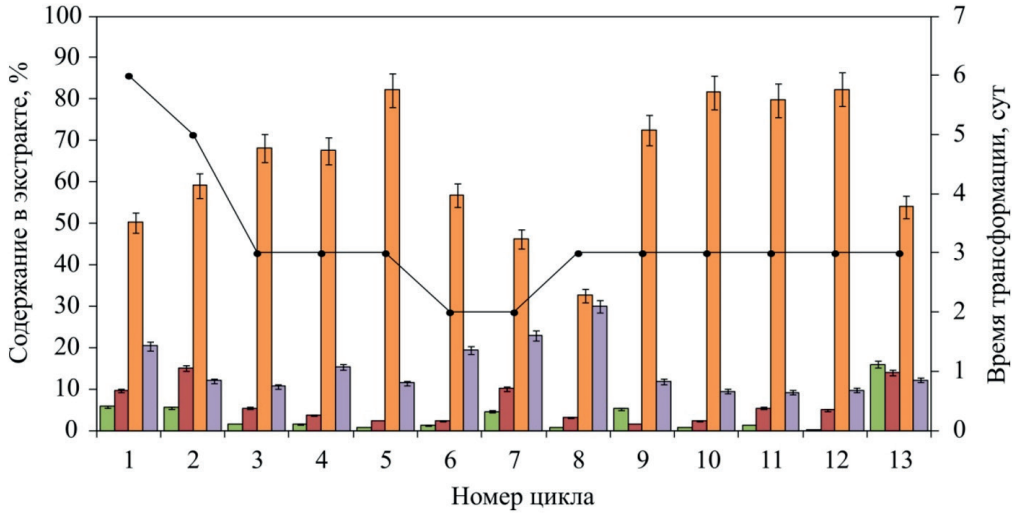


Рисунок 2. Биотрансформация (–)-изопулегола иммобилизованными клетками R. rhodochrous ИЭГМ 1362: – (–)-изопулегол; – диол; – гидроксикислота; – (S)-эпоксид изопулегола; – время трансформации, сут

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о целесообразности применения иммобилизованных в матрице ПВС клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362 для эффективного получения биоактивных производных монотерпеноида (–)-изопулегола. Перспективным направлением дальнейших исследований является оптимизация данного биокаталитического процесса, а также интеграция иммобилизованных клеточных систем в реакторы непрерывного действия для масштабирования процесса синтеза фармацевтически значимых производных монотерпеноидов.

Исследования выполнены в рамках гранта РНФ № 24-14-20015.

Список литературы

1. Minh Le T., Szakonyi Z. Enantiomeric isopulegol as the chiral pool in the total synthesis of bioactive agents // Chemical Record. – 2022. – Vol. 22. – Art. e202100194.

2. Ivshina I.B., Luchnikova N.A., Maltseva P.Y., Ilyina I.V., Volcho K.P., Gatilov Y.V., Korchagina D.V., Kostrikina N.A., Sorokin V.V., Mulyukin A.L., Salakhutdinov N.F. Biotransformation of (–)-isopulegol by *Rhodococcus rhodochrous* // Pharmaceuticals. – 2022. – Vol. 15. – Art. 964.

3. Ivshina I.B., Vikhareva E. V., Richkova M.I., Mukhutdinova A.N., Karpenko J.N. Biodegradation of drotaverine hydrochloride by free and immobilized cells of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 608 // World journal of microbiology & biotechnology. – 2012. – Vol. 28. – P. 2997–3006.

4. Kylosova T.I., Elkin A.A., Grishko V. V., Ivshina I.B. Biotransformation of prochiral sulfides into (*R*)-sulfoxides using immobilized *Gordonia terrae* IEGM 136 cells // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2016. – Vol. 123. – P. 8–13.

УДК 376:15

ХИМИКО-БИОКАТАЛИТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРОВ: ПОДХОДЫ, КИНЕТИКА, РЕЗУЛЬТАТЫ

Маслова О.В.[1], Сенько О.В.[1,2], Степанов Н.А.[1,2], Асланлы А.Г.[1], Ефременко Е.Н.[1,2]

[1] Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г.Москва, РФ
[2] Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, г.Москва, РФ
olga.maslova.rabota@gmail.com

Аннотация. Для защиты окружающей среды от загрязнения микрополлютантами жизненный цикл современных полимеров должен включать в себя не только безопасные ресурсосберегающие технологии синтеза, но и решения по рациональной утилизации или трансформации полимерных отходов. Гибридные процессы на основе химико-биокаталитической трансформации синтетических полимеров разрабатываются для применения на завершающих этапах «жизненного цикла» полимеров. Их реализация подразумевает обработку полимеров под действием химических агентов и последующую биотрансформацию полученных сред под действием разных биокатализаторов. Были подобраны условия для полного разрушение поликапролактона. Включение компонентов полученного раствора в состав культуральных сред позволил с применением микробных биокатализаторов получить компоненты биотоплив. Предложенный подход может быть рекомендован для аналогичной трансформации других синтетических полиэфирных полимеров.

Ключевые слова: полиэфиры, поликапролактон, щелочной гидролиз, биокатализаторы, гибридные каталитические процессы.

Развитие потенциала импортозамещения в химической промышленности РФ неуклонно связано с расширением производственных мощностей отрасли отечественной полимерной химии [1]. При этом не менее важно обеспечить надежную платформу для защиты окружающей среды от микрополлютантов в виде микропластиков, образующихся при разложении полимерных отходов. Уже достигнуты определенные успехи в этом направлении. Например, основные пути химической трансформации полиэтилентерефталата на пути утилизации/рециклинга отходов этого синтетического полимера (СП) - гидролиз, алкоголиз, гликолиз, пиролиз, аминолиз и гидрогенолиз [2]. Химические подходы к переработке отходов полимеров по сравнению с биокаталитическими отличаются меньшими временными затратами (чаще всего не более нескольких суток), но почти всегда несут существенную экологическую нагрузку и достаточно энергозатратны, температурный режим – до 1000°C [2,3]. Осуществлять трансформацию СП с низкой нагрузкой на экологию возможно с применением биокатализа. Отдельные ферменты, ферментные комплексы, целые клетки, продуцирующие природные или рекомбинантные оксидоредуктазы и гидролазы, а также природные и искусственные консорциумы микроорганизмов могут обеспечивать биотрансформацию СП [4-6]. Полилактиды достаточно успешно разлагаются липазами, эстеразами и кутиназами, секретируемыми клетками микроорганизмов в природных условиях [7]. Длительность процесса деструкции полимерных цепей с высокой молекулярной массой остается одним из ограничивающих факторов для применения биокатализа в этом направлении [8].

Известен пример биокаталитической трансформации поликапролактона (ПКЛ) в составе среды М9 клетками *Rhodococcus erythropolis* и *Rhodococcus opacus* при 30°C. Деградация ПКЛ обеспечивалась в течение 42 суток, и основными продуктами метаболизма были С9-С20 карбоновые кислоты, кетоны (2-нонадеканон и 2-гептакозанон) и С19–С28 алифатические углеводороды [5].

Для снятия существующих временных ограничений для процессов деградации синтетических полимеров и сокращения их длительности все активнее исследуются возможности применения гибридных химико-биокаталитических процессов, которые включают в себя предварительную физико-

химическую обработку СП с их деструкцией до промежуточных соединений и их последующей биокаталитической трансформацией в конечные продукты деградации [6,9].

При разработке нового гибридного процесса трансформации СП в качестве основного объекта исследования был выбран ПКЛ. Способ получения ПКЛ и молекулярная масса полимера влияли на скорость его химического разложения. Ссредняя скорость химического разложения разных образцов ПКЛ составляла 2,8-4,3 г/л/ч [9].

Полученные после деструкции различных образцов ПКЛ растворы использованы в качестве компонентов культуральных сред для роста различных микроорганизмов и биотрансформации в разные продукты: биогаз, бактериальная наноцеллюлоза, биомасса клеток бактерий-нефтедеструкторов и микроводорослей. Установлено, что для накопления биогаза с использованием анаэробных илов в средах с гидролизатами ПКЛ предпочтительнее проводить процесс в термофильных условиях, поскольку в этом случае все образцы гидролизатов ПКЛ трансформировались в биогаз эффективнее по сравнению с контролем. В мезофильных условиях метаногенез ингибировался всеми вариантами исследованных гидролизатов ПКЛ. Трансформация продуктов химического гидролиза образца ПКЛ, для которого на химической стадии была зафиксирована максимальная средняя скорость разложения полимера, при прочих равных условиях обеспечила и максимальную эффективность биокаталитической трансформации на микробиологической стадии.

Было выявлено частичное ингибирование метаболизма микроорганизмов продуктами химического гидролиза ПКЛ. При этом на основе анализа изменения концентрации внутриклеточного АТФ за время проведения экспериментов был сделан вывод о том, что полной гибели всех живых микробных клеток не наблюдалось, их жизнеспособность снижалась лишь частично. Поэтому можно утверждать, что в случае попадания таких продуктов в объекты окружающей среды (водоемы, почва) или на очистные сооружения, гидролизаты ПКЛ будут биотрансформированы со временем в экологически безопасные соединения (биогаз). Следует также отметить, что исследованные микроорганизмы, для которых были получены положительные результаты, являются типичными представителями окружающей среды или активно применяются на очистных сооружениях (термофильный и мезофильный анаэробные метаногенные илы) [9].

Предложенный в результате проведенных исследований двухстадийный процесс деградации и конверсии отходов ПКЛ отвечает требованиям современных экологических стандартов, с точки зрения безопасности и ресурсосбережения. Предложенный подход, по всей видимости, может найти практическое применение для трансформации и других синтетических полимеров, содержащих полиэфирные связи (полиэтилентерефталат, полилактид и т.п.).

Работа выполнена в рамках государственного задания Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН (125020601631-3).

Список литературы

1. Уразбахтина Л. Р., Дюдина О. В. Развитие потенциала импортозамещения в химической отрасли России //Экономика: вчера, сегодня, завтра. – 2023. – Т. 13. – №. 11-1. – С. 226.
2. Guo Z., Wu J., Wang J. Chemical degradation and recycling of polyethylene terephthalate (PET): a review //RSC Sustainability. – 2025. – Т. 3. – №. 5. – С. 2111-2133.
3. Ефременко Е. Н. и др. Каталитическое разложение микропластиков //Успехи химии. – 2023. – Т. 92. – №. 2. – С. 1-48.
4. Маслова О. В. и др. Биокатализ в деградации синтетических полимеров //Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. – 2024. – Т. 65. – №. 2. – С. 161-168.
5. Zampolli J. et al. Insights into the biodegradation of polycaprolactone through genomic analysis of two plastic-degrading *Rhodococcus* bacteria //Frontiers in microbiology. – 2024. – Т. 14. – С. 1284956.
6. Gluth A. et al. Advancing biological processing for valorization of plastic wastes //Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2022. – Т. 170. – С. 112966.
7. Lors C., Leleux P., Park C. H. State of the art on biodegradability of bio-based plastics containing polylactic acid //Frontiers in Materials. – 2025. – Т. 11. – С. 1476484.

8. Tokiwa Y. et al. Biodegradability of plastics //International journal of molecular sciences. – 2009. – Т. 10. – №. 9. – С. 3722-3742.
9. Ефременко Е. Н. и др. Химико-микробиологическая деградация поликапролактона, полученного в разных условиях синтеза //Известия Академии наук. Серия химическая. – 2025. – Т. 74. – №. 8. – С. 2521-2534.

УДК 577.15

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ КАТАЛИЗ ПРИ ВЫСОКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ФЕРМЕНТА

Массон П.[1], **Паширова Т.**[1,2]

[1] *Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, г. Казань, Республика Татарстан, РФ*
[2] *Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ Казанский научный центр РАН, г. Казань, Республика Татарстан, РФ*
masson.pym@gmail.com; Pmasson@kpfu.ru

Аннотация. Ферментативный катализ при очень высокой концентрации фермента в системе с ограниченным нанопространством не описывается классическими принципами Михаэлиса–Ментен. Применение принципов ферментативной кинетики при высокой концентрации фермента будет рассмотрено и проиллюстрировано на примере терапевтических ферментативных нанореакторов для внутривенной детоксикации эндогенных или экзогенных токсикантов.

Ключевые слова: кинетика, концентрация фермента, нанореакторы, токсикант

Согласно классическим представлениям о ферментативном катализе, ферменты действуют как химические катализаторы при очень низкой концентрации. Однако в определенных условиях ферменты могут функционировать и при очень высокой концентрации. Поскольку скорость ферментативной реакции пропорциональна концентрации фермента ([E]), её увеличение приводит к ускорению катализа практически независимо от концентрации субстрата. Такая ситуация встречается *in vivo* – в клетках и субклеточных компартментах (например, митохондриях, лизосомах, пероксисомах, синапсах), а также в ферментных реакторах или нанореакторах.

Представленный доклад посвящён ферментативным нанореакторам медицинского назначения. Разрабатываемые нами терапевтические ферментативные нанореакторы представляют собой частицы диаметром около 100 нм с инкапсулированным ферментом, способным осуществлять внутри наночастиц специфические реакции с высокой скоростью.

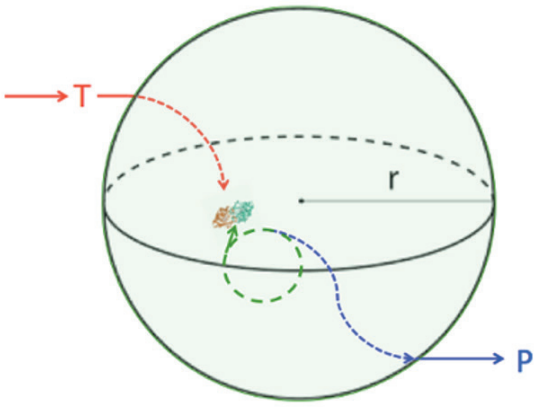


Рисунок 1. Принцип работы ферментативного нанореактора с радиусом (r = 50 нм), где T – субстрат (токсикант), P - продукты реакции.

Такие наносистемы можно вводить внутривенно для детоксикации ксенобиотиков, наркотических веществ и эндогенных токсикантов (T) (рисунок 1), а также для коррекции генетических и приобретённых метаболических нарушений [1]. Главными условиями функционирования терапевтических нанореакторов и протекания быстрых реакций являются свободное прохождение субстратов

и продуктов через мембрану нанореакторов, а также высокая концентрация инкапсулированного фермента с высокой константой специфичности (k_{cat}/K_m). Однако это последнее условие нарушает классические принципы ферментативной кинетики Михаэлиса–Ментен.

Сначала будут рассмотрены теоретические аспекты ферментативной кинетики при высокой концентрации фермента и применимость этих принципов к ферментативным реакциям, протекающим в системе с ограниченным нанопространством сферической геометрии [2], то есть в ферментативных нанореакторах. В этих условиях скорость реакции *v* будет описана формулой:

$$v = \frac{k_{cat}}{(K_m + [E]_0)}[E]_0[S]_0$$

Общий коэффициент эффективности процесса, η (отношение наблюдаемой скорости реакции внутри нанореактора (v) к скорости ферментативной реакции в объеме раствора (v_b)), зависит от модуля Тиле φ (φ — отношение скорости реакции к скорости диффузии в стационарном состоянии). Модуль Тиле для сферического ферментного нанореактора, работающего при низкой концентрации субстрата (< *Km*), равен:

$$\varphi = \frac{R}{3}\sqrt{\frac{k_{cat}[E]_0}{K_m D}}$$

Данная теория справедлива для любых процессов, опосредованных ферментами, включая реакции в промышленных реакторах или субклеточных анатомических структурах. Затем будет затронута проблема возможного ингибирования фермента продуктами реакции внутри нанокомпартмента. Далее будут рассмотрены решения нескольких практических биотехнологических проблем, необходимые для эффективной реализации инъекционных нанореакторов с высококонцентрированными инкапсулированными ферментами. В докладе будут даны примеры наших работ по нанореакторам для внутривенной детоксикации фосфорорганических соединений [3,4].

Список литературы

1. Shaihutdinova Z., Pashirova T.N., Masson P. Kinetic processes in enzymatic nanoreactors for *in vivo* detoxification // Biomedicines. – 2022. – Vol. 10. – №. 4. – 784

2. Masson P. et al., submitted.

3. Pashirova T.N., Shaihutdinova Z., Mansurova M., Kazakova R., Shambazova D., Bogdanov A., Tatarinov D., Daudé D., Jacquet P., Chabrière E., Masson P. Enzyme nanoreactor for *in vivo* detoxification of organophosphates // ACS Appl Mater Interfaces. – 2022. – Vol. 14. - №. 17. – P. 19241-19252.

4. Pashirova T., Shaihutdinova Z., Tatarinov D., Mansurova M., Kazakova R., Bogdanov A., Daudé D., Jacquet P., Chabrière E., Akhunzianov A.A, Miftakhova R.R., Masson P. Tuning the envelope structure of enzyme nanoreactors for *in vivo* detoxification of organophosphates // Int. J. Mol. Sci. – 2023. – Vol. 24. – №.21. – P. 1576

УДК 577:151

БИОГИБРИДНЫЕ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫЕ КАТАЛИЗАТОРЫ ДЛЯ ПЕРЕРАБОТКИ ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩЕЙ БИОМАССЫ

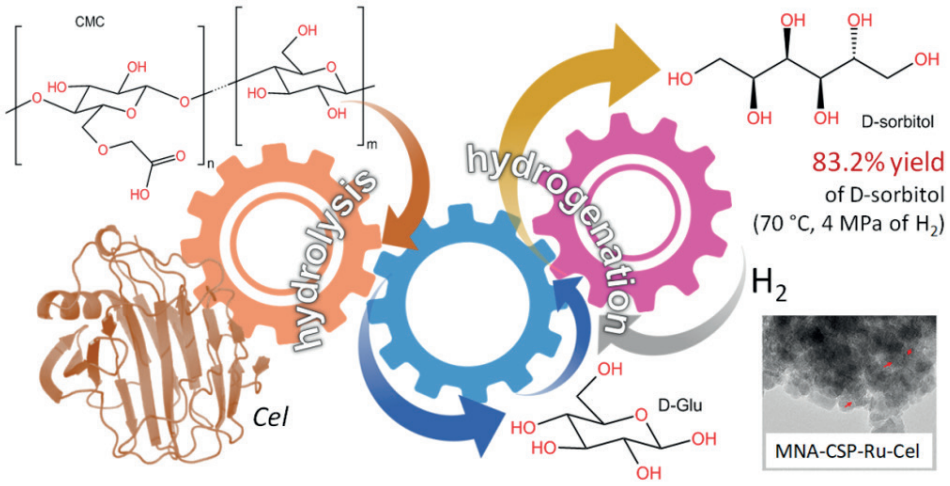
Сульман М.Г., Матвеева В.Г., Соколова А.В., Тихонов Б.Б., Молчанов В.П., Сидоров А.И., Сульман А.М., Гребенникова О.В.

Тверской государственный технический университет, г. Тверь, РФ
valen-matveeva@yandex.ru

Аннотация. В докладе представлена информация о новых и недавних достижениях в области каскадных процессов, катализируемых биогибридными наноструктурами. Выбранные примеры демонстрируют достижения, связанные с применением ферментов целлюлолитического комплекса и наноструктур, объединенных различным образом, - в эффективных каскадных процессах переработки целлюлозосодержащей биомассы. Металлические наночастицы, нанесенные на биомолекулы, мультиэнзиматические системы или бионаногибридные структуры с мультикаталитической активностью (обладающие как металлоорганической, так и биокаталитической активностью) избирательно и эффективно использовались по отдельности или совместно.

Ключевые слова: биомасса, ферменты целлюлолитического комплекса, гидролиз, наноструктуры, активность, кинетика.

С развитием переработки биомассы различные виды биомассы стали перспективным экологически чистым сырьем, способным заменить невозобновляемые ископаемые ресурсы. Как правило, переработка целлюлозосодержащей биомассы требует проведения нескольких реакций для получения химических веществ с добавленной стоимостью или биотоплива, даже если сырье является производным биомассы. Каскадные реакции - это новая технология в органической химии, которая привносит элегантность и эффективность в синтетические стратегии. В этой работе представлен обзор новых и недавних достижений в области каскадных процессов, катализируемых биогибридными наноструктурами. Выбранные примеры демонстрируют достижения, связанные с применением гетерогенных нанокатализаторов - наноструктур и биомолекул (ферменты целлюлолитического комплекса), объединенных различным образом, - в эффективных каскадных процессах. Металлические наночастицы, нанесенные на биомолекулы, мультиэнзиматические системы или бионаногибридные структуры с мультикаталитической активностью (обладающие как металлоорганической, так и биокаталитической активностью) избирательно и эффективно использовались по отдельности или совместно [1]. Изучено несколько направлений создания многофункциональных ферментативных катализаторов для каскадных реакций при переработке биомассы. Многофункциональность может быть создана двумя или более ферментами, ферментами и кислотными или основными группами, ферментами и металлические участки и т.д. Во всех случаях существует опасность того, что присутствие сильных кислотных групп может дезактивировать ферменты или кислотные группы нейтрализуются ферментами, поэтому тщательный выбор каталитических центров является первостепенной задачей. Существуют различные методы иммобилизации целлюлазы – целлюлолитического комплекса ферментов (эндоглюканаз, экзоглюканаз и β-глюкозидаз), который используется для разрушения различных химических связей в целлюлозе. Морфология наноструктурированных носителей (в том числе магнитоотделяемых), мультиэнзимные системы, присутствие металлических активных центров, а также факторы, влияющие на активность ферментов, позволяют достичь максимальной конверсии целлюлозных биологических отходов в сбраживаемые сахара [2].



В своей работе мы предложили осуществление «one-pot» каскадного процесса конверсии карбоксиметилцеллюлозы (CMC) до D-сорбитола с применением биогибридного наноструктурированного катализатора на основе целлюлазы иммобилизованной на рутений содержащие наночастицы магнетита, предварительно модифицированные хитозаном [3].

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант 25-79-20018).

Список литературы

1. Bronstein L.M., Matveeva V.G. Multifunctional Catalysts for Cascade Reactions in Biomass Processing // Nanomaterials. – 2024. - Vol. 14. - Art. 1937.
2. Sulman A.M., Matveeva V.G., Bronstein L.M. Cellulase Immobilization on Nanostructured Supports for Biomass Waste Processing// Nanomaterials. - 2022. – Vol. 12. - Art. 3796.
3. Tikhonov B.B., Lisichkin D.R., Sulman A.M., Sidorov A.I., Bykov A.V., Lugovoy Y.V., Karpenkov A.Y., Bronstein L.M., Matveeva V.G. Magnetic Bifunctional Ru-Enzyme Catalyst Allows for Sustainable Conversion of Cellulose Derivative to D-Sorbitol //Nanomaterials. – 2025. – Vol. 15. - Art. 740.

УДК 615.355;577.152.3

МУЛЬТИТАРГЕТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА НА ОСНОВЕ ИНГИБИТОРОВ ХОЛИНЭСТЕРАЗ

Махаева Г.Ф., Бачурин С.О.

Институт физиологически активных веществ ФИЦ ПХФ и МХ РАН,
г. Черноголовка Московской обл., РФ
gmakh@ipac.ac.ru

Аннотация. В докладе рассматриваются теоретические основы подхода к созданию мультитаргетных препаратов терапии болезни Альцгеймера на основе ингибиторов холинэстераз, анализируются литературные данные и приводятся примеры из работ авторов, включающие конъюгаты на основе такрина и впервые полученные авторами конъюгаты на основе отечественного антихолинэстеразного препарата амиридина. Рассматривается влияние структуры второго фармакофора и структуры спейсера.

Ключевые слова: холинэстеразы, бета-амилоид, такрин, амиридин, болезнь Альцгеймера.

Разработка новых эффективных препаратов для лечения возраст-зависимых нейродегенеративных заболеваний, в частности, болезни Альцгеймера (БА), является одним из наиболее востребованных направлений медицинской химии. БА характеризуется прогрессирующей потерей памяти и других когнитивных функций, что в конечном итоге приводит к полной инвалидности и смерти. Это заболевание приобретает характер эпидемии из-за возрастания продолжительности жизни населения, серьезных медицинских и социальных последствий и отсутствия эффективной терапии. Последнее в значительной степени связано со сложным, мультифакторным характером патогенеза БА, в котором задействовано множество мишеней, и пожилой возраст является одним из основных факторов риска.

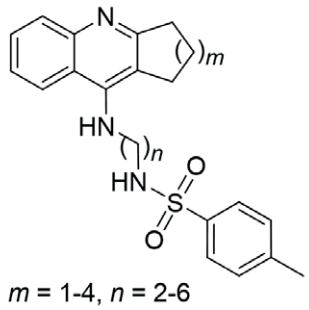
Холинергический дефицит, коррелирующий с когнитивными нарушениями, является одной из основных характеристик БА. Это привело к формулировке «холинергической гипотезы» БА и разработке терапии ингибиторами холинэстераз - ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и бутирилхолинэстеразы (БХЭ) – ферментов, регулирующих уровень ацетилхолина (АХ) в холинергических синапсах [1]. По мере прогрессирования БА активность АХЭ снижается, в то время как активность БХЭ увеличивается и возрастает ее роль как терапевтической мишени. Известно, что селективные ингибиторы БХЭ повышают уровень АХ в мозге, не оказывая побочных холинергических эффектов, характерных для ингибиторов АХЭ [2]. При этом антихолинэстеразные препараты являются в целом симптоматическими, поддерживая баланс уровня нейромедиатора в мозге, и не могут замедлить развитие собственно нейродегенеративного процесса.

В плане создания нового поколения антихолинэстеразных препаратов с нейропротекторным и болезнь-модифицирующим эффектом важную роль сыграло открытие того факта, что АХЭ помимо классической функции гидролиза ацетилхолина (АХ) проявляет проагрегантные свойства в отношении β-амилоида через участие периферического анионного сайта (ПАС), который взаимодействует с растворимыми пептидами β-амилоида, промотируя их агрегацию [3], т.е. АХЭ представляет собой «патологический шаперон», который способствует олигомеризации Аβ [4,5]. Поскольку БХЭ также связана с различными стадиями и аспектами амилоидогенеза, то ингибиторы БХЭ представляют интерес и с точки зрения антиамилоидной стратегии.

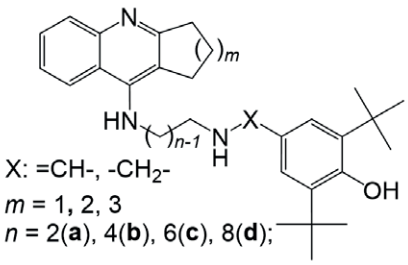
Одной из наиболее перспективных стратегий в фармакотерапии БА сегодня является направленное конструирование структур, способных действовать одновременно на несколько потенциальных биомишеней патогенеза заболевания, включая новые аспекты ингибирования АХЭ и БХЭ [6,7] - создание так

называемых мультитаргетных лекарственных препаратов. Этот подход имеет также дополнительные преимущества по сравнению с комбинациями лекарственных средств как с точки зрения оптимального ADMET-профиля, так и в плане снижения риска нежелательных лекарственных взаимодействий. Одним из наиболее популярных приемов является синтез гибридных молекул, объединяющих через спейсер несколько фармакофоров, в качестве одного из которых используют ингибитор холинэстераз, а второй фармакофор призван обеспечивать нейропротекторные и болезнь-модифицирующие свойства конъюгата [8].

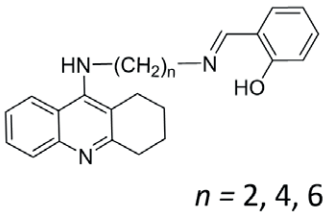
Нашим коллективом синтезированы несколько серий конъюгатов на основе такрина и его циклических гомологов, а также впервые получены конъюгаты для близкого по структуре отечественного антихолинэстеразного препарата амиридина [8]. Некоторые из рассматриваемых в докладе структур приведены ниже. Это конъюгаты на основе такрина - с *пара*-толилсульфонамидом (**1**) [8], антиоксидантом ионолом (**2**) [9] и салициловыми производными (**3**) [8]:



1

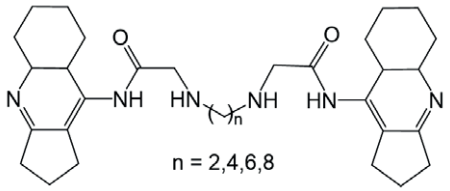


2

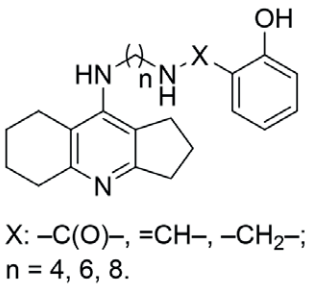


3

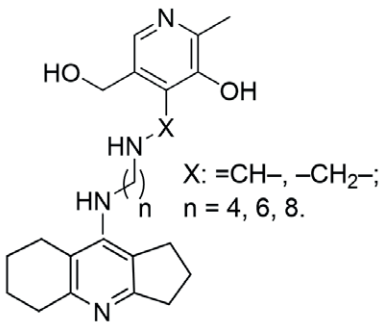
А также конъюгаты на основе амиридина: бис-амиридины (**4**) [8], конъюгаты с салициловыми производными (**5**) [10] и производными витамина В6 (**6**) [11]:



4



5



6

Синтезированные конъюгаты исследованы с использованием разработанной нами системы скрининга, включающей оценку эстеразного профиля соединений - ингибиторной активности в отношении АХЭ, БХЭ и структурно близкого фермента карбоксилэстеразы, являющейся в данном случае анти-мишенью; определение их антиагрегантной активности в отношении АХЭ-индуцируемой и самоагрегации β-амилоида; оценку антиоксидантной активности; широкое использование методов компьютерного молекулярного моделирования.

В результате проведенного исследования найдены соединения, эффективно ингибирующие холинэстеразы, способные блокировать АХЭ-индуцируемую и самоагрегацию β-амилоида, хелатировать металлы, и обладающие высокой антиоксидантной активностью и благоприятным ADMET профилем. Показано, что спектр биологической активности конъюгатов зависит как от структуры второго фармакофора, так и от структуры спейсера. Найдены перспективные соединения, которые могут являться основой для разработки инновационных мультитаргетных препаратов терапии БА.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ № 24-63-00016. Благодарим ЦКП ИФАВ РАН (FFSG-2024-0021) за предоставление оборудования.

Список литературы

1. Bartus R.T. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis // Experimental Neurology. – 2000. –Vol. 163, No 2. – P. 495-529.
2. Zhou S., Huang G. The biological activities of butyrylcholinesterase inhibitors // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2022. – Vol. 146. – Art. e112556.
3. Inestrosa N.C., Dinamarca M.C., Alvarez A. Amyloid-cholinesterase interactions. Implications for Alzheimer's disease // FEBS J. – 2008. – Vol. 275, No 4. – P. 625-632.
4. Lushchekina S.V., Kots E.D., Novichkova D.A., Petrov K.A., Masson P. Role of Acetylcholinesterase in β-amyloid aggregation studied by accelerated molecular dynamics // BioNanoScience. – 2017. – Vol. 7, No 2. – P. 396-402.
5. Махаева Г.Ф., Фисенко В.П., Бачурин С.О. Новые функции холинэстераз в развитии болезни Альцгеймера как мишень действия нейропротекторных препаратов // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2025. – Т. 74, № 8. – С. 2312-2331.
6. Martins M.M., Branco P.S., Ferreira L.M. Enhancing the therapeutic effect in Alzheimer's disease drugs: the role of polypharmacology and cholinesterase inhibitors // ChemistrySelect. – 2023. – Vol. 8, No 10. – Art. e202300461.
7. Бачурин С.О., Аксиненко А.Ю., Махаева Г.Ф., Шевцова Е.Ф. Мультифармакофорная стратегия медицинской химии в создании препаратов для лечения болезни Альцгеймера и некоторых других нейродегенеративных заболеваний // Известия Академии наук, Серия химическая. – 2023. – Т. 72, № 1. – С. 130-147.
8. Makhaeva G.F., Bachurin S.O. Multifunctional inhibitors of cholinesterases for the therapy of Alzheimer's disease (A review) // Russian Journal of General Chemistry. – 2023. – Vol. 93, No S2. – P. S528-S549.
9. Makhaeva G.F. et al. Combining experimental and computational methods to produce conjugates of anticholinesterase and antioxidant pharmacophores with linker chemistries affecting biological activities related to treatment of Alzheimer's disease // Molecules. – 2024. – Vol. 29, No 2. – Art. e321.
10. Makhaeva G.F. et al. Conjugates of amiridine and salicylic derivatives as promising multifunctional CNS agents for potential treatment of Alzheimer's disease // Archives der Pharmazie (Weinheim). – 2025. – Vol. 358, No 1. – Art. e2400819.
11. Makhaeva G.F. et al. Synthesis, biological evaluation, and in silico studies of pyridoxal-amiridine hybrids as multitargeting anti-Alzheimer's disease agents // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2026. – Vol. 303. – Art. e118397.

УДК 615.014.6

СУБМИКРОННЫЕ ЧАСТИЦЫ ВАТЕРИТА: ВКЛЮЧЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ

Мишин П.И.[1], Михеев А.В.[2], Букреева Т.В.[2], Балабушевич Н.Г.[1]

[1] Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
[2] НИЦ «Курчатовский институт», г. Москва, РФ
pmishin2005@gmail.com

Аннотация. Проведено исследование физико-химических свойств субмикронных частиц ватерита, полученных в среде этиленгликоля, для загрузки ферментов. Изучено включение и сохранение активности ферментов при загрузке в субмикронные частицы ватерита с помощью адсорбции. Проанализировано поведение субмикронных частиц ватерита с адсорбированной каталазой при моделировании прохождения желудочно-кишечного тракта человека, в том числе в присутствии протеолитических ферментов.

Ключевые слова: карбонат кальция, каталаза, химотрипсин, активность ферментов, высвобождение белка.

Ватерит является легкой в получении полиморфной формой карбоната кальция и характеризуется высокой пористостью, pH-чувствительностью, биодеградируемостью, биосовместимостью, что делает его перспективным для доставки лекарственных средств [1]. Если включению белков и ферментов в микронные частицы ватерита посвящено значительное количество работ [2], то аналогичных исследований для субмикронных частиц мало [3], а анализ их поведения в средах, моделирующих прохождение желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), отсутствует.

Цель работы - изучение свойств субмикронных частиц ватерита для включения известных ферментов с высоким сохранением активности и их защиты от неблагоприятных условий при прохождении ЖКТ.

Для включения были использованы различающиеся по физико-химическим свойствам и биологическому действию каталаза (250 кДа, pI 5,4), химотрипсин (25 кДа, pI 8,6), а также для анализа мукоадгезивные свойств частиц гликопротеин муцин из желудка свиньи (600 кДа, pI 3-4), являющийся основным компонентом слизистых поверхностей.

Субмикронные (нСС) частицы ватерита были получены методом спонтанной кристаллизации при сливании растворов хлорида кальция и карбоната натрия в присутствии 80 % этиленгликоля [4] и имели диаметр 600±20 нм, содержали 95 % ватерита, имели площадь поверхности 12 м^2/г, ζ- потенциал 4±1 мВ и средний размер пор 15 нм. При изучении стабильности суспензии нСС в 0,1 М PBS-буфере с pH 7,0 в течение 28 суток сохранялся диаметр частиц и наблюдалось незначительное уменьшение содержания ватерита.

Результаты адсорбции белковых препаратов в частицы нСС показаны в таблице 1. Гидродинамический диаметр ферментов был меньше, а муцина больше размера пор частиц. Высокое содержание адсорбированного муцина в нСС свидетельствовало о мукоадгезивных свойствах частиц, т.е. способности связываться со слизистыми оболочками, что важно при мукозальной доставке, в том числе пероральной [5]. Не было выявлено связи изоэлектрической точки и содержания загруженных препаратов в частицах. Адсорбированные ферменты сохраняли высокую активность в частицах.

Таблица 1. Характеристика включения ферментов и муцина в субмикронные частицы ватерита методом адсорбции.

Препарат	Содержание препарата, мг/г частиц	Сохранение удельной активности, %
Муцин	185±10	-
Каталаза	29±3	77±10
Химотрипсин	34±3	52±7

Высвобождение адсорбированной каталазы при pH 2 - 8 (универсальный буфер 0,02 М H_3PO_4, 0,02 М CH_3COOH, 0,02 М H_3BO_3 + 1 М NaOH) не превышало 15 % (рис. 1А). Наименьшее выделение фермента наблюдалось при pH, близких к его pI, и обусловлено нейтральным зарядам и меньшей растворимостью белка. Увеличение высвобождения при pH<5 связано с частичным растворением карбонатной матрицы, а при pH>6 – с приобретением каталазой отрицательного заряда. Частицы ватерита нивелировали влияние кислой среды на понижение активности адсорбированной каталазы (рис. 2Б), а фермент сохранял 50 – 60 % активности в отличие от нативного.

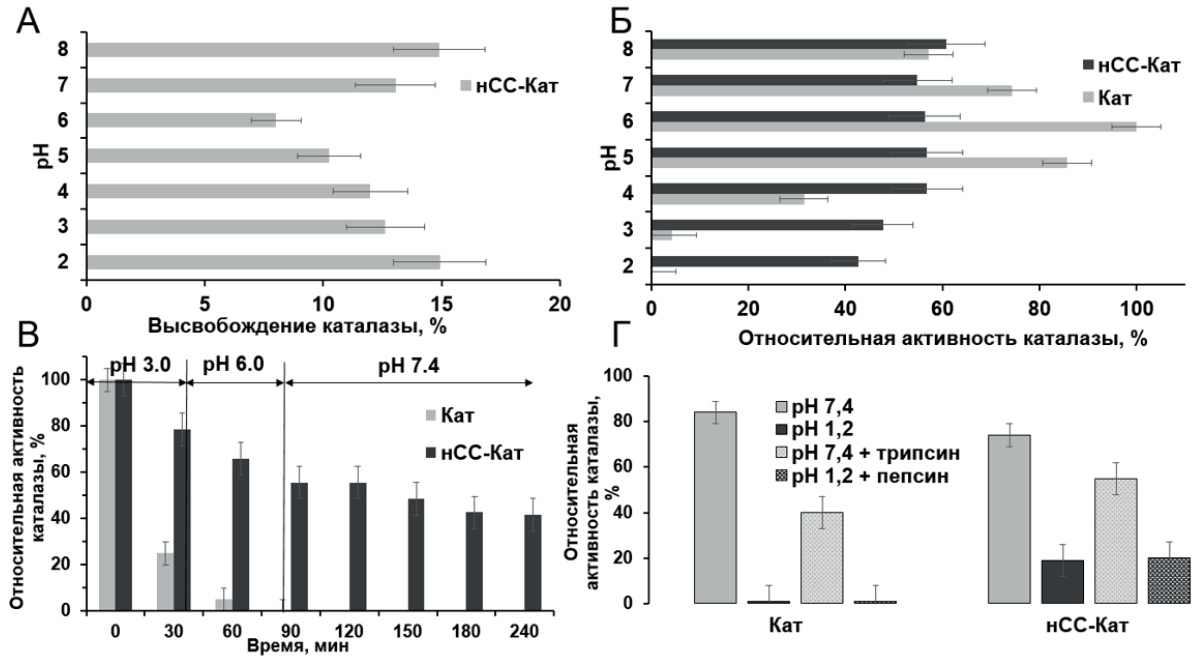


Рис. 1. Свойства частиц нСС с адсорбированной каталазой: высвобождение белка (**А**) и сохранение активности каталазы (**Б-Г**) при инкубации 1 ч в универсальном буфере (**А, Б**), последовательной инкубации в средах, моделирующих ЖКТ (**В**), при инкубации 2 ч в растворах, содержащих протеазы (**Г**). Условия: 250 об/мин, 37°С, частицы 5 мг/мл, каталаза 0,3 мг/мл; А, Б - универсальный буфер pH 2-8; В - 1 ч в 0,01 М HCl (pH 3,0), 1 ч в 0,1 М фосфатном буфере (pH 6,0) и 4 ч в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,4); Г - pH 7,4 – 0,1 М фосфатный буфер (pH 7,4); pH 7,4 + трипсин – 0,024 мг/мл трипсина в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,4); pH 1,2 – раствор HCl (pH 1,2); pH 1,2 + пепсин – 0,1 мг/мл пепсина в растворе HCl (pH 1,2), содержащим 2 мг/мл NaCl.

Для моделирования прохождения ЖКТ (рис. 2В) нСС с адсорбированной каталазой последовательно инкубировали: 1 ч при pH 3, 1 ч при pH 6 и 3 ч при pH 7,4 моделирующих соответственно соки желудка, двенадцатиперстной и тонкой кишки. Нативная каталаза теряла активность через 5 мин инкубации, а адсорбированная сохраняла до 40 % удельной активности после инкубирования во всех средах.

При исследовании протеолитической деградации в средах, моделирующих соки желудка и тонкого кишечника, анализировали активность каталазы при pH 1,2 в присутствии пепсина и при pH 7,4 и в присутствии трипсина соответственно (рис. 2Г). При воздействии среды с пепсином нативная каталаза полностью теряла активность, в то время как адсорбированная сохраняла 30 % активности. Это связано с взаимодействием карбонатной матрицы с ионами H^+ и смещением локального значения pH вблизи поверхности частиц в более щелочную область, что выводит пепсин из pH-оптимума активности. При воздействии среды с трипсином адсорбированная каталаза сохраняла на 20 % больше активности, чем нативная. Защитное действие частиц нСС можно объяснить наличием диффузионных затруднений для проникновения трипсина к каталазе в порах частиц.

Результаты работы показали, что субмикронные частицы ватерита, полученные в присутствии этиленгликоля, имеют физико-химические свойства способствующие: 1) стабильности при хранении, 2) проявлению мукоадгезивных свойств, 3) сохранению высокой биологической активности адсорбированных ферментов как при их адсорбции, так и при прохождении сред, моделирующих ЖКТ человека. Таким образом, субмикронные частицы ватерита продемонстрировали свойства, перспективные для включения ферментов и мукозальной, в том числе пероральной доставки.

Работа выполнена в рамках Государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова № 121041500039-8.

Список литературы

1. Trushina D.B., Borodina T.N., Belyakov S., Antipina M.N. Calcium carbonate vaterite particles for drug delivery: Advances and challenges // Materials Today Advances. – 2022. – Vol. 14. – Art. 100214.
2. Feoktistova N.A., Vikulina A.S., Balabushevich N.G., Skirtach A., Volodkin D. Bioactivity of catalase loaded into vaterite $CaCO_3$ crystals via adsorption and co-synthesis // Materials & Design. – 2020. – Vol. 185. – Art. 108223.
3. Choukrani G., Freile J. A., Avtenyuk N. U., Wan W. High Loading Efficiency and Controlled Release of Bioactive Immunotherapeutic Proteins Using Vaterite Nanoparticles // Particle & Particle Systems Characterization. – 2021. – Vol. 38. – Art. 2100012.
4. Trushina D.B., Bukreeva T.V., Antipina M.N. Size-Controlled Synthesis of Vaterite Calcium Carbonate by the Mixing Method: Aiming for Nanosized Particles // Crystal Growth & Design. – 2016. Vol. 16. – Art 3. – P. 1311–1326.
5. Balabushevich N.G. Mucins: Progress in Understanding Physiological Functions and Involvement in Pathological Processes and Prospects for Use (A Review) // Applied Biochemistry and Microbiology –. 2025. – Vol. 61. – Art 4. P. 623–635.

УДК 577.151

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ШАПЕРОНОВ

Муронец В.И., Поздышев Д.В., Курочкина Л.П.

НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия
vimuronets@belozersky.msu.ru

Аннотация. Шапероны можно разделить на две группы – АТФ-независимые и АТФ-зависимые. Только последняя группа относится к «истинным» шаперонам, механизм фунционирования которых обязательно включает стадию расщепления АТФ. Такие АТФ-зависимые ферментативные шапероны стимулируют патологическую трансформацию амилоидных белков, а лишение способности гидролизовать АТФ превращает их в другие формы, обладающие антиамилоидными свойствами.

Ключевые слова: шапероны, шаперонины, амилоидные белки, АТФ-аза, прионный белок

Шапероны, осуществляющие разнообразные функции в клетке, разделяются на несколько типов в зависимости от размеров и механизмов действия. Так, самые простые шапероны, так называемые малые белки теплового шока, состоят из полипептидных цепей с мол.массой 20-30 кДа, не обладают АТФ-азной активностью и могут осуществлять лишь шапероноподобные функции, связываясь с разными белками-субстратами и препятствуя их агрегации. Однако эти шапероны могут образовывать более сложные структуры, формируя достаточно крупные олигомерные структуры с внутренними полостями, имитируя строение наиболее крупных шаперонов, которые принято называть шаперонинами. Шаперонины — это класс шаперонов, образующих кольцеобразные олигомерные структуры и участвующих в многочисленных клеточных процессах. Они способствуют правильному сворачиванию белков-субстратов АТФ-зависимым образом. В отличие от АТФ-независимых шаперонов, которые лишь связываются с белками- субстратами, шаперонины осуществляют довольно сложный цикл, включающий взаимодействие с белками или полипептидными цепями, связывание и последующий гидролиз АТФ, конформационные перестройки, в которые иногда вовлечены ко-шаперонины, высвобождение трансформированного белка в среду. Шаперонины вполне можно называть ферментами со всеми характерными признаками. В ряде случаев шаперонины, например, GroE даже осуществляют последовательную работу двух активных центров, что делает их еще более похожими на олигомерные ферменты со сложными взаимодействиями между активными центрами. Однако зависимость от протекания АТФ-зной реакции не мешает шаперонинам функционировать и без добавления АТФ, участвуя в ряде процессов как простые АТФ-независимые шапероны и осуществляя шапероноподобные воздействия, например, предотвращая агрегацию белков.

Особый интерес представляет исследование роли шаперонинов, находящихся в разных функциональных состояниях, в регуляции патологической трансформации амилоидных белков. На примере бактериального шаперонина GroE и эукариотического Tric было показано, что в зависимости от присутствия АТФ они могут стимулировать или ингибировать формирование амилоидных структур прионного белка [1-3]. Более подробно влияние шаперонинов на трансформацию амилоидных белков было исследовано нами на примере самых простых шаперонинов – фаговых. Шаперонины, кодируемые бактериофагами, обладают рядом структурных и функциональных особенностей, отличающих их от других известных шаперонинов. Шаперонин OBP, кодируемый бактериофагом OBP *Pseudomonas fluorescens*, образует одно гептамерное кольцо, а шаперонин EL - два соединенных вместе кольца. При этом оба шаперонина являются АТФ-зависимыми и не требует ко-шаперонина для функционирования. При изучении таких амилоидных белков как альфа-синуклеин и прионный белок удалось продемонстрировать предотвращение их патологической трансформации обоими типами фаговых шаперонинов [4,5]. Однако такой эффект наблюдался только в отсутствии АТФ,

то есть с неполноценно функционирующими шаперонинами. Противоположное действие оказывали шаперонины при добавлении АТФ: они стимулировали образование фибрилл обоих амилоидных белков даже в тех условиях, в которых не происходит их спонтанной фибриллизации [4-7]. Вероятно, АТФ-зависимый цикл функционирования шаперонинов приводит к возникновению патологической конформации амилоидных белков и их последующей фибриллизации. Полученные результаты показывают, что шаперонины в определенных условиях могут не разрушать амилоидные структуры и не препятствовать их формированию, как было принято считать ранее, а стимулировать патологические процессы. Особое значение такая неблагоприятная трансформация может иметь в желудочно-кишечном тракте, где присутствует значительное количество разных шаперонинов [1,8]. Мы полагаем, что сделанные наблюдения необходимо учитывать при применении АТФ-зависимых шаперонов в качестве средств профилактики и лечения нейродегенеративных заболеваний, возможно, переводя ферментативные шапероны в обычные путем введения мутаций, лишающих их АТФ-азной активности.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 24-44-20003, https://rscf.ru/project/24-44-20003/.

Список литературы

1. Chaperonins induce an amyloid-like transformation of ovine prion protein: The fundamental difference in action between eukaryotic tric and bacterial groel / G. G. Kiselev, I. N. Naletova, E. V. Sheval et al. // Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics. — 2011. — Vol. 1814, no. 12. — P. 1730–1738.
2. Regulation by different types of chaperones of amyloid transformation of proteins involved in the development of neurodegenerative diseases / V. I. Muronetz, S. S. Kudryavtseva, E. V. Leisi et al. // International Journal of Molecular Sciences. — 2022. — Vol. 23, no. 5. — P. 2747.
3. Факторы, влияющие на патологическую трансформацию амилоидных белков: от посттрансляционнных модификаций до шаперонов / В. И. Муронец, С. С. Кудрявцева, Л. П. Курочкина и др. // Биохимия. — 2025. — Т. 65. — С. 237–280.
4. Effect of bacteriophage-encoded chaperonins on amyloid transformation of alpha-synuclein / E. V. Leisi, K. V. Barinova, S. S. Kudryavtseva et al. // Biochemical and Biophysical Research Communications. — 2022. — Vol. 622. — P. 136–142
5. Bacteriophage-encoded chaperonins stimulate prion protein fibrillation in an atp-dependent manner / E. V. Leisi, A. V. Moiseenko, S. S. Kudryavtseva et al. // Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics. — 2023. — Vol. 1872, no. 1. — P. 140965.
6. Interaction of phage chaperonin obp domains with amyloidogenic proteins / E. V. Leisi, D. V. Zyurkalova, U. F. Dzhus et al. // Archives of Biochemistry and Biophysics. — 2025. — Vol. 771. — P.
7. Cytotoxicity of α-synuclein amyloid fibrils generated with phage chaperonin obp / D. V. Pozdyshev, E. V. Leisi, V. I. Muronetz et al. // Biochemical and Biophysical Research Communications. — 2025. — Vol. 742. — P. 151127. 110493.
8. Are gastrointestinal microorganisms involved in the onset and development of amyloid neurodegenerative diseases? / V. I. Muronetz, L. P. Kurochkina, E. V. Leisi, S. S. Kudryavtseva // Microbiology research. — 2023. — Vol. 14. — P. 1942–1955.

УДК 376:15

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ МЕТОДОМ ПОЛЯРИЗАЦИОННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА

Мухаметова Л.И.[1], Филимонова С.М.[2], Еремин С.А.[1], Крюкова О.В.[1], Крылов В.В.[3], Нифантьев Н.Э.[3]

[1] Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
[2] Фармацевтический институт им. А.П. Нелюбина, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, РФ
[3] Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского, РАН, г. Москва, РФ
liliya106@mail.ru

Аннотация. Доклад посвящён аналитическим возможностям поляризационного флуоресцентного анализа в исследовании активности ферментов. Показано, что гомогенный формат метода не только обеспечивает точное количественное определение активности, но и открывает удобный путь для скрининга и характеристики ингибиторов.

Ключевые слова: поляризация флуоресценции, активность, ферменты, ингибиторы.

Метод поляризации флуоресценции (ПФ) является перспективным инструментом для измерения активности ферментов, позволяя проводить анализ в гомогенной среде без разделения связанных и свободных компонентов реакции, что значительно ускоряет время анализа. В данной работе рассмотрены принципы и современные подходы к определению ферментативной активности методом ПФ на примере трёх клинически и биотехнологически значимых ферментов: лизоцима, ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) и α-амилазы.

Лизоцим (или мурамидаза) относится к группе гликозидных гидролаз и катализирует гидролиз β-связи между N-ацетилглюкозамином и N-ацетилмурамовой кислотой клеточных стенок бактерий. Лизоцим С-типа наиболее изучен и широко распространен у птиц, млекопитающих, насекомых, человека и некоторых водных организмов. Лизоцимы С-типа имеют высокую степень гомологии последовательностей и обладают высокой мурамидазной активностью против грамположительных бактерий. Благодаря своей доступности и низкой иммуногенности лизоцим широко используется в системах консервации пищевых продуктов и доставки лекарств [1].

Благодаря структурному сходству между фрагментами пептидогликана и хитина лизоцим обладает побочной хитиназной активностью. Низкомолекулярные олигосахариды, растворимые фрагменты хитина, могут рассматриваться в качестве субстратов для анализа активности лизоцима. Были получены флуоресцентно меченные конъюгаты три- (1b), пента- (2b) и гептасахариды (3b). Показаны преимущества использования пентасахарида (2b) и оптимизированы условия для изучения активности лизоцима С-типа методом ПФА. Использование синтетического субстрата 2b в анализе ПФ позволяет разработать гомогенный, воспроизводимый метод определения активности лизоцима с диапазоном обнаружения от 0.35 до 2.5 мкМ и пределом обнаружения 0.3 мкМ (4.3 мкг/мл) [2]. По сравнению с известными методами определения лизоцима, метод ПФ продемонстрировал экспрессность, надежность и точность, и может быть эффективно применен для определения активности лизоцима в различных образцах.

Ангиотензин-превращающий фермент (АПФ) — это важный регулятор кровяного давления, который также служит ключевым лабораторным маркером для диагностики и мониторинга саркоидоза. Активность АПФ прямо коррелирует с общей массой гранулём при саркоидозе: на I стадии повышена у 68% пациентов, а к III стадии — уже у 91%. Для количественного определения АПФ удобно использовать метод поляризации флуоресценции (ПФА), применяя в качестве распознающего реагента его ингибитор, например, лизиноприл. Был получен и охарактеризован высокоочищенный конъюгат лизиноприл-ФИТЦ. Методом поляризации флуоресценции определена равновесная константа диссоциа-

ции комплекса лизиноприл-ФИТЦ с АПФ: 2.6±0.2 нМ. Предел обнаружения АПФ составил 1 нМ, а диапазон определяемых концентраций — от 1.5 до 10 нМ. Помимо количественного определения АПФ, данный метод может быть применен для высокопроизводительного скрининга ингибиторов фермента.

Амилаза — это пищеварительный фермент, который расщепляет сложные углеводы до более простых сахаров [3]. Кроме того, активность амилазы — важный лабораторный показатель, который резко возрастает в крови и моче при остром панкреатите, паротите, почечной недостаточности, а также служит маркером состояния поджелудочной железы [4]. Нами разработан анализ ферментативной активности α-амилазы методом ПФА. В качестве распознающих реагентов использовали флуоресцентно меченный кверцетин и его структурный аналог зеараленон. Кверцетин природный флавоноид, содержащийся в луке, яблоках, чае и многих других растениях. Он является одним из самых изученных ингибиторов α-амилазы. Зеараленон – микотоксин, производимый плесневыми грибами рода Fusarium. Получены калибровочные зависимости изменения сигнала ПФ при различных концентрациях фермента, которые могут быть использованы для изучения активности фермента, а основанный на конкурентном связывании с флуоресцентным конъюгатом зеараленона анализ достигает предела обнаружения кверцетина 1.7 мг/мл, и составляет всего 5 минут, что обеспечивает существенную экономию времени по сравнению с типичными анализами ВЭЖХ (~40 мин). Он демонстрирует высокую специфичность, с минимальной перекрестной реактивностью только к рутину (0.1%) и отсутствием перекрестной реактивности к дигидрокверцетину, галловой кислоте и акарбозе. Успешное применение метода для определения кверцитина в продуктах питания и пищевых добавках показало результаты, согласующиеся с результатами жидкостной хроматографии с диодно-матричным детектированием [5]. Предложенный метод ПФА представляет собой быструю, простую и экономичную альтернативу для контроля качества источников с высоким содержанием кверцетина. Оба подхода успешно апробированы для контроля качества растительного сырья и биологически активных добавок.

Таким образом показано, что метод поляризации флуоресценции универсален и может быть использован для определения активности ферментов различных классов. В качестве субстратов для изучения активности ферментов могут быть использованы флуоресцентно меченные низкомолекулярные фрагменты природных субстратов или их ингибиторы. Разработанные подходы успешно апробированы на трёх клинически и биотехнологически значимых ферментах – лизоциме, ангиотензин-превращающем ферменте и α-амилазе. Впервые предложен воспроизводимый ПФ-метод с использованием синтетического флуоресцентно-меченого пентасахарида в качестве субстрата лизоцима С-типа. Метод характеризуется широким линейным диапазоном (0.35–2.5 мкМ) и низким пределом обнаружения (0.3 мкМ; 4,3 мкг/мл), превосходя по производительности многие известные аналоги, и может применяться для анализа сложных биологических образцов. Полученный конъюгат ингибитора АПФ лизиноприл-ФИТЦ может быть использован для количественного определения АПФ методом ПФА с пределом обнаружения 1 нМ при линейном диапазоне 1.5–10 нМ. Конкурентный формат ПФА с использованием АПФ и лизиноприл-ФИТЦ может быть использован для высокопроизводительного скрининга ингибиторов фермента. В качестве распознающих реагентов для амилазы были использованы флуоресцентно меченные конъюгаты кверцетина и зеараленона. Показана возможность определения активности α-амилазы. Конкурентный формат ПФА продемонстрировал экспрессную и высоко специфичную методику обнаружения кверцетина. Совокупность полученных результатов демонстрирует, что ПФА представляет собой быструю, простую и экономичную платформу, применимую для решения широкого круга задач: от фундаментальных исследований кинетики и механизмов ингибирования до рутинного контроля качества пищевого сырья и биологически активных добавок, а также для клинической лабораторной диагностики.

Исследование выполнено в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова, регистрационный номер 121041500039-8.

Список литературы

1. Zhang Q., Zhao Y., Yao Y., Wu N., Chen S., Xu L., Tu Y., Characteristics of hen egg white lysozyme, strategies to break through antibacterial limitation, and its application in food preservation: A review // Food

Res. Int. – 2024.-Vol. 181. – P. 114114.
2. Mukhametova L.I., Zherdev D.O., Kuznetsov A.N., Yudina O.N., Tsvetkov Y.E., Eremin S.A., Krylov V.B., Nifantiev N.E. Fluorescence-Polarization-Based Assaying of Lysozyme with Chitooligosaccharide Tracers // Biomolecules. – 2024. – Vol. 14. P. 170.
3. Gopinath S.C.B., Anbu P., Arshad M.K.M., Lakshmipriya T., Voon C.H., Hashim U., Chinni S.V. Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production // BioMed Res. Int. – 2017. – Vol. 2017, P. 1–9.
4. Song Y., Zhang S. Serum Creatinine and Amylase in Drain to Predict Pancreatic Fistula Risk after Pancreatoduodenectomy // Dig. Surg. – 2023. – Vol. 40. P. 205–215.
5. Filimonova S.M., Melnikov E.S., Mukhametova L.I., Raysyan A., Eremin S.A. Fluorescence polarization enzyme assay: a novel approach for the quantification of quercetin based on its interaction with α-amylase // Anal. Bioanal. Chem. -2026. - https://doi.org/10.1007/s00216-026-06516-z.

УДК 504.064:577.1

ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ОЧИСТКИ НА КЛИМАТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ

Насибова Н.Р.

Факультет химических технологий Азербайджанского государственного университета нефти и промышленности, г. Баку, Азербайджан
nurane-nesibova@mail.ru

Аннотация: В данной работе представлен сравнительный анализ химических и биотехнологических методов экологической очистки с точки зрения их влияния на ключевые климатические показатели, такие как выбросы парниковых газов, углеродный цикл, качество почв и т.д. В отличие от химических методов очистки, биотехнологические подходы, включая биоремедиацию, фиторемедиацию и биокаталитические процессы с участием микроорганизмов и ферментов, обеспечивают более устойчивые и экологически интегрированные решения. Результаты проведённого анализа свидетельствуют о необходимости перехода к биокаталитически ориентированным стратегиям очистки для достижения целей устойчивого развития и климатической нейтральности.

Ключевые слова: климатические показатели, биотехнология, биокатализ, биоремедиация, углеродный цикл

Стабильность климатической системы Земли напрямую связана с балансом биогеохимических циклов, сформированных в результате длительной эволюции биологических и геофизических процессов. Однако антропогенная деятельность, включая индустриализацию и интенсивное сельское хозяйство, привела к существенным нарушениям этих процессов. Рост концентрации химических загрязнителей (пестициды, пластики, тяжелые металлы), а также выбросов парниковых газов вызывает нарушение углеродного цикла, снижение биоразнообразия и деградацию экосистемных функций. В частности, пластиковые отходы являются одним из ключевых факторов длительного загрязнения окружающей среды [1,2].

Традиционные методы защиты окружающей среды в значительной степени основаны на химических технологиях очистки. Несмотря на их высокую скорость действия, они часто приводят к дополнительной экологической нагрузке. В качестве альтернативы развиваются биотехнологические подходы, основанные на использовании живых систем и биокатализаторов для трансформации загрязнителей [2,3]. Целью данной работы было провести сравнительный анализ влияния химических и биотехнологических методов очистки на климатические показатели.

Влияние методов очистки на климат оценивается по таким параметрам, как выбросы парниковых газов, состояние углеродного цикла и устойчивость экосистем. Химические методы очистки основаны на физико-химической трансформации загрязнителей и широко применяются в промышленности. К ним относятся процессы окисления (реакции Фентона, озонирование), осаждение, нейтрализация, а также использование различных реагентов (коагулянтов, флокулянтов, пестицидов) [4]. Несмотря на высокую эффективность, данные методы сопровождаются высоким уровнем энергопотребления и выбросами парниковых газов, что усиливает их негативное воздействие на климат [5]. Особую роль играют азотные удобрения, использование которых приводит к увеличению выбросов N_2O – одного из наиболее мощных парниковых газов. Кроме того, накопление синтетических соединений в почве и воде подавляет микробиологическую активность и нарушает углеродно-азотный цикл [4,5].

Биотехнологические подходы (биоремедиация, фиторемедиация, микоремедиация и генетическая инженерия), напротив, интегрированы в природные процессы и способствуют оптимизации углеродного цикла. Они основаны на использовании метаболического потенциала микроорганизмов, растений

и ферментов. Важное место среди биотехнологических меодов занимают биокаталитические процессы, в которых ферменты и микробные системы выступают в роли высокоселективных катализаторов разложения загрязнителей. Биокаталитические системы обеспечивают эффективное разложение загрязнителей с минимальными энергетическими затратами, что снижает общий углеродный след технологий.

Известно, что микроорганизмы (родов *Pseudomonas, Rhodococcus, Bacillus* и др.) способны эффективно разлагать углеводороды и другие токсичные соединения, особенно в условиях стимулированного роста [1,6]. Ферментативные (биокаталитические) реакции позволяют осуществлять трансформацию загрязнителей при мягких условиях, снижая энергетические затраты и минимизируя образование побочных продуктов. Это делает биокатализ одним из наиболее перспективных направлений экологической инженерии. Использование азотфиксирующих бактерий (родов *Azotobacter, Clostridium, Nostoc*) позволяет уменьшить потребность в синтетических удобрениях и снизить выбросы N_2O. Биостимуляция и биоаугментация активизируют микробные сообщества, улучшая структуру почвы и ускоряя разложение органических веществ. В водных системах биокаталитические и биотехнологические методы (биофильтры, микроводоросли, ферментные системы) обеспечивают селективное удаление загрязнителей и способствуют восстановлению экосистем. Микроводоросли дополнительно участвуют в поглощении CO_2, выполняя функцию биологического поглотителя углерода [4,7]. Получаемые с использованием биокаталитических процессов биопластики (например PLA (полилактид) и PHA (полигидроксиалканоат)), представляют собой перспективную альтернативу традиционным полимерам. Однако, следует отметить, что их эффективность зависит от условий деградации и требует соответствующей инфраструктуры [8].

Таким образом, проведенный в данной работе сравнительный анализ показывает, что химические методы очистки, несмотря на их оперативность и масштабируемость, оказывают значительное негативное воздействие на климат и экосистемы. Тогда как биотехнологические, в частности биокаталитические, подходы представляют собой более устойчивую альтернативу, способную обеспечить снижение выбросов, восстановление экосистем и оптимизацию углеродного цикла.

В перспективе приоритетным направлением развития экологических технологий является переход к биокаталитически ориентированным системам очистки, а также разработка интегрированных решений, сочетающих преимущества различных методов. Реализация этих подходов требует дальнейших исследований, технологического развития и поддержки со стороны экологической политики.

Список литературы

1. Arora N. K., Fatima T. Environmental sustainability and biotechnology: opportunities and challenges // Environmental Sustainability. – 2024. – Vol. 7. – no. 2. – P. 115-119.
2. Raffa C. M., Chiampo F. Bioremediation of agricultural soils polluted with pesticides: A review // Bioengineering. – 2021. – Vol. 8. – no. 7. – P. 92.
3. Arora N. K., Mishra I. United Nations Sustainable Development Goals 2030 and environmental sustainability: race against time //Environmental Sustainability. – 2019. – Vol. 2. – no. 4. – P. 339-342.
4. Giri B. S. et al. Progress in bioremediation of pesticide residues in the environment //Environmental Engineering Research. – 2021. – Vol. 26. – no. 6.
5. Haberl H. et al. Contributions of sociometabolic research to sustainability science //Nature Sustainability. – 2019. – Vol. 2. – no. 3. – P. 173-184.
6. Zaborowska M., Wyszkowska, J., Borowik, A., Kucharski, J. Bisphenol A—A dangerous pollutant distorting the biological properties of soil //International journal of molecular sciences. – 2021. – Vol. 22. – no. 23. – P. 12753.
7. Dobslaw D., Ortlinghaus O. Biological waste air and waste gas treatment: Overview, challenges, operational efficiency, and current trends //Sustainability. – 2020. – Vol. 12. – no. 20. – P. 8577.
8. Narancic T., Cerrone, F., Beagan, N., O'Connor, K.E. Recent advances in bioplastics: application and biodegradation //Polymers. – 2020. – Vol. 12. – no. 4. – P. 920.

УДК: 577.112.083:577.15:**577.2.08:577.21**

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ АНТИТЕЛ-СВЯЗЫВАЮЩИХ ДОМЕНОВ В ИССЛЕДОВАНИЯХ МЕТОДОМ CUT&TAG ПРОФИЛЕЙ СВЯЗЫВАНИЯ БЕЛКОВ В ГЕНОМЕ

Павлова Е.Ф., Евдокимова А.А., Анисимова А.В., Воробьева Н.Е.

Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334
efpavlova@edu.hse.ru

Аннотация. Были получены гибридные белки, состоящие из разных антител-связывающих доменов и Tn5 транспозазы: pA-Tn5, pAG-Tn5, pLG-Tn5. Белки были исследованы *in vitro* и *in vivo* в протоколе исследования хроматина CUT&Tag. Наилучшую эффективность в экспериментах показал фермент pLG-Tn5, который позволил проводить Cut&Tag с антителами различного происхождения.

Ключевые слова: Tn5 транспозаза, protein A, protein G, protein L, CUT&Tag.

Регуляция транскрипции эукариотических генов осуществляется на уровне хроматина и некодирующих РНК. Изучение профилей связывания белков с хроматином является распространенным методом для исследования геномных процессов, в том числе для изучения патогенеза онкологических, нейродегенеративных и аутоиммунных заболеваний.

Метод CUT&Tag (Cleavage Under Targets and Tagmentation) — это недавно разработанный метод профилирования хроматина, который отличается высокой чувствительностью, низким уровнем фонового шума и требует малого количества материала. Объектом исследования являются пермеабилизованные клетки или изолированные ядра. Для локализации целевого белка вводятся специфические антитела, которые связываются с данным белком в составе хроматина (Рисунок 1). На следующей этапе добавляют химерный белок pA-Tn5, который связывается с антителами за счет антител-связывающих доменов. В случае низкой аффинности первичных антител к pA-Tn5, используют вторичные антитела, повышающие эффективность рекрутирования фермента. После связывания путем добавления Mg2+ активируют Tn5 транспозазу в составе гибридного белка. В результате активации, фермент фрагментирует ДНК вблизи места связывания антитела и одновременно встраивает адаптерные последовательности (происходит тагментация). Тагментированная ДНК далее амплифицируется и подвергается высокопроизводительному секвенированию. Таким образом, CUT&Tag позволяет определить участки генома, ассоциированные с исследуемым белком [1, 2].

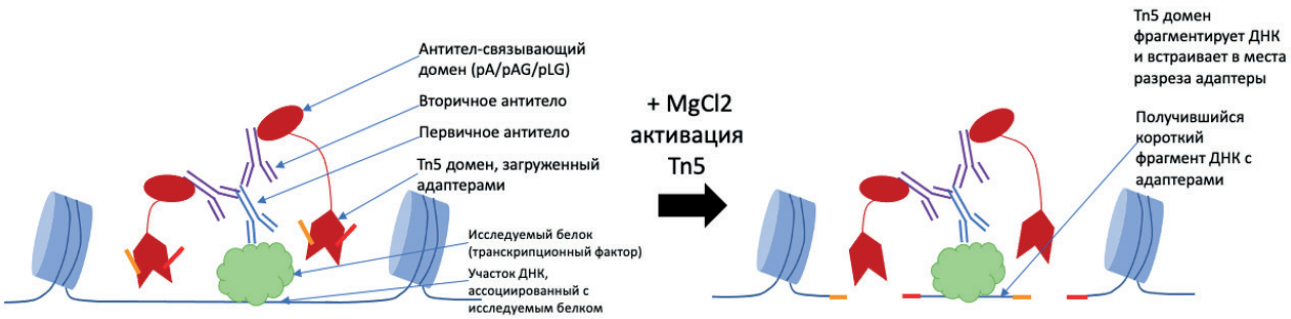


Рисунок 1. Общая схема протокола CUT&Tag.

В исходном протоколе Tn5 сливается с белком А, который эффективно связывает некоторые изотипы антител. Протокол предполагает использование вторичных антител для детекции антител со слабой

аффинностью к белку А. Однако исследований, которые бы количественно измерили вклад вторичных антител в эффективность CUT&Tag, до сих пор проведено не было. Целью данного проекта было восполнить этот пробел в исследованиях путем количественной оценки вклада вторичных антител в протокол Cut&Tag, а также выявить оптимальную комбинацию антител-связывающих доменов, которая бы позволила проводить Cut&Tag с первичными антителами различного происхождения. Для этого были клонированы, экспрессированы и очищены три фермента — pA–Tn5, pAG–Tn5 и pLG–Tn5 [1].

Гибридные белки были предварительно изучены *in vitro.* Активность антител-связывающих доменов исследовалась в экспериментах по преципитации антител различного происхождения из раствора. Активность Tn5 транспозазы в слитных белках оценивалась по эффективности фрагментации плазмидной ДНК. Далее активность белков была исследована *in vivo* в протоколе CUT&Tag, выполненном на S2 клетках *Drosophila*. Полученные данные для антител против SRP, полученных в крысе, и PolII РНК полимеразы, полученных в мыши, были оценены биоинформатически с использованием референсных пиков для SRP и PolII, полученных ранее в экспериментах ChIP-Seq. Были использованы следующие метрики: общее обогащение сигнала относительно фона; доля прочтений в референсных пиках; обогащение сигнала в референсных пиках относительно случайных геномных участков; распределение сигнала вокруг центров референсных пиков; а также число референсных пиков, перекрытых CUT&Tag пиками [3, 4].

Ферменты pAG–Tn5 и pLG–Tn5 показали большую эффективность в протоколе Cut&Tag, чем pA-Tn5, во всех протестированных условиях (со вторичными антителами и без них, с обоими типами первичных антител). Фермент pLG-Tn5 лучше всего сработал с антителами крыс: с одинаковой эффективностью, как с вторичными антителами, так и без них. Наилучшие результаты с антителами мышей показали, как pAG-Tn5, так и pLG-Tn5 (оба в условиях со вторичными антителами). На основании полученных данных, фермент pLG-Tn5 представляется наиболее перспективным реагентом для проведения протокола Cut&Tag, который позволяет работать с антителами различного происхождения.

Список литературы

1. Kaya-Okur H. S. et al. CUT&Tag for efficient epigenomic profiling of small samples and single cells // Nature communications. – 2019. – Т. 10. – №. 1. – С. 1930.
2. Kaya-Okur H. S. et al. Efficient low-cost chromatin profiling with CUT&Tag //Nature protocols. – 2020. – Т. 15. – №. 10. – С. 3264-3283.
3. Evdokimova A. A. et al. SRP/dGATAb modulates the ecdysone response bidirectionally via locus-specific regulatory landscape //Epigenetics & chromatin. – 2026. – Т. 19. – №. 1. – С. 3.
4. Mazina M. Y., Kovalenko E. V., Vorobyeva N. E. The negative elongation factor NELF promotes induced transcriptional response of Drosophila ecdysone-dependent genes //Scientific reports. – 2021. – Т. 11. – №. 1. – С. 172.

«МОЛЕКУЛЯРНАЯ КАРУСЕЛЬ»: КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ CPMTA

Панина И.С.[1,2], Крылов Н.А.[2], Багаева Д.И.[3], Шлеева М.О.[3], Савицкий А.П.[3], Ефремов Р.Г.[1,2]

[1] НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, г. Москва, РФ
[2] Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва, РФ
[3] Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН, ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва, РФ
irinaspanina@gmail.com

Аннотация. В работе исследован молекулярный механизм работы метилтрансферазы CPmtA, обнаруженной в клетках микобактерий и катализирующей метилирование карбоксильных групп копропорфирина III (КП) с использованием S-аденозилметионина (SAM) в качестве донора метильных групп. Компьютерное моделирование CPmtA позволило предложить новый «карусельный» механизм ферментативной реакции: субстрат вращается внутри гидрофобной полости фермента, последовательно ориентируя каждую карбоксильную группу к кофактору. Образующийся тетраметиловый эфир копропорфирина III (ТМК) встраивается в бактериальную мембрану, изменяя ее свойства. Накопление ТМК в клеточной мембране может лежать в основе перехода микобактерий в дормантное состояние.

Ключевые слова: копропорфирин III, MSMEG_0614, *Mycobacterium*, молекулярная динамика.

Переход клеток микобактерий (*M. smegmatis и tuberculosis*) в дормантное состояние ассоциирован с накоплением в их мембранах ТМК [1]. В настоящем исследовании было впервые установлено, что ключевым ферментом, ответственным за образование ТМК, является метилтрансфераза CPmtA, кодируемая геном MSMEG_0614. CPmtA катализирует SAM-зависимое последовательное превращение КП в тетраметиловый эфир.

Для изучения структуры и динамики фермента, а также предсказания механизма его действия использовали комплексный вычислительный подход, включающий моделирование по гомологии, нейросетевое моделирование с помощью AlphaFold3 [2], расчет и картирование молекулярного гидрофобного потенциала [3], метод молекулярной динамики (МД), а также гибридные QM/MM-расчеты.

Предсказанная структура CPmtA содержит характерную для метилтрансфераз класса I укладку Россмана [4], обеспечивающую связывание SAM, а также глубокую гидрофобную полость, способную связывать КП в каталитически компетентной конфигурации. Моделирование МД показало, что остатки Tyr184 и Arg80 играют ключевую роль в корректной фиксации субстрата и ориентации метилируемой карбоксильной группы вблизи SAM. Остальные COO^- группы КП частично доступны растворителю, однако при этом образуют специфические контакты с остатками белка: Ser212/Ala213/Ser288; Lys223; и Ser235.

Для валидации полученной модели были предложены точечные замены Y184F и S235A. Мутация Y184F приводила к резкому снижению доли реакционноспособных состояний *in silico* и полной потере ферментативной активности *in vitro*, что подтверждает каталитическую роль Tyr184. При замене S235A карбоксильные группы КП, не участвующие в метилировании, слабее связываются с остатками белка, что приводит к увеличению подвижности субстрата внутри активного центра *in silico* и повышенной каталитической активности *in vitro.*

На основе результатов МД предложен новый «карусельный» механизм работы фермента: последовательное метилирование молекулы КП достигается за счет ее вращения (подобно карусели) внутри гидрофобной полости фермента и поочередного поворота каждой карбоксильной группы к SAM. Промежуточные интермедиаты реакции (моно-, ди- и триметилированный КП) могут диссоциировать

из полости, однако последовательное метилирование сопровождается ростом степени гидрофобности молекулы лиганда, что снижает вероятность ее диссоциации и объясняет отсутствие накопления триметилированного продукта.

После завершения каталитического цикла на поверхности комплекса CPmtA/TMK формируется выраженный гидрофобный участок, который может способствовать ассоциации комплекса с мембраной. Полностью метилированный ТМК, в отличие от исходного КП, имеет более высокое сродство к фосфолипидному бислою и способен произвольно встраиваться в него, изменяя его свойства. Предполагается, что накопление ТМК способствует снижению активности дыхательной цепи и изменению свойств мембраны при переходе микобактерий в дормантное состояние.

Таким образом, компьютерное моделирование позволило предложить новый механизм работы CPmtA, связывающий метаболическую адаптацию микобактерий с изменением свойств клеточной мембраны.

Работа выполнена при поддержке РНФ (№ 24-15-00221).

Список литературы

Nikitushkin V.D., Shleeva M.O., Zinin A.I., Trutneva K.A., Ostrovsky D.N., Kaprelyants A.S. The main pigment of the dormant Mycobacterium smegmatis is porphyrin // FEMS Microbiology Letters. – 2016. – Vol. 363. – No. 19. – fnw206.

Varadi M. et al. AlphaFold protein structure database in 2024: providing structure coverage for over 214 million protein sequences // Nucleic Acids Res. – 2024. – Vol. 52. No. D1. – P. D368-D375.

Efremov R.G., Chugunov A.O., Pyrkov T.V., Priestle J.P., Arseniev A.S., Jacoby E. Molecular lipophilicity in protein modeling and drug design // Curr. Med. Chem. – 2007. – Vol. 14. – P. 393–415.

Abdelraheem E. et al. Methyltransferases: functions and applications // ChemBioChem. – 2022. – Vol. 23. – e202200212.

УДК 543.94

НАНОЧАСТИЦЫ С ФЕРМЕНТАТИВНО-ПОДОБНОЙ АКТИВНОСТЬЮ КАК АЛЬТЕРНАТИВА ФЕРМЕНТАМ В АНАЛИТИЧЕСКИХ ПРИМЕНЕНИЯХ

Панфёров В.Г., Бызова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, г. Москва, РФ.

Аннотация. В докладе представлены результаты цикла работ по исследованию свойств наночастиц с ферментативно-подобной активностью (нанозимов) для биоаналитических применений. Проведена сравнительная характеристика кинетических параметров пероксидазной активности (кажущаяся константа Михаэлиса, число оборотов) для нанозимов различного состава (Au, Ag, Pd, Pt, Ir, Ce) и структуры (моно- и мультиметаллические частицы, ядро@оболочка). Разработаны синтетические подходы, позволяющие получать нанозимы с кинетическими параметрами, соответствующими требованиям конкретных практических приложений. Разработаны иммуноаналитические системы с использованием нанозимов в качестве колориметрических и каталитических меток для детекции различных практически востребованных соединений.

Нанозимы широко применяются в качестве функциональных аналогов ферментов для решения различных биоаналитических и биомедицинских задач. В большинстве исследований нанозимы рассматриваются как замена ферментов без учета отличительных особенностей, свойственных данному виду синтетических катализаторов. Хотя репертуар нанозимов активно расширяется, особенности их функционирования в биоаналитических системах остаются систематически не изученными. Представленный цикл работ посвящен сравнительной характеристике нанозимов различного химического состава и исследованию механизмов катализируемой ими пероксидазной реакции. Установленные закономерности использованы для создания высокочувствительных иммунохимических систем с использованием нанозимов в качестве колориметрических и каталитических меток.

Получена серия препаратов моно- и мультиметаллических наночастиц различного химического состава и структуры [1]. Показана возможность синтеза высокостабильных частиц ядро@оболочка (Au@Ag, Au@Pd, Au@Pt, Au@Ir) с толщиной каталитически-активной оболочки от 0,2 нм до 50 нм [2, 3]. Показано, что большинство изученных нанозимов обладают одновременно пероксидазной, каталазной и оксидазной активностями. Поскольку для биоаналитических приложений наибольший интерес представляют нанозимы с пероксидазной активностью, проведен сравнительный анализ кинетических параметров нанозимов и пероксидазы хрена и показана сопоставимая каталитическая активность. Для всех частиц ядро@оболочка подтверждена прямая корреляция каталитической активности и толщины оболочки. Для серии препаратов Au@Pd и Au@Pt проведена количественная характеристика влияния толщины оболочки на кажущуюся константу Михаэлиса и удельную пероксидазную активность в реакции пероксидазного окисления. Показано, что увеличение толщины оболочки для наночастиц Au@Pt, Au@Pd, Au@Ir приводит к росту коэффициента молярной экстинкции, что может быть использовано для снижения предела иммунохроматографического анализа (ИХА), основанного на визуальной регистрации формирования окрашенных зон на тест-полоске.

Сочетание каталитических и оптических свойств делает нанозимы перспективными маркерами для высокочувствительных иммунохроматографических тест-систем. Показано, что в большинстве случаев нанозимы характеризуются пределом обнаружения в ИХА, сопоставимым с наночастицами золота. Дополнительная каталитическая амплификация непосредственно на тест-полоске позволяет существенно повысить интенсивность регистрируемого сигнала и снизить предел обнаружения на один-два порядка.

Кроме того, нанозимы Au@Pt, Au@Pd и Au@Ir являются высокостабильными катализаторами и сохраняют пероксидазную активность при температурах до 100 °C и pH < 0 [4, 5]. Высокая стабильность нанозимов использована для чувствительного ИХА афлатоксина B1 и фитопатогенов вирусной и бактериальной природы в биоматриксах с высокой эндогенной пероксидазной активностью. Нагрев тест-полосок и проведение каталитической реакции при низких значениях pH позволяют инактивировать природные пероксидазы и снизить предел обнаружения до 500 раз за счет каталитической активности нанозимов.

Разработаны тест-системы с использованием нанозимных меток для применения в медицинской диагностике (С-реактивный белок, рецептор-связывающий домен SARS-CoV-2), контроле сельскохозяйственной продукции и продуктов питания (фитопатогены, антибиотики, микотоксины).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской Федерации в лице Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2025-649 от 20 августа 2025 г.).

Список литературы

1. Panferov V.G., Zhang W., D'Abruzzo N., Wang S., Liu J. Kinetic profiling of oxidoreductase-mimicking nanozymes: impact of multiple activities, chemical transformations, and colloidal stability // ACS Nano. 2024. Vol. 18. P. 34870–34883.
2. Panferov V.G., Wang S., Zhang W., Liu J. Au@Ag, Au@Pd, Au@Pt and Au@Ir nanoparticles as colorimetric and peroxidase-like labels for lateral flow assays // ACS Applied Nano Materials. 2025. Vol. 8. P. 17754–17767
3. Panferov V.G., Byzova N.A., Shumaev K.B., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Tetrametallic Au @ Ag-Pd-Pt nanozyme with surface-exposed active sites for enhanced catalytic Activity // Nanomaterials. 2025. Vol. 15. № 1833.
4. Panferov V., Ivanov N., Zhang W., Wang S., Liu J. Utilizing the thermostability of nanozymes for joule heating to remove background peroxidase activities in lateral flow assays // ACS Sensors. 2025. Vol. 10. P. 3785–3793.
5. Panferov V.G., D'Abruzzo N., Byzova N.A., Liu J. Nanozyme-linked immunosorbent assays: a kinetic perspective // Langmuir. 2025. Vol. 41. P. 29924–29932

УДК

САМОЗАРЯЖАЮЩИЕСЯ ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ ЭЛЕКТРОДЫ: ОТ БИОСУПЕРКОНДЕНСАТОРОВ К САМОПИТАЮЩИМСЯ, САМОЗАПОМИНАЮЩИМ БИОСЕНСОРАМ

Парунова Ю.М.[1], **Миронова А.А.**[1], **Чатурведи В.**[2], **Шлеев С.В.**[1,2]

[1] *Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук. 119071 Москва, Ленинский пр-т, 33, корпус 2*
[2] *Департамент биомедицинских наук, Факультет здоровья и общества, Университет г. Мальмо, 20506 Мальмо, Швеция*
u.parunova@fbras.ru

Аннотация. Разработан новый тип биоэлектронных устройств - самозаряжающиеся биосуперконденсаторы. В данной работе показано, что биоаноды и биокатоды способны к самозаряду и сохраняют работоспособность после хранения. Представлены первые результаты по потенциометрическому самопитающемуся беспроводному биосенсору с функцией самозапоминания на основе ферментного электрода с редокс-гидрогелем и целлобиоздегидрогеназой, сохраняющему сигнал глюкозы до 24 часов.

Ключевые слова: биосуперконденсаторы, биосенсоры, редокс гидрогель, целлобиоздегидрогеназа.

Разработан новый тип биоэлектронных устройств: самозаряжающиеся биосуперконденсаторы, или, другими словами, заряд накапливающие (био)топливные элементы (рисунок 1) [1–4].

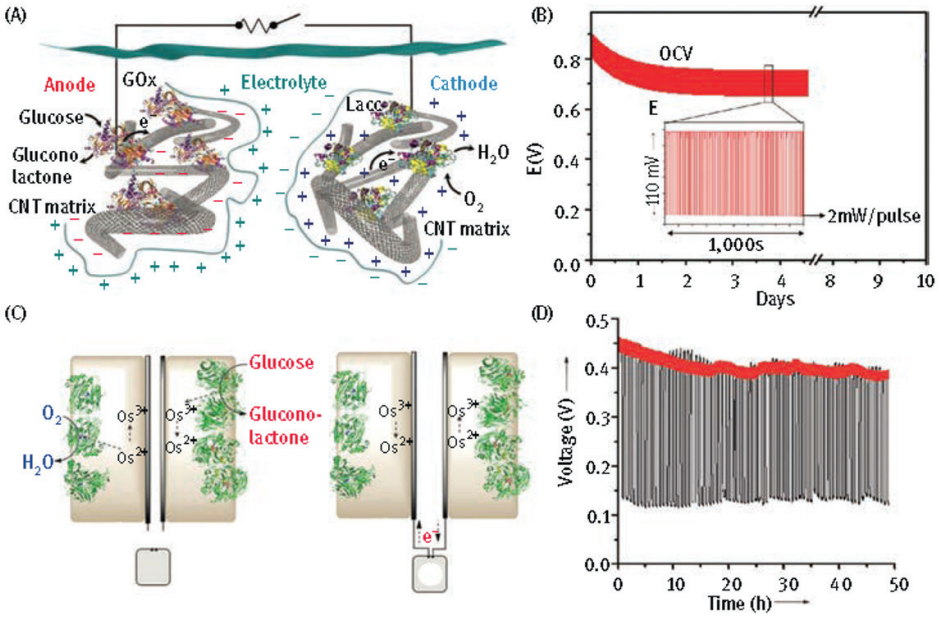


Рисунок 1. Схематическое представление и характеристики работы типичных глюкозо-кислородных биосуперконденсаторов**.** (A) Схема биоэлектронного устройства на основе электрохимического двойного слоя с глюкозооксидазой и лакказой. (B) Тест эксплуатационной стабильности биосуперконденсатора. (C) Схема биоустройства с использованием глюкозодегидрогеназы и билирубиноксидазы. (D) Тест эксплуатационной стабильности биосуперконденсатора при кратковременном разряде. Адаптировано из работы Santoro и соавт. [5].

Все самозаряжающиеся биосуперконденсаторы можно классифицировать на три типа: (i) основанные на высокой ёмкости электрического двойного слоя (рисунок 1A), (ii) использующие высокую псевдоёмкость, обусловленную Фарадеевскими процессами (рисунки 1C и 2A), и (iii) гибридные системы [2]. Принцип работы глюкозо-кислородного самозаряжающегося биосуперконденсатора, основанного на редокс-ферментах, иммобилизованных на электродах с применением осмийсодержащих редокс-гидрогелей, представлен на рисунках 1C и 2A. В процессе зарядки на биоаноде происходит ферментативное окисление глюкозы с одновременным восстановлением осмия, в то время как на биокатоде при восстановлении молекулярного кислорода происходит окисление осмия. Электроды поляризуются, а при разрядке происходят обратные редокс-превращения, а именно осмий окисляется на биоаноде и восстанавливается на биокатоде до достижения равновесного состояния (рисунок 2A).

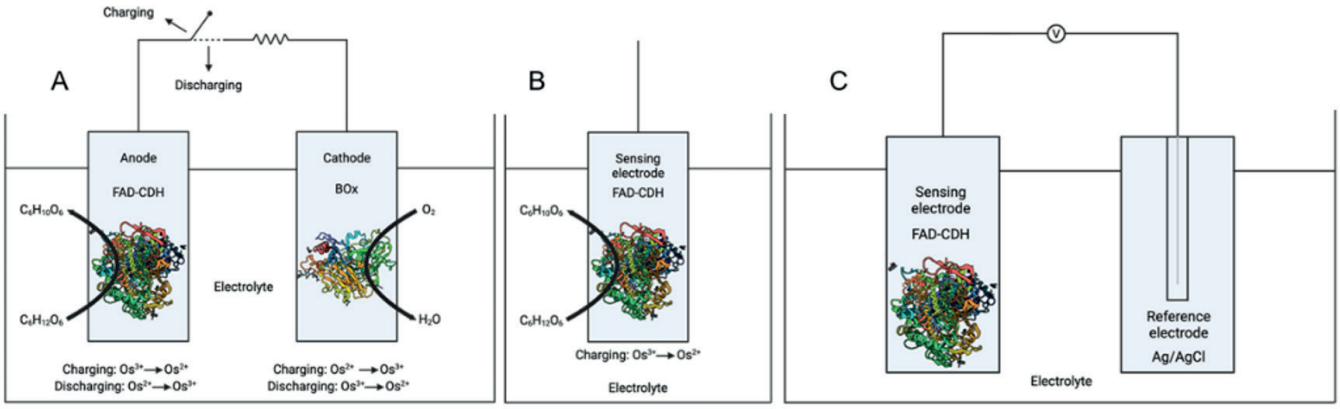


Рисунок 2. Схематическое представление преобразования глюкозо-кислородного самозаряжающегося биосуперконденсатора на основе редокс-гидрогелей в глюкозочувствительный одноэлектродный миниатюризируемый потенциометрический биосенсор. (A) Архитектура биоустройства с использованием глюкозодегидрогеназы и билирубиноксидазы. (B) Механизм самозаряда и поляризации одиночного биоанода. (C) Принцип работы автономного потенциометрического биосенсора с функцией регистрации и запоминания сигнала без внешнего источника питания.

В настоящей работе показано, что ферментные биоаноды и биокатоды на основе редокс-гидрогелей обладают способностью к самозаряду в присутствии субстратов оксидоредуктаз, а также сохраняют функциональные характеристики после хранения как во влажных, так и в сухих условиях. Данные подтверждены как потенциометрическими измерениями, так и видеофиксацией процессов. В отличие от них, биоэлектроды, работающие за счёт ёмкости электрического двойного слоя, не демонстрировали аналогичных свойств. Представлены первые результаты по созданию потенциометрических самопитающихся беспроводных биосенсоров с функцией самозапоминания сигнала, реализованных на основе ферментного электрода с редокс-гидрогелем и целлобиоздегидрогеназой, способных удерживать сигнал глюкозы до 24 часов (рисунок 3).

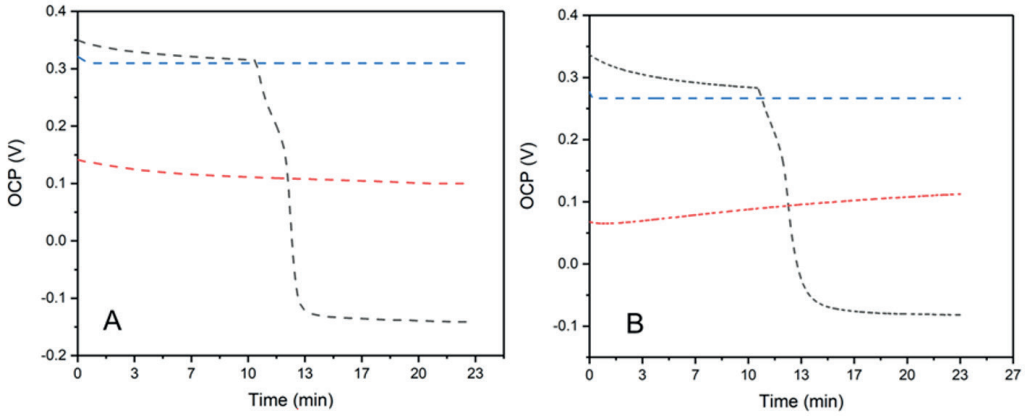


Рисунок 3. Типичные потенциограммы глюкозочувствительного одноэлектродного миниатюризируемого потенциометрического биосенсора. (А) Биосенсор на основе трафаретно-печатных углеродных электродов. (В) Биосенсор на основе спектрографического графита. Синие кривые – потенциодинамические отклики биоэлектродов после безжидкостного хранения в течение 24 часов в отсутствии глюкозы. Чёрные кривые – отклик при добавлении глюкозы на 10-й минуте. Красные кривые – отклик биоэлектродов после зарядки и последующего безжидкостного хранения в течение 24 часов. Перед началом измерений все электроды были окислены при потенциале 0,4 В отн. Ag/AgCl. Для модификации электродов использовали осмиевый редокс-полимер [Os(2,2′-бипиридин)$_2$(поливинилимидазол)$_{10}$Cl]$^+$ и диглицидиловый эфир поли(этиленгликоля).

Показано, что ферментные биоэлектроды на основе редокс-гидрогелей способны к самозаряду и длительному сохранению потенциометрического состояния после прекращения воздействия. В отличие от биоэлектронных систем, основанных на ёмкости электрического двойного слоя, они обеспечивают устойчивую поляризацию и объединяют функции преобразования энергии, её накопления и регистрации сигнала в одном элементе. Предложенная архитектура может быть реализована в виде простых микроструктур, что открывает путь к экстремальной миниатюризации биоэлектронных устройств. Разработанный подход создаёт основу для автономных биоэлектронных систем нового поколения, объединяющих функции сенсора, источника энергии и элемента памяти, и перспективных для имплантируемых сенсорных платформ.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 25-74-31020.

Список литературы

1. Shleev S., et al. Biosupercapacitors // Curr. Opin. Electrochem. – 2017. – Vol. 5. – P. 226.
2. Pankratov D., et al. Self-charging electrochemical biocapacitor // ChemElectroChem. – 2014. – Vol. 1. – P. 343.
3. Agnes C., et al. Supercapacitor/biofuel cell hybrids based on wired enzymes on carbon nanotube matrices: autonomous reloading after high power pulses in neutral buffered glucose solutions // Energy Environ. Sci. – 2014. – Vol. 7. – P. 1884.
4. Parunova Y. M., et al. Potentially implantable biocathode with the function of charge accumulation based on nanocomposite of polyaniline/carbon nanotubes // Russ. J. Electrochem. – 2016. – Vol. 52. – P. 1166.
5. Santoro C., et al. Supercapacitors in bioelectrochemical systems. Bioelectrochemistry: Design and Applications of Biomaterials. ed. S. Cosnier. Berlin: De Gruyter, 2019. – P. 189–212. – ISBN-13. 978-3110568981.

УДК 376:15

СОЗДАНИЕ НАНОБИОСКАВЕНДЖЕРОВ ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ И ГИДРОЛИЗА ЭФИРОВ КИСЛОТ ФОСФОРА

Паширова Т.Н.[1,2], Шайхутдинова З.М.[1,2], Васильева О.С.[1], Маланьева А.Г.[1], Фетин П.А.[3], Зорин И.М.[3], Миронов В.Ф.[2], Массон П.[1]

[1] Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, г. Казань, Республика Татарстан, РФ
[2] Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ Казанский научный центр РАН, г. Казань, Республика Татарстан, РФ
[3] Санкт-Петербургский государственный университет, Институт химии, г. Санкт-Петербург, РФ
tatyana_pashirova@mail.ru

Аннотация. В докладе представлен материал по конструированию биосовместимых нанокомпартментов (липосом, полимеросом, твердых липидных наночастиц) с инкапсулированными ферментами и созданию на их основе эффективных нанобиоскавенджеров, доказавших свою протективную эффективность *in vivo* в отношении фосфорорганического соединения (параоксон). Разработанный подход может быть применен на другие фермент-заместительные и детоксикационные системы.

Ключевые слова: фосфорорганические соединения, биоскавенджеры, липосомы, полимеросомы, твердые липидные наночастицы.

Фосфорорганические соединения (ФОС) являются мощными необратимыми ингибиторами серингидролаз, включая ключевые ферменты холинэстеразы (ХЭ). Терапия отравлений ФОС до настоящего времени остается несовершенной. Классический подход с использованием оксимных реактиваторов фосфорилированной ХЭ требует решения ряда проблем: ограниченный спектр действия, неспособность преодолевать гематоэнцефалический барьер, токсичность, узкое терапевтическое окно, нестабильность. Альтернативный путь – применение биоскавенджеров (ферментов), действующих стехиометрически или с каталитическим оборотом, – является эффективным, но все еще крайне дорогостоящим способом, а также характеризуется низкой стабильностью *in vivo* и иммуногенностью в случае гетерологичных ферментов. Актуальность исследования определяется необходимостью преодоления указанных ограничений и поиском новых подходов, позволяющих получать управляемые системы с реакциями, проходящими в ограниченном пространстве.

Разрабатываемая нами стратегия создания биокаталитических детоксикационных наносистем основана на получении нанокомпартментов – искусственных везикулярных структур (липосом, полимеросом, твердых липидных наночастиц (SLN)) с инкапсулированными ферментами (бутирилхолинэстераза человека hBChE, мутант фосфотриэстеразы (PTE) из гипертермофильной археи *Saccharolobus solfataricus*). В отличие от классических систем адресной доставки лекарств, ориентированных на контролируемое высвобождение агента, разрабатываемая стратегия реализуется на обратном принципе: обеспечении высокой локальной концентрации фермента внутри нанокомпартмента, захвате токсикантов за счет обратного градиента концентрации, протекании ферментативной реакции в условиях кинетики второго порядка и последующей элиминации нетоксичных продуктов.

Полимерсомы и липосомы были получены методом гидратации пленки, для SLN использовался метод двойной эмульсии. Нанобиоскавенджеры на основе амфифильных блоксополимеров (БС) полиэтиленгликоль-полипропиленсульфид (PEG-PPS), содержащие hBChE и PTE, обладают следующими свойствами: диаметр не более 200 нм, низкая PDI (не более 0,2), высокая стабильность (более года), эффективность инкапсуляции и загрузки (не менее 95% и не менее 6% соответственно), медленное

высвобождение ферментов (более 7 суток для hBChE), быстрый выход продукта – п-нитрофенола. Найдены закономерности протекания реакции, катализируемой BChE внутри нанокомпартментов, - влияние диаметра и типа мембраны нанокомпартмента, а также химической структуры субстрата (заряда и липофильности). Установлено, что нанобиоскавенджеры с инкапсулированным PTE более эффективны, чем PTE. Максимальное увеличение k_{cat} (в 5 раз) наблюдалось для полимеросом на основе диБС PEG-PPS, а максимальное увеличение k_{cat}/K_m (в 4 раза) – для PTE-липосом, по сравнению с ферментом.

Для наносистем на основе БС (полиакриловая кислота-полистирол), содержащих hBChE, выявлены закономерности для целенаправленного конструирования нанобиоскавенджеров и факторы, влияющие на ингибирование фермента: наличие в структуре БС длинноцепных алкильных фрагментов, образование агрегатов с размером менее 30 нм, а также образование смешанных полимер-ферментных ансамблей.

Получены новые биомиметические эритроцитарные наноструктуры на основе PEG-PPS, содержащие PTE: гибридные «камуфляжные» полимеросомы и эритроцитарные микрореакторы, обладающие высокой эффективностью инкапсулирования и загрузки (~90% и ~15% соответственно) и улучшенными (в ~2 раза) параметрами (каталитической эффективностью фермента и число оборотов).

Установлено, что инкапсулирование hBChE в PEG-PPS-полимеросомы влияет на фармакокинетические параметры фермента. Для PTE выявлено, что время распределения не зависит от типа нанокомпартмента, в то же время модификация поверхности PEG-PPS-полимеросом эритроцитарной мембраной приводит к увеличению периода полувыведения до ~1 ч.

Разработаны нанобиоскавенджеры PEG-PSS с PTE с высокой терапевтической эффективностью в отношении отравления ФОС (параоксон) при его подкожном введении мышам CD-1. Увеличение $ЛД_{50}$ (до 15,6) достигнуто при профилактическом введении диБС PEG-PSS с PTE. Для терапевтического применения наиболее эффективными ($ЛД_{50}$ ~ 9 раз) оказались эритроцитарные микрореакторы.

Таким образом, разработанный подход открывает широкие возможности для создания высокотехнологичных инструментов нового поколения и может быть расширен с применением различного мембранного материала, созданием биомиметических платформ для других типов клеток, в том числе систем, обеспечивающих таргетные, рецепторные и стимул-чувствительные свойства.

УДК 577.15.03:036

СТИМУЛЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИИОННЫХ ЖИДКОСТЕЙ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ И СОЗДАНИЯ БИОСЕНСОРНЫХ ПОКРЫТИЙ

Пергушов Д.В.[1], **Рудаков Н.С.**[1,2], **Сиголаева Л.В.**[1]

[1] *Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ*
[2] *Факультет наук о материалах МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ*
pergush@genebee.msu.ru

Аннотация. В докладе рассмотрено влияние йодид-анионов на модификацию проводящих поверхностей полиионной жидкостью полиимидазолиевого типа в контексте осуществления дальнейшей нековалентной иммобилизации ферментов, в частности, глюкозооксидазы, на таких поверхностях и создания на основе сформированных полимер-ферментных покрытий высокочувствительных электрохимических биосенсорных систем.

Ключевые слова: иммобилизация ферментов, биосенсорные покрытия, полимер-ферментные пленки, полиионная жидкость, глюкозооксидаза.

Одной из важнейших задач современной биосенсорики является разработка простых и удобных в реализации подходов к осуществлению эффективной и при этом недеструктивной иммобилизации биомолекул на сенсорных поверхностях [1-3]. Это позволяет создавать разнообразные биоаналитические устройства, которые обладают большим потенциалом практического применения в медицинской диагностике, экологическом мониторинге и пищевой промышленности. Во многих случаях подобной «деликатной» иммобилизации биомолекул, в частности, ферментов, удается достичь с помощью полимеров, в том числе так называемых стимулчувствительных полимеров [4], которые в настоящее время широко применяются для модификации твердых поверхностей. При этом полимерный слой на сенсорной поверхности представляет собой своеобразный «клей», концентрирующий и прочно фиксирующий на ней биомолекулы [3].

В данной работе проведено исследование влияния йодид-анионов на модификацию (путем адсорбции) проводящих (графитовых/золотых) поверхностей полиионной жидкостью – поли-1-этил-3-винилимидазолий бромидом – с целью осуществления дальнейшей нековалентной иммобилизации на них фермента – глюкозооксидазы – и создания на основе полученных полимер-ферментных покрытий высокочувствительных электрохимических биосенсорных систем [5].

Методом турбидиметрии обнаружено, что в присутствии йодида натрия водные растворы поли-1-этил-3-винилимидазолий бромида проявляют термочувствительность. Методом пьезоэлектрического микровзвешивания с мониторингом диссипации установлено, что адсорбция полиионной жидкости из содержащих йодид-анионы водных растворов (25°C) приводит к формированию на проводящей поверхности полимерных плёнок, масса которых значительно превышает массу полимерного покрытия, получаемого в случае адсорбции поли-1-этил-3-винилимидазолий бромида из бессолевого водного раствора в тех же условиях. При этом согласно данным атомно-силовой микроскопии практически сплошные плёнки образуются уже при концентрации полимера намного меньше той, которая соответствует формированию сплошных покрытий при адсорбции поли-1-этил-3-винилимидазолий бромида из бессолевого водного раствора. Методом пьезоэлектрического микровзвешивания с мониторингом диссипации показано, что полученные полимерные плёнки способны связывать глюкозооксидазу (pH 7, 25°C), причем количество иммобилизованного (путем адсорбции) фермента определяется в первую очередь массой адсорбированной полиионной жидкости и существенно возрастает, если её адсорбцию проводить в присутствии йодида натрия. Визуализация сформированных полимер-ферментных

покрытий методом атомно-силовой микроскопии указывает на то, что адсорбция глюкозооксидазы приводит к изменению нанорельефа поверхности полимерной плёнки, которая оказывается испещренной мелкими объектами с размером 10–20 нм (т.е. глобулами фермента), при этом степень заполнения исходной поверхности остается почти неизменной.

Посредством последовательной адсорбции полиинной жидкости (60 мМ NaI, 25°C) и глюкозооксидазы (pH 7, 25°C) на поверхность планарных графитовых электродов, предварительно модифицированных наночастицами диоксида марганца (медиатор с чувствительностью к пероксиду водорода), были сформированы биосенсорные системы для амперометрического определения глюкозы. Продемонстрировано, что они обладают высокой чувствительностью (7.6×10^{-2} А×$М^{-1}$×$см^{-2}$), низким пределом обнаружения (0.15 μM) и широким линейным диапазоном (0.15 μM – 0.3 мМ), а также проявляют превосходную операционную стабильность, показывая практически неизменные отклики при многократных (не менее 20) измерениях. Таким образом, полученные в рамках данной работы амперометрические ферментные биосенсорные системы могут представлять значительный интерес в практическом отношении, например, для использования в медицинской диагностике и пищевой промышленности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 25-23-00125, https://rscf.ru/project/25-23-00125/). Эксперименты методами атомно-силовой микроскопии и пьезоэлектрического микровзвешивания с мониторингом диссипации проведены с использованием оборудования, приобретенного по Программе развития МГУ имени М. В. Ломоносова.

Список литературы

1. Valikhani D., Bolivar J.M., Pelletier J.N. An overview of cytochrome P450 immobilization strategies for drug metabolism studies, biosensing, and biocatalytic applications: challenges and opportunities // ACS Catalysis. – 2021. – Vol. 11. – No. 15. – P. 9418–9434.
2. Khan S., Burciu B., Filipe C.D.M., Li Y., Dellinger K., Didar T.F. DNAzyme-based biosensors: immobilization strategies, applications, and future prospective // ACS Nano. – 2021. – Vol. 15. – No. 9. – P. 13943–13969.
3. Курочкин И.Н., Васильева А.Д., Евтушенко Е.Г., Еременко А.В., Пергушов Д.В., Сиголаева Л.В. Ферменты в развитии физико-химических методов для биомедицинских исследований // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. – 2023. – Т. 64. – № 4. – С. 353–376.
4. Schattling P., Jochum F.D., Theato P. Multi-stimuli responsive polymers – the all-in-one talents // Polymer Chemistry. – 2014. – Vol. 5. – No. 1. – P. 25–36.
5. Sigolaeva L.V., Rudakov N.S., Pergushov D.V. Leveraging sodium iodide for improved modification of conductive surfaces by an imidazolium-based poly(ionic liquid): toward engineering the electrochemical enzymatic biosensors // Macromolecular Chemistry and Physics. – 2026. – Vol. 227. – No. 2. – Art. e00396.

УДК 577.34+579.258

НАПРАВЛЕННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ СВОЙСТВ МИКРОБНЫХ РОДОПСИНОВ МЕТОДАМИ БЕЛКОВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Петровская Л.Е.[1,2], Крюкова Е. А.[1], Лукашев Е.П.[3], Силецкий С.А.[4], Максимов Е. Г.[3], Охрименко И.С.[2], Долгих Д.А.[1,3]

[1] Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия
[2] Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Московская обл., Россия
[3] Московский Государственный Университет им. М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия
[4] НИИ ФХБ им. А.Н.Белозерского, Московский Государственный Университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия
lpetr65@yahoo.com

Аннотация. В докладе представлены результаты исследований мутантных вариантов микробных родопсинов, обладающих новыми свойствами.

Ключевые слова: ретинальный белок, стабильность, спектр поглощения, фотоцикл, мутагенез

Микробные родопсины представляют собой интегральные мембранные белки, содержащие хромофор ретиналь. В ответ на поглощение света они осуществляют трансмембранный перенос ионов, сенсорные и другие функции. Растущий интерес к таким белкам вызван перспективами их использования для регуляции активности нейронов с помощью света, например, в проектах по восстановлению зрения.

Оптимизация молекул природных родопсинов для оптогенетического и биотехнологического использования проводится с целью повышения их термической стабильности, эффективности транспорта ионов, а также изменения оптических свойств [1]. Для достижения целевых характеристик может быть использован как точечный мутагенез, так и обмен структурными элементами между гомологичными белками [2]. Нами получен ряд точечных мутантов ESR – ретинального белка *Exiguobacterium sibiricum* [3]. Установлено, что замены остатка гистидина, входящего в состав противоиона для основания Шиффа, приводят к ингибированию обратных реакций переноса протона и повышению эффективности транспорта при низких pH [4].

Для получения протеолипосом с одинаково ориентированными молекулами белка получены слитные полипептиды, объединяющие ESR с различными растворимыми доменами. Показано, что N-концевые белки-партнеры Caf1M и MBP обеспечивают единообразное встраивание ESR в липидный бислой и высокую эффективность трансмембранного переноса протонов [5].

Впервые сконструирована система экспрессии ксантородопсина *Salinibacter ruber* (XR) в клетках бактерий [6]. С целью увеличения термической стабильности рекомбинантного XR получена и исследована серия гибридных белков, содержащих замены фрагментов последовательности XR на участки гомологичного родопсина *Gloeobacter violaceus* (GR). Обнаружено, что белки с оптимизированной последовательностью обладают повышенной стабильностью, а также демонстрируют ускоренный фотоцикл и повышенную эффективность транспорта протонов [7].

Работа проводится при финансовой поддержке гранта РНФ № 23-14-00160-П.

Список литературы

1. Kaneko A., Inoue K., Kojima K., Kandori H., Sudo Y. Conversion of microbial rhodopsins: insights into functionally essential elements and rational protein engineering // Biophysical Reviews. – 2017. – Vol. 9. – No. 6. – P. 861-876.

2. Bratanov D., Balandin T., Round E., Shevchenko V., Gushchin I., Polovinkin V., Borshchevskiy V., Gordeliy V. An approach to heterologous expression of membrane proteins. The case of bacteriorhodopsin // PLoS One. – 2015. – Vol. 10. – No. 6. – P. e0128390.
3. Balashov S.P., Petrovskaya L.E., Imasheva E.S., Lukashev E.P., Dioumaev A.K., Wang J.M., Sychev S.V., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Lanyi J.K. Breaking the carboxyl rule: lysine 96 facilitates reprotonation of the Schiff base in the photocycle of a retinal protein from *Exiguobacterium sibiricum* // Journal of Biological Chemistry. – 2013. – V. 288. – No. 29. – P. 21254-21265.
4. Siletsky S.A., Lukashev E.P., Mamedov M.D., Borisov V.B., Balashov S.P., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Petrovskaya L.E. His57 controls the efficiency of ESR, a light-driven proton pump from *Exiguobacterium sibiricum* at low and high pH // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. – 2021. – V. 1862. – No. 1. – P. 148328.
5. Petrovskaya L.E., Lukashev E.P., Mamedov M.D., Kryukova E.A., Balashov S.P., Dolgikh D.A., Rubin A.B., Kirpichnikov M P., Siletsky S.A. Oriented Insertion of ESR-Containing Hybrid Proteins in Proteoliposomes // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24. – No. 8. – P. 7369.
6. Petrovskaya L.E., Lukashev E.P., Lyukmanova E.N., Shulepko M.A., Kryukova E.A., Ziganshin R.H., Dolgikh D.A., Maksimov E.G., Rubin A.B., Kirpichnikov M.P., Lanyi, J.K., Balashov S.P. Expression of Xanthorhodopsin in *Escherichia coli* // The Protein Journal. – 2023. – Vol. 42. – No. 4. – P. 408-420.
7. Petrovskaya L.E., Bolshakov V.A., Lukashev E.P., Kryukova E.A., Maksimov E.G., Rubin A.B., Dolgikh D.A., Balashov S.P., Kirpichnikov M.P. Engineering of thermal stability in the recombinant xanthorhodopsin from *Salinibacter ruber* // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. – 2025. – Vol. 1866. – No. 2. – P. 149547.

ЧТО ВОЗМОЖНО И ЧТО ДОСТУПНО ДЛЯ ИМИДЖИНГА IN VIVO СЕГОДНЯ?

Плешков Д.Н.

ООО «Техноинфо», г. Москва, РФ
d.pleshkov@technoinfo.ru

Аннотация. Современный этап развития доклинических исследований характеризуется растущим разрывом между методологическими возможностями *in vivo* имиджинга и их экономической доступностью для исследовательских групп. С одной стороны, классические коммерческие системы типа IVIS Spectrum CT обеспечивают высокочувствительную мультимодальную визуализацию с возможностью 3D-реконструкции, однако высокая стоимость ограничивает их широкое внедрение. С другой стороны, в последние годы наблюдается активное развитие альтернативных технических решений. В настоящем докладе предлагается критический анализ четырёх категорий оборудования для прижизненной визуализации малых лабораторных животных.

Ключевые слова: визуализация in vivo, биолюминесценция, интравитальная микроскопия, оптоакустика, ПЭТ/КТ.

Принципиальное различие между рассматриваемыми подходами лежит в треугольнике «разрешение/поле зрения/глубина». Классикой жанра являются такие методы макроскопического имиджига, как МРТ/ПЭТ/КТ и люминесцентный имиджинг. Последний приобрел особенную популярность в связи с простотой в подготовке эксперимента и понятным методам интерпретации данных. Имя IVIS Spectrum стало практически нарицательным. Есть на рынке и российские разработки, например FireflAi. Основной недостаток метода – невысокое разрешение.

Интравитальная микроскопия напротив обеспечивает субклеточное разрешение (сотни нанометров) и позволяет наблюдать миграцию единичных клеток, динамику нейронов или межклеточные взаимодействия в реальном времени. Интеграция системы двухфотонного возбуждения позволяет увеличить глубину детекции и контраст. И если раньше для реализации такой методики требовалась сборка системы из множества отдельных компонентов разных производителей, то сегодня есть полностью интегрированное решение от корейской компании IVIM Technology, построенное по принципу IVIS Spectrum, чтобы максимально упростить подготовку эксперимента (который порой включает сложные хирургические вмешательства) и предоставить исследователю понятное ПО для обработки данных. Пропускная способность таких систем, однако, остаётся низкой.

На другом полюсе находится оптоакустическая томография, где оптическое возбуждение сочетается с акустической детекцией. Это позволяет существенно увеличить глубину визуализации до 2–3 см (то есть визуализировать всего грызуна целиком), получая функциональный контраст по гемоглобину, липидам или экзогенным красителям. Есть и примеры сочетания оптоакустики с методами флуоресцентной визуализации [2].

Развитие методов МРТ/ПЭТ/КТ в России в настоящее время напрямую связано с санкционными ограничениями. Наиболее доступными являются системы рентгеновской визуализации от китайской компании PingSeng [3].

Таким образом, сегодня исследователь может скомпоновать инструментальный парк, исходя из конкретной научной задачи, жертвуя либо разрешением, либо глубиной, либо полем зрения. Ключевым становится не гонка за максимальными характеристиками, а осознанный методологический компромисс.

Список литературы

1. Saeed Bohlooli Darian et al, International Journal of Medical Sciences, DOI: 10.7150/ijms.123395.
2. M.D. Mokrousov et al, Biomedical Optics Express, 12(6), 3181-3195(2021).
3. Penghao Ji et al, Advanced materials, DOI: 10.1002/adma.202415543

УДК 577.151

ОСОБЕННОСТИ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И СТАБИЛЬНОСТИ ФЕРМЕНТОВ, СИНТЕЗИРУЮЩИХСЯ ЛАКТОБАКТЕРИЯМИ ПРИ СОВМЕСТНОМ РОСТЕ С ПАТОГЕННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Пометун А.А.[1,2], Логинова А.А.[1,2], Лесь Е.К.[1,2], Ефремова А.Д.[1], Клейменов С.Ю.[1], Мордкович Н.Н.[1], Окорокова Н.А.[1], Чикурова Н.Ю.[1,2], Горбовская А.В.[1,2], Широкова А.А.[2], Бойко К.М.[1], Пометун Е.В.[3], Агеевец В.А.[4]

[1] Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, г. Москва, РФ
[2] Химический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
[3] ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), г. Москва, РФ
[4] ФГБУ ФНКЦИБ ФМБА России, г. Санкт-Петербург, РФ
aapometun@gmail.com

Аннотация. В докладе представлена информация об исследовании свойств белков лактобактерий, синтезирующихся при совместном культивировании с патогенными бактериями *Klebsiella pneumonia.* Показано, что такие белки метаболизма как L-лактатдегидрогеназа и цистеинсинтаза А обладают высокой термостабильностью и каталитической активностью по сравнению с ферментами из других источников. Для протеаз M23 и P60 показано, что они обладают сложной структурой и антибактериальными свойствами. Для гидролаз нуклеиновых кислот (рибонуклеозидгидролазы и нуклеотидазы) показаны особенности структуры и изучена субстратная специфичность.

Ключевые слова: рекомбинантные ферменты лактобактерий, стабильность ферментов, каталитическая активность.

Одним из механизмов взаимодействия лактобактерий с патогенными микроорганизмами является синтез различных ферментов, причем роль и функция некоторых из них остаются до сих пор малоизученными. Изучение структуры и свойств этих ферментов может помочь в понимании механизма взаимодействия между разными группами микроорганизмов, а также в создании антибактериальных препаратов на их основе. Было показано, что штаммы лактобактерий *Limosilactobacillus reuteri* LR1 и *Lacticaseibacillus rhamnosus* F при совместном культивировании с патогенными бактериями *Klebsiella pneumonia* секретируют во внешнюю среду такие группы ферментов, как гидролазы нуклеиновых кислот, протеазы, а также различные белки метаболизма [1].

В нашей лаборатории было проведено клонирование генов, кодирующих такие ферменты из лактобактерий как рибонуклеозидгидролаза C (LreRihC), протеазы M23 (LreM23) и p60 (Lrhp60), 5’-нуклеотидаза (LreBM), D-лактатдегидрогеназа (Lrh_DLDH) и L-лактатдегидрогеназа (Lre_LLDH), цистеинсинтаза A (LreCysK). Ферменты были получены в растворимой форме, для LreRihC, LreBM и LreCysK были специально разработаны методики определения ферментативной активности с помощью ВЭЖХ. Было показано, что LreCysK, Lre_LLDH обладают более высокой стабильностью и каталитической активностью, чем аналогичные ферменты из других источников. Для LreM23 была показана собственная антибактериальная активность, а также синергический эффект с некоторыми антибиотиками. Для Lrh_DLDH было показано, что она обладает более низкими значениями Км по лактату, но более высокими Км по пирувату по сравнению с DLDH из некоторых других лактобактерий. Для LreBM установлены особенности пространственной структуры и изучена субстратная специфичность.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 23-64-10029. https://rscf.ru/project/23-64-10029/

Список литературы
1. Savinova O.S., Glazunova O.A., Moiseenko K.V., Begunova A.V., Rozhkova I.V., Fedorova T.V. Exoproteome Analysis of Antagonistic Interactions between the Probiotic Bacteria *Limosilactobacillus reuteri* LR1 and *Lacticaseibacillus rhamnosus* F and Multidrug Resistant Strain of *Klebsiella pneumonia* // International Journal of Molecular Sciences – 2021, Vol. 22, P. 10999.

УДК 577.15 + 577.21

РЕКОМБИНАНТНЫЕ МЕДЬСОДЕРЖАЩИЕ ОКСИДАЗЫ ПРОКАРИОТ: ОТ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ ЭКСПРЕССИИ К БИОКАТАЛИТИЧЕСКИМ ПРИМЕНЕНИЯМ

Понаморева О.Н.[1], Трубицина Л.И.[2], Абдуллатыпов А.В.[1,3], Егоров К.А.[1], Трубицин И.В.[2], Дмитрук А.Р.[1], Алферов С.В.[1]

[1] ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», г. Тула, РФ
[2] ФИЦ ПНЦБИ РАН, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, г. Пущино, РФ
[3] ФИЦ ПНЦБИ РАН, Институт фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пущино, РФ
olgaponamoreva@mail.ru

Аннотация. Проведён целенаправленный подбор гетерологичных систем экспрессии для получения рекомбинантных медьсодержащих оксидаз (МСО) галофильных бактерий и архей. Показано, что эффективная наработка активных ферментов требует индивидуального комбинирования векторов, штаммов *Escherichia coli* и шаперонов. Для ряда полученных МСО впервые продемонстрирована способность окислять билирубин в комплексе с сывороточным альбумином, катализировать кросс-сшивку хитозана феруловой кислотой и осуществлять прямой перенос электронов при иммобилизации на модифицированные углеродные нанотрубки. Полученные результаты закладывают основу для дальнейшего изучения свойств новых МСО прокариот и их использования в биоаналитических системах, создании функциональных биоматериалов и биоэлектрокатализе.

Ключевые слова: медьсодержащие оксидазы прокариот, двухдоменные лакказы, гетерологичная экспрессия, билирубин, биоэлектрокатализ.

Медьсодержащие оксидазы прокариот, особенно двухдоменные (2Д) лакказы, привлекают внимание благодаря термостабильности, активности в нейтральной и щелочной средах и устойчивости к галогенидам [1, 2]. Однако их широкое использование ограничено трудностями гетерологичной экспрессии, часто приводящей к образованию телец включения, а также недостаточной изученностью каталитического потенциала в отношении сложных субстратов. Цель данной работы — получение активных рекомбинантных МСО бактерий и архей и демонстрация их возможностей в реакциях окисления билирубина, модификации хитозана и прямом биоэлектрокатализе.

Гены МСО клонировали в векторы pQE-30 (T5-промотор) и серии pET (T7-промотор). Экспрессию проводили в штаммах *E. coli* M15 [pREP4], BL21 Star(DE3), BL21-CodonPlus(DE3), Origami B(DE3), T7 Express, ArcticExpress и Shuffle, а для трёхдоменных (3Д) лакказ дополнительно использовали шаперонные плазмиды pGro7, pKJE7, pG-KJE8. Ферменты выделяли металл-хелатной хроматографией, активность оценивали по окислению ABTS и 2,6-диметоксифенола. Билирубинокисляющую активность измеряли спектрофотометрически (фосфатный буфер, pH 8,4) в присутствии бычьего сывороточного альбумина. Модификацию хитозана феруловой кислотой (ФК) осуществляли при pH 7,0 с помощью лакказы ScaSL; степень сшивки определяли гравиметрически, механизм подтверждали квантово-химическими расчётами и ИК-спектроскопией. Для биоэлектрокатализа двухдоменные лакказы иммобилизовали на стеклоуглеродные электроды, модифицированные нафтилированными многостенными углеродными нанотрубками (МУНТнафт). Электрохимические измерения проводили методом циклической вольтамперометрии в аэробных и анаэробных условиях.

Анализ комбинаций вектор/штамм показал, что эффективная продукция нативных МСО достигается только при учёте доменной структуры и источника гена. Так, для 2Д-лакказы архей Hg2 критичным оказался строгий контроль транскрипции (система pQE-30/*E. coli* M15), тогда как ген бактериальной лакказы Mar.m экспрессировался в этой же системе с высоким выходом без дополнительных шаперонов благодаря оптимизированному кодоновому составу. Для 3Д-лакказы архей Ht6 правильный фол-

динг требовал коэкспрессии шаперонов pGro7 или pKJE7 в штаммах ArcticExpress или Origami B, тогда как бактериальные 3Д-лакказы Marv2 и Ss успешно нарабатывались в стандартных высокопродуктивных штаммах T7 Express и BL21 Star. Таким образом, универсальная система экспрессии отсутствует, однако целенаправленный скрининг позволил получить активные препараты всех целевых ферментов.

Лакказа ScaSL, проявляющая оптимум активности с фенолами при pH 7,0, была применена для кросс-сшивки хитозана феруловой кислотой [3]. Максимальная степень сшивки 85 % достигалась при соотношении NH_2/ФК = 10:1. Данные квантово-химических расчётов и ИК-спектроскопии подтвердили, что сшивка идёт по пути присоединения Михаэля с последующей рекомбинацией радикалов по β-β-положениям, что сохраняет фенольные гидроксилы и придаёт гелям выраженную антиоксидантную активность.

В области биоэлектрокатализа предложен подход «нафтильный ключ» — иммобилизация двухдоменных лакказ на МУНТнафт (рис. 1) [4]. Согласно результатам молекулярного докинга, нафталин связывается вблизи Т1-центра на расстоянии ~7,9–9,4 Å от меди. На вольтамперограммах электродов МУНТнафт-2Д-лакказа зафиксирована катодная волна восстановления O_2 с началом при +0,44 В относительно Ag/AgCl (+0,64 В отн. NHE), отсутствовавшая в аргоне и на контрольном электроде без нафтильных групп. Доля правильно ориентированных молекул достигла 56 % (против ≤10 % при неспецифической адсорбции). Иммобилизованный фермент сохранял 50 % активности после 1 ч при 90 °C и стабильно работал не менее 8 циклов.

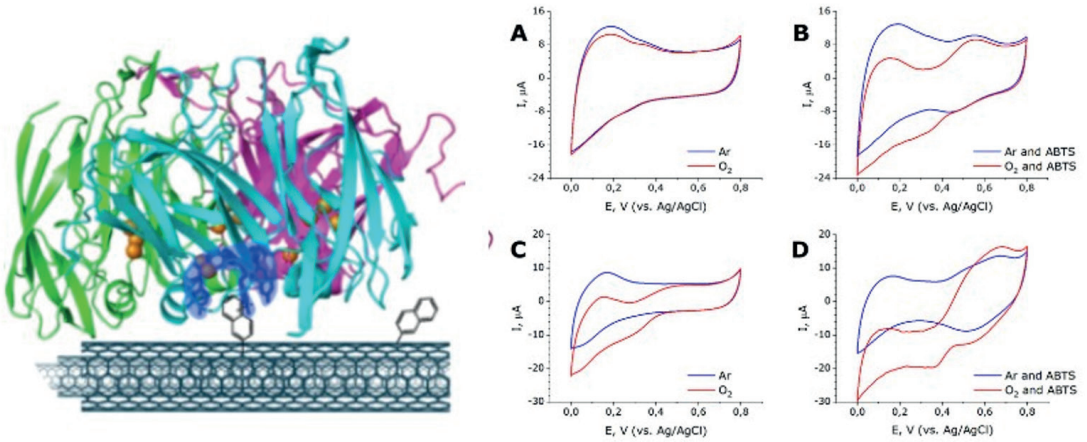


Рисунок 1. Схематическое представление иммобилизации 2Д-лакказы по типу «нафтильный ключ» и циклические вольтамперограммы электродов (ЦВА) МУНТ-SoSL в атмосфере воздуха (красные линии) и аргона (синие линии): вверху (A,B) – МУНТок-SoSL; снизу (C,D) – МУНТнафт-SoSL; слева (A,C) – ЦВА при отсутствии ABTS; справа (B,D) – ЦВА в присутствии ABTS.

Впервые установлено, что 2Д-лакказы ScaSL и SoSL эффективно окисляют неконъюгированный билирубин в комплексе с сывороточным альбумином. При концентрации субстрата 100 мкМ удельная скорость окисления составила 70 ± 10 мкмоль·мин$^{-1}$·мг$^{-1}$ для ScaSL и 39 ± 4 мкмоль·мин$^{-1}$·мг$^{-1}$ для SoSL, в то время как коммерческая билирубиноксидаза из *Myrothecium verrucaria* обеспечивала лишь 28 ± 8 мкмоль·мин$^{-1}$·мг$^{-1}$. По результатам молекулярного докинга, расстояние от пиррольных колец билирубина до иона меди в активном центре лакказ (~9 Å) меньше, чем в истинной билирубиноксидазе (12,8 Å), что объясняет более высокую каталитическую эффективность. Эти результаты открывают перспективу замены грибной билирубиноксидазы на стабильные рекомбинантные лакказы в биоаналитических системах.

Таким образом, целенаправленный подбор экспрессионных систем обеспечил получение высокоактивных рекомбинантных МСО прокариот. Продемонстрированы первые результаты их применения: уникальная билирубинокисляющая способность, эффективная модификация хитозана с образованием антиоксидантных гидрогелей и прямой биоэлектрокатализ при направленной иммобилизации. Дальнейшее изучение новых ферментов расширит спектр их биокаталитических возможностей.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 24-14-20013, https://rscf.ru/project/24-14-20013, и Комитета по науке и инноватике Тульской области.

Список литературы

1. Kaur R., Salwan R., Sharma V. Structural properties, genomic distribution of laccases from Streptomyces and their potential applications. // Process Biochemistry. – 2022. – V. 118. – P. 133-144.
2. Trubitsina, L., et al. Site-Directed Mutagenesis of Two-Domain Laccase ScaSL for Obtaining a Biocatalyst with Improved Characteristics. // Catalysts. – 2024. – V. 14 (10). – P. 1-30.
3. Дмитрук А.Р. и др. Модификация хитозана феруловой кислотой в присутствии бактериальной лакказы: реакция присоединения по Михаэлю или образование оснований Шиффа? // Кинетика и катализ. – 2025. – № 4. – С. 251–261.
4. Trubitsina L.I. et al. Bioelectrocatalyst for O_2 reduction based on a novel recombinant two-domain laccase from *Streptomyces ochraceiscleroticus* immobilized on naphthyl-modified MWCNTs // Int. J. Mol. Sci. – 2025. – V. 26 (18). – P. 1-20.

УДК 615.457.5

НАНОЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЯ ДНК ДЛЯ ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ

Попова Е.В., Тихомирова В.Е., Кост О.А.

Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
popova.ekaterina1995@gmail.com

Аннотация. В работе представлено исследование сорбции ДНК на хитозановых, хитозан-альгинатных частицах, а также частицах фосфата кальция с хитозановым покрытием. Показана высокая эффективность сорбции ДНК на всех типах частиц. Значимое высвобождение ДНК наблюдалось только при высокой концентрации фосфат-аниона 0,5М и значительно более сильное в случае использования фосфатного буфера, содержащего 0,15М NaCl.

Ключевые слова: хитозан, ДНК, наночастицы, офтальмология.

Терапия глазных заболеваний обычно осуществляется препаратами в форме капель. Этот способ прост, неинвазивен и может осуществляться самим пациентом. Однако из-за наличия барьеров слезной пленки, роговицы, склеры/конъюнктивы в ткани глаза попадает не более 5% действующего вещества. Для повышения биодоступности лекарственных средств можно использовать различные подходы, наиболее инновационным из которых является использование наноразмерных носителей [1].

Ключевой компонент слизистой оболочки поверхности глаза – муцин. Это семейство крупных гликопротеинов, которые несут отрицательный заряд благодаря сиаловым кислотам. Таким образом, наиболее высоким сродством к поверхности глаза обладают положительно заряженные частицы. Их можно получить на основе природного биополимера хитозана. В данной работе осуществляли сорбцию ДНК на трех типах хитозан-содержащих частиц: непосредственно хитозановые частицы (А), гибридные частицы на основе фосфата кальция и хитозана (Б), а также хитозан-альгинатные частицы (В).

Получение всех типов частиц осуществляли методом ионотропного гелеобразования: (А) и (Б) получали из хитозана с молекулярной массой 5 кДа с помощью триполифосфата натрия [3], а (В) – взаимодействием хитозана с молекулярной массой 50-190 кДа и альгината натрия. Характеристики частиц приведены в таблице 1.

Таблица 1. Гидродинамический диаметр и ζ-потенциал используемых в работе частиц.

Частицы	d, нм	PDI	ζ, мВ
Хитозановые (А)	110±15	0,2	+23±2
Гибридные (Б)	160±25	0,21	+12±2
Хитозан-альгинатные (В)	570±75	0,49	+21±2

В качестве препарата, содержащего ДНК, использовали Деринат © – натриевая соль ДНК, полученная из молок осетровых и лососевых рыб. Деринат © проявляет антиоксидантные, гемостимулирующие, обезболивающие, противовирусные свойства. В экспериментах по восстановлению роговицы после ее скарификации у живых кроликов применение Дерината © приводило к более ранней реэпитализации тканей как по сравнению с интактными кроликами, так и получавших лечение Корнегелем. У кроликов с офтальмогерпесом, которым инстиллировали Деринат ©, наблюдалась более высокая антиокислительная активность в слезе, по сравнению с контрольной группой [2].

Сорбцию ДНК (15-150 мкг/мл) осуществляли на уже готовых частицах в течение 24 часов. Как видно из рисунка 1А, насыщение гибридных частиц ДНК происходило уже при концентрации 50 мкг/мл, дальнейшее увеличение концентрации ДНК не приводило к увеличению сорбции. В свою очередь, при сорбции как на хитозановых, так и на хитозан-альгинатных частицах, зависимость массы сорбированной ДНК от концентрации представляла собой практически прямую, то есть, насыщение не достигалось. По-видимому, это связано с количеством хитозана на всех типах частиц: гибридные частицы образуются из 2 масс. фосфата кальция и 1 масс. хитозана, таким образом, хитозана в гибридных в три раза меньше, чем в хитозановых. При получении хитозан-альгинатных частиц хитозана было по массе в 5 раз больше, чем альгината натрия, то есть, в основном, эти частицы состоят из хитозана. Этим может объясняться практически идентичный ход для этих частиц зависимости массы сорбированной ДНК от ее концентрации. Отметим, что при получении хитозановых и хитозан-альгинатных частиц использовались различные типы хитозана, однако это не повлияло на сорбцию ДНК в изучаемом диапазоне.

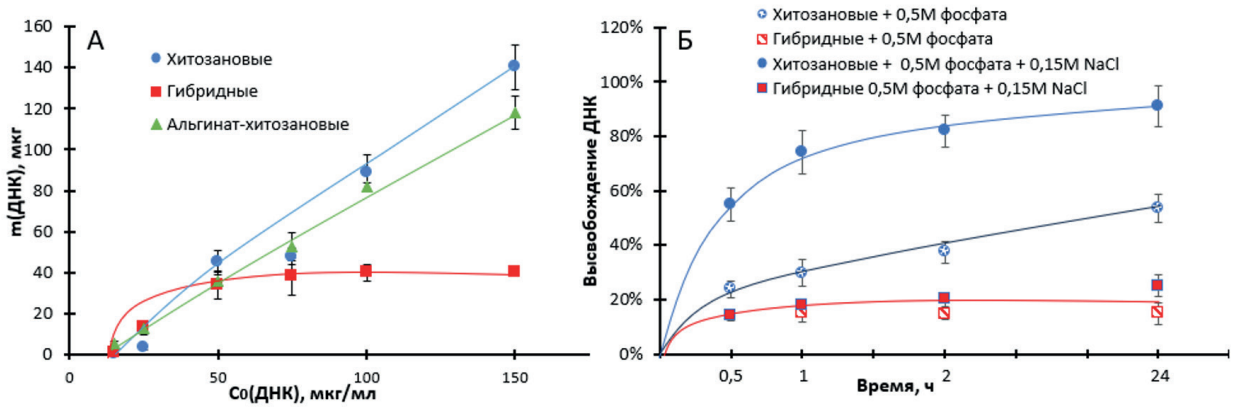


Рисунок 1. А. Сорбция ДНК на хитозановых, гибридных и хитозан-альгинатных частицах. Б. Высвобождение ДНК из хитозановых и гибридных частиц в 0,5 М фосфатном буфере. Концентрация ДНК при получении частиц 50 мкг/мл. Данные по высвобождению ДНК из хитозановых и хитозан-альгинатных частиц практически идентичны.

Изучение высвобождения ДНК проводили в физиологическом растворе, 0,05-0,5 М фосфатном буфере, а также в 0,5 М фосфатном буфере с 0,15 М NaCl. Все растворы имели pH 6,5. Начальная концентрация ДНК составляла 50 мкг/мл, поскольку при этом на частицах сорбировалась примерно одинаковая масса ДНК (процент включения ДНК составлял 80±10%). Высвобождение из всех видов частиц практически отсутствовало в физиологическом растворе, а также в 0,05-0,25 М фосфатном буфере. По-видимому, это связано с характером связывания ДНК и хитозана: положительно заряженные аминогруппы хитозана взаимодействуют с фосфатными группами в остове ДНК, кроме того, помимо электростатики, важную роль играют водородные связи. Например, хитозан может образовывать связи с азотистыми основаниями ДНК. Высокая концентрация соли способствует разрушению ионных связей, однако водородные достаточно устойчивы при высокой ионной силе раствора, таким образом, не происходило высвобождения ДНК в растворе NaCl или при низкой концентрации буфера. В свою очередь, использование 0,5 М фосфатного буфера приводило к значимому высвобождению ДНК из хитозановых и хитозан-альгинатных частиц, поскольку фосфат-анионы могут конкурировать с ДНК, заменяя отрицательно заряженный фосфатный остов ДНК, связываясь с аминогруппами хитозана. При этом, из хитозановых и хитозан-альгинатных максимально высвобождалось около 50% ДНК, а из гибридных – только около 15%, что говорит о высокой стабильности комплекса даже при высокой концентрации конкурирующего иона. Добавление к 0,5 М раствору фосфатного буфера 0,15 М NaCl приводило к увеличению высвобождения ДНК до 80% в случае хитозановых и хитозан-альгинатных частиц и до 25% в случае гибридных. По-видимому, сочетание конкуренции за аминогруппы фосфат-аниона и высокая ионная сила позволили диссоциировать комплексу хитозан-ДНК.

Изучение сорбции ДНК на различных типах частиц, содержащих хитозан, показало высокую эффективность взаимодействия препарата Деринат © с носителями. При этом, сочетание большого количества ДНК, которое сорбируется на частицах, с затрудненным высвобождением может иметь положительный терапевтический эффект: благодаря положительному заряду частиц они могут эффективно и длительно удерживаться на поверхности глаза, а отсутствие диссоциации комплекса хитозан-ДНК позволит препарату проявлять терапевтическое действие на всем протяжении нахождения частиц на глазу.

Исследование выполнено в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова (121041500039-8).

Список литературы

1. Vaneev, A. et al. Nanotechnology for Topical Drug Delivery to the Anterior Segment of the Eye. // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22. – No. 22. – P.12368

2. Щипанова А.И. и др. Медико-биологическая оценка новой глазной лекарственной формы отечественного препарата Деринат // Российский офтальмологический журнал. – 2012. – Т. 5. – No. 2. – P. 88-91.

3. Popova, E. V. et al. Calcium phosphate nanoparticles as carriers of low and high molecular weight compounds. // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Vol. 25. – No. 23. – P.12887.

УДК 543.9

МИКРОФЛЮИДНЫЕ КАРТРИДЖНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ IVD

Прусаков К.А.[1], Алдаров К.А.[1], Столяров В.Ю.[1], Сорокина О.Н.[2], Воробьёва А.К.[2], Константинова Т.С.[2], Ерёменко А.В.[2], Курочкин И.Н.[2,3], Басманов Д.В.[1]

[1] ФНКЦ Физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА, Москва, Россия
[2] Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия
[3] Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
kaprusakov@gmail.com

Аннотация. Представлены оригинальные аналитические платформы для автоматического проведения иммуно-анализов в формате одноразовых флюидных картриджей. Описана конструкция инновационных узлов флюидной автоматизации картриджных систем, таких как поворотные распределительные клапаны, реакционные камеры. Также представлен прототип прибора-анализатора для автоматического процессинга картриджей и детекции сигналов. Представлены результаты апробации разработанной платформы на серии клинических образцов сыворотки крови.

Ключевые слова: микрофлюидные картриджи, иммуноферментный анализ, автоматические аналитически платформы

Автоматизация медицинских анализов – одни из основных трендов технического развития современной медицины. Современные системы роботизации позволяют заменить ручной труд лаборантов по процессингу растворов, что позволяет ускорить процедуру проведения анализа, сократить необходимые объёмы реагентов, повысить надёжность, снизить стоимость. Особый интерес представляют системы на основе одноразовых картриджей, так как они позволяют проводить анализ в закрытых замкнутых флюидных системах. Такой подход связан с меньшими рисками контаминации растворов и внешнего окружения, позволяет проводить анализы в экспресс формате, в полевых условиях или для нужд прикроватной и персонализированной медицины.

В Центре Технологий и Микрофабрикации ФНКЦ Физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России ведутся передовые разработки оригинальных аналитических систем для автоматического проведения иммуно-анализов в формате одноразовых флюидных картриджей. Были разработаны новаторские конструкции и технологии производства ключевых элементов микрофлюидной автоматизации – поворотных распределительных клапанов. В ходе совместной работы с Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН на основе этих элементов было создано несколько прототипов одноразовых микрофлюидных картриджей для автоматического ИФА на микрочастицах. При этом использовались такие технологии прототипирования, как лазерная абляция и фотополимерная 3D печать. Кроме того, была предложена оригинальная конструкция реакционной камеры, которая позволяет удерживать микрочастицы при смене рабочих растворов и при промывках. Для этого в реакционной камере используется микрофильтрующая мембрана на специальной поддерживающей структуре.

В ходе конструкторской и экспериментальной работы с созданными прототипами было определен наиболее удачный способ создания потоков жидкости в разработанных флюидных системах: небольшое вакуумное разряжение до – 0,5 Атм. Такой способ создания потоков позволяет без остатка перекачивать растворы между узлами (камерами, резервуарами) флюидного картриджа. При этом скорость потока остаётся невысокой, что позволяет избежать образования пузырьков воздуха или «вспенивания» растворов.

Для процессинга картриджей был разработан прототип прибора-анализатора, который в автоматическом режиме управляет положением клапанов и давлениями внутри флюидной системы. Эта аналитическая платформа была протестирована на серии клинических образцов сыворотки крови и продемонстрировала свою работоспособность в автоматическом режиме. При этом на анализ одного образца требуется минее 45 минут.

Дальнейшие технические изыскания, а также обзор литературы, патентный поиск и анализ рынка показали, что наиболее перспективная технология производства одноразовых флюидных картриджей – это термо-литье под давлением (ТПА). В докладе представлены последние результаты научно-исследовательской и опытно-конструкторской работы в этом направлении.

Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования по темам №122041400080-0 и №124031500113-3.

УДК 577:15

МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ПИРОФОСФАТАЗА ЧЕЛОВЕКА HPPA2: СТРУКТУРНАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЯДА ПАТОГЕННЫХ МУТАНТНЫХ ВАРИАНТОВ

Родина Е.В.[1], **Курилова С.А.**[2], **Воробьева Н.Н.**[2]

[1] *Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ*
[2] *НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, РФ*
rodina@belozersky.msu.ru

Аннотация. В докладе представлена информация о текущем состоянии исследований митохондриальной пирофосфатазы человека hPPA2 *in vitro* и *in silico*. Проанализированы факторы, которые могут быть вовлечены в регуляцию активности фермента. Приведена характеристика каталитических свойств ряда новых мутантных вариантов, соответствующих патогенным вариантам hPPA2. Охарактеризованы каталитически важные конформационные изменения hPPA2 и влияние на них мутаций.

Ключевые слова: неорганическая пирофосфатаза, митохондрия, патогенные мутации, структура, активность.

Растворимые неорганические пирофосфатазы (PPазы) катализируют металлозависимый гидролиз неорганического пирофосфата PP_i. Эти ферменты распространены во всех доменах жизни, их наиболее известная метаболическая роль заключается в обеспечении эндергонических реакций биосинтеза, в которых PP_i образуется в качестве одного из продуктов. Ядерный геном некоторых эукариот кодирует две изоформы PPаз, цитоплазматическую PPA1 и митохондриальную PPA2 (у человека, соответственно, hPPA1 и hPPA2). Метаболическая роль PPA2 до сих пор не до конца выяснена, однако исследования на дрожжах и животных показывают ключевую роль этого фермента в респираторной и других функциях митохондрий [1, 2]. У человека биаллельные мутации в гене hPPA2 вызывают серьезную дисфункцию митохондрий и приводят к летальным кардиопатологиям [2, 3]. Каким образом данные мутации нарушают структуру и функцию hPPA2, пока не выяснено. Настоящая работа направлена на характеристику метаболической роли и путей регуляции hPPA2, а также на выяснение молекулярных основ влияния патогенных мутаций на ее функцию.

В работе была получена и охарактеризована *in vitro* рекомбинантная пирофосфатаза hPPA2, а также ряд ее мутантных вариантов. Для нативного фермента исследована стационарная кинетика гидролиза пирофосфата и охарактеризовано влияние различных факторов, включая ряд распространенных метаболитов, на ферментативную активность. Анализ полученных результатов показывает, что условия, соответствующие митохондриальному матриксу, является неоптимальной для работы hPPA2, поэтому даже небольшие изменения концентрации Mg^{2+}, pH и редокс-потенциала, характерные для митохондриальной метаболической регуляции, значительно изменяют активность фермента. Были найдены несколько метаболитов – ингибиторов или активаторов hPPA2, в частности, цитрат, 2-оксоглутарат, уридин и пр. Для найденных низкомолекулярных эффекторов фермента исследованы возможные механизмы их действия. Потенциальные сайты связывания данных эффекторов с белком охарактеризованы с помощью молекулярного докинга. Показано, что неселективное окисление или селективная модификация тиольных групп остатков цистеина в составе hPPA2 приводит к существенному снижению активности фермента, что является молекулярной основой его редокс-чувствительности. Масс-спектрометрический анализ позволил выявить, какие именно остатки цистеина при этом модифицируются. Ведется работа по выяснению роли идентифицированных -SH групп в функции фермента.

Структура белка в динамике исследована для модельной структуры hPPA2 методом симуляции молекулярной динамики. Охарактеризованы изменения структуры белка, важные для катализа, в том

числе найдено новое, не обнаруженное ранее в кристаллических структурах гомологичных PPаз промежуточное конформационное состояние в каталитическом цикле. В структуре белка идентифицирована Ω-петля, уникальная для митохондриальных PPаз животных. Было обнаружено, что эта петля представляет собой один из возможных центров связывания некоторых низкомолекулярных эффекторов hPPA2; при этом конформация Ω-петли и характер связывания с ней лигандов отражает конформационное состояние активного центра фермента, что может служить основой аллостерического влияния данных эффекторов на активность hPPA2.

Для мутантных вариантов hPPA2 Met106Ile, Arg127Leu, Pro167Leu, Glu172Lys и Gln294Pro, соответствующих природным патогенным вариантам белка, исследована стационарная кинетика гидролиза субстрата *in vitro*. Из тестированных вариантов все замены, независимо от расположения мутированных остатков в структуре белка, приводят к существенному снижению каталитической активности – до 20% у Met106Ile и Gln294Pro и до 2% у Arg127Leu, Glu172Lys и Pro167Leu. Замены остатков активного центра Arg127Leu и Pro167Leu приводят к снижению V_{max} в 50 раз, вариант Arg127Leu дополнительно характеризуется существенным (примерно вдвое) увеличением K_m, что ожидаемо, поскольку соответствующий остаток аргинина в гомологичных PPазах принимает участие в связывании субстрата и продукта реакции. У вариантов Met106Ile и Gln294Pro сохраняется и характер связывания кофакторных ионов Mg^{2+}, и сродство к ним, в то время как у Arg127Leu и Pro167Leu кооперативность связывания Mg^{2+} становится ярко выраженной, зависимость имеет сигмоидальный характер с коэффициентом Хилла выше 2. Была проведена симуляция молекулярной динамики мутантных вариантов, результаты которой позволяют сделать предположения о влиянии данных замен на конформационную динамику hPPA2 и о возможных причинах их ингибирующего действия.

Полученные в работе результаты позволяют лучше понять роль hPPA2 в метаболизме и возможные пути ее регуляции, а также охарактеризовать молекулярные причины патогенности исследованных природных мутаций.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова, регистрационные номера 121031300037-7 и 123063000002-7.

Список литературы

1. Lundin M., Baltscheffsky H., Ronne H. Yeast PPA2 gene encodes a mitochondrial inorganic pyrophosphatase that is essential for mitochondrial function// J. Biol. Chem. – 1991. – Vol. 266. – No. 19. – P. 12168–12172.
2. Kennedy H et al. Sudden cardiac death due to deficiency of the mitochondrial inorganic pyrophosphatase PPA2// Am. J. Hum. Genet. – 2016. – Vol. 99. – No. 3. – P. 674–682.
3. Guimier A. et al. Biallelic PPA2 mutations cause sudden unexpected cardiac arrest in infancy// Am. J. Hum. Genet. – 2016. – Vol. 99. – No. 12. – P. 666–673.

УДК 577.29; 577.2.08; 577.15.08

БИОЧИПЫ С ФЕРМЕНТАТИВНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ НА ОСНОВЕ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИРУЮЩИХСЯ ГЕНОВ БЕТА-ЛАКТАМАЗ РАЗНЫХ КЛАССОВ

Рубцова М.Ю., Преснова Г.В., Уляшова М.М., Егоров А.М.

Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
myr@enz.chem.msu.ru

Аннотация. Распространение устойчивых к антибиотикам патогенных бактерий является глобальной проблемой здравоохранения, требующей развития новых подходов к диагностике и лечению. Учитывая разнообразие генетических факторов, определяющих антибиотикорезистентность патогенов, актуальным для диагностики является развитие мультиплексных биоаналитических методов и технологий. Разработанные нами колориметрические биочипы с ферментативной детекцией на основе пероксидазы хрена характеризуются высокой чувствительностью и воспроизводимостью аналитических сигналов и могут использоваться для идентификации генов антибиотикорезистентности, а также для определения их экспрессии по концентрации специфичных мРНК.

Ключевые слова: биочипы, мультианализ, ферментативная детекция, гены бета-лактамаз, антибиотикорезистентность бактерий.

Глобальное распространение мульти- и пан-резистентных бактерий, устойчивых к действию нескольких или практически всех классов антимикробных препаратов, является одной из глобальных угроз здравоохранения[1]. Наиболее распространенной является устойчивость грамотрицательных патогенов к бета-лактамным антибиотикам, наиболее часто используемому классу антибактериальных препаратов [2]. Основным механизмом резистентности является продукция бета-лактамаз, образующих суперсемейство ферментов разной структуры и субстратной специфичности, разделяющихся на четыре молекулярных класса. Многие из устойчивых к антибиотикам патогенов, характеризующиеся множественной лекарственной устойчивостью, являются носителями мультикопийных плазмид с несколькими приобретенными генами бета-лактамаз разных молекулярных классов и типов. Для определения генов бета-лактамаз у мультирезистентных бактерий необходима разработка новых методов молекулярной диагностики, позволяющих одновременно определять различные гены, а также их экспрессию. Данные методы должны характеризоваться высокой мультиплексностью и производительностью. В настоящее время для этих целей используются полуколичественные методы на основе ПЦР-РВ с использованием внутренних контролей, в которых: изменение экспрессии изучаемого гена определяется по отношению к уровню экспрессии контрольного гена (генов).

Цель работы заключалась в разработке колориметрических биочипов с ферментативной детекцией на основе пероксидазы хрена для количественного определения мРНК генов четырех типов клинически значимых бета-лактамаз, относящихся к разным классам. Для обеспечения количественного определения предложено использовать классический подход биоаналитической химии – определение концентрации мРНК по градуировочной кривой, построенной с использованием стандартных образцов мРНК той же специфичности.

В качестве объектов исследования выбраны четыре типа бета-лактамаз: CTX-M- (субкластер CTX-M-1, молекулярный класс A), TEM- (молекулярный класс A), NDM- (молекулярный класс B) и OXA- (субкластер OXA-48, молекулярный класс D). Стандартные образцы мРНК, соответствующих полноразмерным генам выбранных бета-лактамаз, получали из плазмидной ДНК лабораторных штаммов *E. coli* – продуцентов рекомбинантных бета-лактамаз методом транскрипции *in vitro* с использованием ДНК-зависимой РНК-полимеразы T7 [3].

Метод определения специфичных мРНК генов бета-лактамаз на биочипах включает несколько этапов: выделение общей РНК из бактериальной культуры; получение первой цепи кДНК в реакции мультиплексной обратной транскрипции; мультиплексная амплификация генов бета-лактамаз с введением биотиновой метки; гибридизация меченой ДНК-мишени на биочипах с иммобилизованными специфическими олигонуклеотидными зондами [3]. Биотин в составе дуплексов ДНК выявляется конъюгатом стрептавидин-пероксидаза. Далее проводится детекция пероксидазы с использованием субстрата ТМБ, который при ферментативном окислении с участием пероксида водорода и в присутствии декстран сульфата образует нерастворимый окрашенный продукт в соответствующей зоне биочипа. Аналитическим сигналом метода является интенсивность окраски зоны биочипа.

В работе оптимизированы условия отдельных стадий пробоподготовки меченных биотином ДНК-мишеней бета-лактамаз выбранных типов, условия их гибридизационного анализа на биочипах в лунках планшетов и алгоритмы количественной обработки аналитических сигналов для построения градуировочных зависимостей с использованием стандартных образцов мРНК.

Для мультиплексного определения специфичных мРНК генов бета-лактамаз разработан дизайн биочипа, расположенного в лунке 96-луночного полистиролового планшета. Биочип имеет размер 3 х 3 мм, он включает 36 зон, размещенных в виде матрицы 6 х 6. Диаметр каждой зоны составляет 0,3 мм, расстояние между их центрами – 0,5 мм. Биочип включает пять типов специфичных олигонуклеотидных зондов для определения клинически значимых генов бета-лактамаз разных молекулярных классов (TEM-, SHV- и CTX-M-типа (класса A), NDM-типа (класс B), OXA-48 типа (класс D)) и два контрольных зонда (положительный и отрицательный контроли гибридизации), последовательности которых не встречаются у бактерий. Контрольные зонды используются для проверки корректности проведения стадии гибридизации и нормирования результатов гибридизации, для этого в каждую гибридизационную смесь добавляется меченный биотином олигонуклеотид, комплементарный по структуре зонду положительного контроля гибридизации.

Принцип количественного определения мРНК на биочипе заключается в параллельном анализе стандартных синтетических образцов мРНК бета-лактамаз с известными концентрациями и исследуемых транскриптов бактериальных клеток. Количественное определение мРНК в бактериальных культурах проводится по градуировочным кривым (зависимость интенсивности окрашивания зон биочипа от концентрации мРНК), построенным по результатам тестирования стандартных образцов мРНК генов бета-лактамаз каждого типа. Интенсивность окраски зоны биочипа пропорциональна концентрации мРНК гена соответствующей бета-лактамазы в образце общей РНК.

Для получения четырех градуировочных кривых были протестированы наборы стандартных образцов мРНК генов четырех клинически значимых бета-лактамаз (TEM-, CTX-M-1-, NDM- и OXA-48-типов). Выбор последовательностей специфичных олигонуклеотидных зондов для одновременного определения исследуемых генов и оптимизация разных этапов анализа обеспечили снижение предела обнаружения мРНК и увеличение коэффициента чувствительности. Пределы обнаружения мРНК генов исследуемых бета-лактамаз составили: 7 ± 1 пМ (TEM-1), 5 ± 0,7 пМ (CTX-M-116), 6,0 ± 0,9 пМ (NDM-1), 7 ± 1 пМ (OXA-48).

Далее провели одновременное определение мРНК четырех типов в 12 образцах искусственно приготовленных смесей мРНК генов бета-лактамаз. Смеси содержали в себе от одного до четырех типов стандартных образцов мРНК. Концентрации мРНК определяли по градуировочным кривым, полученным с использованием стандартных образцов. Анализ результатов проводили методом «введено-найдено». Для практически всех исследованных смесей значения концентраций мРНК определены с высокой точностью. Исключением являлись концентрации мРНК двух типов генов (TEM-1 и CTX-M-116), превышающие 1 нМ, для которых требуется дополнительное разбавление из-за достижения плато значений интенсивностей окрашивания градуировочной кривой. Процент открытия находился в диапазоне от 70 до 130%. Отсутствие неспецифичной гибридизации характеризовало высокую селективность определения.

Таким образом, разработанные нами биочипы с ферментативной детекцией обеспечивают мультиплексное количественное определение мРНК генов бета-лактамаз разных классов с высокой

чувствительностью и селективностью. **П**реимуществом использования стандартных образцов мРНК, проходящих все стадии анализа вместе с исследуемыми образцами, является отсутствие необходимости определения эффективности отдельных стадий пробоподготовки (обратной транскрипции и ПЦР). Дизайн биочипов в 96-луночных планшетах позволяет существенно увеличить воспроизводимость результатов и производительность метода (одновременно на одном планшете можно провести анализ 42 образцов РНК-транскриптов). Показана возможность высокоспецифичного одновременного определения мРНК генов бета-лактамаз четырех типов, индуцированных действием бета-лактамных антибиотиков в концентрациях, соответствующих используемым в клинической практике. Биочипы могут быть использованы для изучения механизмов формирования устойчивости бактерий к антибиотикам и поиска новых способов подавления экспрессии бета-лактамаз.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова 123032300028-0.

Список литературы

1. Brüssow H. The antibiotic resistance crisis and the development of new antibiotics // Microb. Biotechnol. – 2024. – Vol. 17. – No. 7. – Art. e14510.

2. Bush K., Bradford P.A. Epidemiology of β-Lactamase-Producing Pathogens // *Clin.* Microbiol. Rev. – 2020. – Vol. 33. – Art. e00047-19.

3. Рубцова М.Ю., Филиппова А.А., Фурсова Н.К., Григоренко В.Г., Преснова Г.В.,Уляшова М.М., Егоров А.М. Количественное определение мРНК бета-лактамаз в РНК-транскриптах резистентных к антибиотикам бактерий с использованием колориметрических биочипов // Журнал аналитической химии. – 2022. – Т. 77. – № 5. – С. 393-405.

УДК 544.777:577.15.03:544.723.2.023.2:543.553

ВЛИЯНИЕ ИОННОЙ СИЛЫ НА УСТОЙЧИВОСТЬ ПОЛИМЕР-ФЕРМЕНТНЫХ ПЛЁНОК НА ОСНОВЕ ЛИНЕЙНЫХ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ И ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ

Рудаков Н.С.[1,2], **Сиголаева Л.В.**[2], **Пергушов Д.В.**[2]

[1] *Факультет наук о материалах МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ*
[2] *Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ*
n.s.rudakov@yandex.ru

Аннотация. Исследовано влияние ионной силы окружающей водной среды на стабильность полимер-ферментных плёнок. Продемонстрирована их высокая устойчивость по отношению к действию низкомолекулярного электролита, что свидетельствует о значительном вкладе неэлектростатических взаимодействий в стабилизацию подобных систем.

Ключевые слова: полимер-ферментные плёнки, полиионная жидкость, полидиметиламиноэтилметакрилат, глюкозооксидаза, нековалентная иммобилизация.

Один из наиболее перспективных подходов к иммобилизации ферментов состоит в их нековалентном связывании функциональным полимером, проявляющем хорошую адгезию к твёрдой поверхности. Подобные двухкомпонентные полимер-ферментные системы могут представлять собой основу для создания различных биосенсорных систем, в которых полимер выполняет роль своеобразного «клея», прочно фиксирующего глобулы фермента на поверхности. В связи с этим актуальной проблемой является исследование устойчивости полимер-ферментных плёнок в водных средах, которые в условиях проведения измерений могут содержать значительные количества других соединений, например, низкомолекулярных солей при электрохимических измерениях.

Целью данной работы явилось изучение влияния ионной силы окружающей среды на устойчивость полимер-ферментных плёнок, сформированных в результате взаимодействия линейных поликатионов полидиметиламиноэтилметакрилата (ПДМАЭМА) или бромида поли-1-этил-3-винилимидазолия (ПВИ) с ферментом глюкозооксидазой (ГО) в условиях, когда полимерный и биокомпонент противоположно заряжены (pH 7) [1,2].

Методом пьезоэлектрического микровзвешивания с мониторингом диссипация показано, что двухстадийная адсорбция сначала полимера (ПДМАЭМА (pH 10) или ПВИ (pH 7)), а затем ГО (pH 7) приводит к формированию на поверхности резонатора «жёстких» полимер-ферментных плёнок, «влажная» масса которых сохраняется практически неизменной при последующем промывании их 10 мМ ТРИС (pH 7) буфером [1,2]. Установлено, что в результате их последующей инкубации в 50 мМ ХЕПЕС/30 мМ KCl (pH 7,5) буфере (электрохимический буфер) в отсутствии и в присутствии хлорида натрия (150 и 500 мМ NaCl) наблюдается некоторое (не более 30%) снижение «влажной» массы полимер-ферментной плёнки [3]. Это, по-видимому, обусловлено выделением из нее некоторого количества ГО вследствие экранирования электростатического взаимодействия между полимерным компонентом и ферментом. Важно отметить, что достаточно слабое влияние ионной силы окружающей среды на устойчивость полученных полимер-ферментных плёнок свидетельствует о значительном вкладе неэлектростатических взаимодействий, например, гидрофобных, в стабилизацию подобных систем.

Результаты, полученные методом пьезоэлектрического микровзвешивания с мониторингом диссипации, хорошо согласуются с результатами исследования ферментативных откликов полимер-ферментных плёнок, сформированных на поверхности планарных графитовых электродов, методом амперометрии [3]. Так, обнаружено, что их инкубация в 50 мМ ХЕПЕС/30 мМ KCl/500 мМ NaCl (pH 7,5) буфере приводит к снижению ферментативного отклика ГО не более, чем на 30% по сравнению

с 50 мМ ХЕПЕС/30 мМ KCl (pH 7,5) буфером, то есть значительная доля иммобилизованного фермента остаётся связанной с адсорбированным на поверхности электрода полимером даже при достаточно высокой ионной силе окружающей водной среды.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 25-23-00125, https://rscf.ru/project/25-23-00125/). Эксперименты методами пьезоэлектрического микровзвешивания с мониторингом диссипации проведены с использованием оборудования, приобретённого по Программе развития МГУ имени М.В. Ломоносова.

Список литературы

1. Sigolaeva L.V., Rudakov N.S., Kurochkin I.N., Pergushov, D.V. Nanosized polymer-enzyme films based on poly(ionic liquids): design and application // Russian Chemical Bulletin. – 2025. – Vol. 74. – № 8. – P. 2475-2484.
2. Sigolaeva L.V., Rudakov N.S., Pergushov D.V. Polymer-enzyme films on conductive surfaces: from surface modification by a dual-stimuli-sensitive polymer to design of electrochemical biosensors // ACS Appl. Polym. Mater. – 2025. – Vol. 7. – №. 17. – P. 11690-11702.
3. Sigolaeva L.V., Rudakov N.S., Pergushov D.V. Stability of polymer-enzyme films composed of an imidazolium-based poly(ionic liduid) and glucose oxidase toward their disassembly in salt-containing aqueous media // Mendeleev Commun. – 2026. – Vol. 36. – submitted.

НОВАЯ РЕАКЦИЯ С НЕОБЫЧНЫМ МЕХАНИЗМОМ У МИКОБАКТЕРИЙ. СИНТЕЗ ТЕТРАМЕТИЛОВОГО ЭФИРА КОПРОПОРФИРИНА III, СВЯЗАННЫЙ С ДОРМАНТНЫМ СОСТОЯНИЕМ

Савицкий А.П., Багаева Д.М., Демина Г.Р., Панина И.С., Крылов Н.А., Хренова М.Г., Агафонов М.О., Ефремов Р.Г., Капрельянц А.С., Шлеева М.О.

ФИЦ Биотехнологии РАН,
Институт биоорганической химии РАН

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) и другие патогенные медленнорастущие микобактерии могут длительное время выживать in vivo, переходя в состояние покоя, что приводит к латентному туберкулезу после первоначального заражения. Ранее в микобактериях (*Mycobacterium smegmatis и Mycobacterium tuberculosis*) был открыт новый метаболический путь превращения копропорфирина III в тетраметиловый эфир копропорфирина III (ТМС) во время перехода в состояние покоя. Однако ферменты, участвующие в синтезе ТМС, оставались неизвестными. В данном исследовании мы идентифицировали новую метилтрансферазу *M. smegmatis* MSMEG_0614 (CPmtA), которая катализирует зависимое от S-аденозил-L-метионина превращение копропорфирина в ТМС посредством последовательного метилирования его карбоксильных групп. Сверхэкспрессия MSMEG_0614 как в *M. smegmatis*, так и в *M. tuberculosis* приводит к увеличению внутриклеточного уровня ТМС и снижению дыхательной активности бактерий, связывая этот ферментативный путь с переходом микобактерий в состояние покоя. Структурно-динамическое моделирование выявляет уникальный «карусельный» механизм, в котором ориентация КП чередуется в активном центре фермента для последовательного метилирования его карбоксильных групп. Мутагенез, основанный на вычислительных предсказаниях, подтверждает каталитический механизм. Кроме того, моделирование показывает, что ТМС интегрируется в модельную фосфолипидную мембрану, изменяя ее свойства, которые важны для перехода в состояние покоя. ТМК влияет как на текучесть мембраны, так и на активность дыхательной цепи: увеличение содержания ТМК в клетках коррелирует с увеличением микровязкости мембраны и снижением клеточного дыхания. Подавляя основные функции производства энергии, накопление ТМК может способствовать снижению метаболической активности, наблюдаемому во время перехода в состояние покоя. накопление ТМК в условиях стресса обеспечивает механизм как для индукции, так и для поддержания состояния покоя, повышая выживаемость. Поскольку описанный фермент активен именно при переходе микобактерий в состояние покоя, он может служить мишенью для разработки препаратов от туберкулеза.

Работа была выполнена при поддержке РНФ (проект № 25-45-10015)

Список литературы

1. Shleeva M.O., Demina G.A., Savitsky A.P. Advanced Drug Delivery Reviews Vol. 215, p. 115472 (2024)
2. IA Gligonov, DI Bagaeva, GR Demina, GN Vostroknutova, DS Vorozhtsov, AS Kaprelyants, AP Savitsky, MO Shleeva. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes 1866 (3), 184270 (2024)
3. MO Shleeva, IA Linge, IA Gligonov, GN Vostroknutova, DM Shashin, AM Tsedilin, AS Apt, AS Kaprelyants, AP Savitsky. Scientific Reports 14 (1), 846 (2024)
4. DI Bagaeva, GR Demina, IS Panina, NA Krylov, MG Khrenova, MO Agaphonov, AP Savitsky, RG Efremov, AS Kaprelyants, MO Shleeva. International Journal of Biological Macromolecules 358 (2026) 151714

УДК 376:15

ХАРАКТЕРИСТИКА АПТАМЕРОВ КАК БИОРЕЦЕПТОРОВ И РАЗРАБОТКА СИСТЕМ ДЕТЕКЦИИ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ АНАЛИТОВ

Самохвалов А.В., Миронова А.А., Рогачева А.С., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, РФ
alvlsamokh@yandex.ru

Аннотация. Для ряда аптамеров, специфичных к низкомолекулярным соединениям – антибиотикам (хлорамфеникол, канамицин А), гормонам (тестостерон, дофамин) и микотоксинам (охратоксин А, афлатоксин В1), исследовано влияние параметров среды и структурных особенностей аптамеров на аффинность к целевым лигандам. Изучены процессы лиганд-индуцированного высвобождения комплементарных олигонуклеотидов из комплексов с аптамерами; с их использованием реализованы аналитические системы с флуоресцентной и колориметрической детекцией.

Ключевые слова: аптамеры, микотоксины, гормоны, антибиотики, катионы металлов, гомогенный флуоресцентный анализ, микропланшетный аптаферментный анализ.

Перспективным классом биорецепторов являются синтетические одноцепочечные олигонуклеотиды (аптамеры). Их конкурентный потенциал определяется простотой и воспроизводимостью синтеза и модификации, стабильностью в широком диапазоне условий. Несмотря на значительное число описанных аптамеров, их аналитическое применение сопряжено с поиском условий наиболее эффективного взаимодействия с целевыми лигандами и структурной модификацией аптамеров применительно к тому или иному формату анализа. В связи с этим цель представляемого исследования состояла в изучении факторов, влияющих на аффинность различных аптамеров к низкомолекулярным лигандам, и применении установленных закономерностей при разработке аптамерных аналитических систем.

С использованием программных средств NUPACK и RNAfold проведен анализ структурных элементов аптамеров, на основании которого предложены разные варианты стабилизации предполагаемых сайтов связывания. Осуществлен экспериментальный скрининг предложенных вариантов, в результате которого отобраны модифицированные варианты аптамеров, связывающих антибиотики, гормоны и микотоксины. Методами изотермической калориметрии и анизотропии флуоресценции определены константы диссоциации модифицированных аптамеров, связывающих охратоксин А (ОТА), афлатоксин В1 (АФВ1), канамицин А (КАНА), хлорамфеникол, тестостерон и дофамин, находящиеся в диапазоне от 20 до 1500 нМ. Достигнутые повышения аффинности относительно исходных аптамеров составили от 1,4 до 7 раз.

Проведена детальная характеристика влияния типа и концентрации катионов ряда одно- и двухвалентных металлов, содержащихся в реакционной среде, на аффинность аптамеров. Максимальная аффинность аптамеров к АФВ1 и ОТА достигалась в средах с очень высоким содержанием катионов: 1 М Na^+ или 300 мМ Mg^{2+} (АФВ1); 50 мМ Ca^{2+}, 300 мМ Na^+ (ОТА). Для КАНА наблюдался обратный эффект – падение аффинности с увеличением концентрации солей.

Для аптамеров на АФВ1, ОТА и КАНА проведено сравнительное изучение лиганд-индуцированного высвобождения комплементарных олигонуклеотидов (оцДНК) при варьировании их длины от 7 до 20 нуклеотидов в средах разных катионных составов.

На основании установленных закономерностей разработаны гетерогенные и гомогенные конкурентные аналитические системы. С использованием лиганд-индуцированного высвобождения предложен конкурентный аптамерный микропланшетный ферментативный анализ АФВ1 с пределом обнаружения 5 нМ. В гомогенных системах специфические взаимодействия регистрировались либо по изменениям анизотропии флуоресценции, индуцированной плоскополяризованным возбуждающим светом, либо по выраженности Фёрстеровского резонансного переноса энергии (FRET). На примере системы оцДНК – аптамер – АФВ1 с регистрацией FRET показано, что наибольшая чувствительность

выявления лиганда достигается при близких значениях констант диссоциации комплексов оцДНК – аптамер и аптамер – лиганд. Пределы обнаружения АФВ1, ОТА и КАНА с помощью разработанных одностадийных гомогенных методик находятся в интервале от 0.5 до 3 нМ, удовлетворяющем практическим требованиям контроля данных контаминантов в пищевой продукции; продолжительность тестирования – 30 минут.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 25-14-00421.

УДК 543.94/.062/.552

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОКАЛЬЦИТОНИНА МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА С ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ

Самушия А.Я., Евтушенко Е.Г.

Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
Alex.Samush@gmail.com

Аннотация. Разработан прототип экспрессного (менее 35 мин) иммуноферментного анализа прокальцитонина в плазме крови с использованием магнитных частиц и электрохимической детекции с рабочим диапазоном от 0,02 до 12,8 нг/мл.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ, магнитные частицы, щелочная фосфатаза, вольтамперометрия, прокальцитонин.

Прокальцитонин (ПКТ) – пептид с молекулярной массой 12,6 кДа, состоящий из 114 аминокислотных остатков. В норме его концентрация в плазме крови человека не превышает 0,05 нг/мл, значительно повышаясь в течение 2-6 часов при системной бактериальной инфекции, что делает его ценным ранним маркером данного патологического состояния [1]. Динамика снижения концентрации ПКТ используется в качестве показателя эффективности антибиотикотерапии. Эти факторы обуславливают необходимость регулярного экспрессного количественного определения ПКТ в плазме или сыворотке крови у ряда групп пациентов, в первую очередь, при бактериальном сепсисе. Одним из перспективных подходов к созданию таких аналитических систем является использование иммуноферментного анализа (ИФА) на магнитных частицах (МЧ), модифицированных антителами (АТ) захвата [2,3]. В экспресс-варианте иммунохимические процедуры проводят в одну стадию путем инкубации МЧ с анализируемым образцом и конъюгатом АТ детекции с ферментной меткой (Рис. 1).

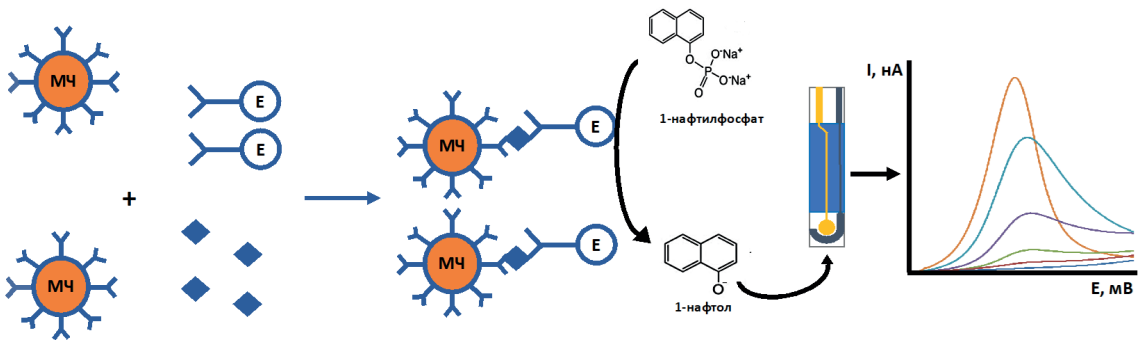


Рисунок 1. Схема проведения иммуноферментного анализа на магнитных частицах с электрохимической детекцией

МЧ с иммунными комплексами на поверхности отмывают от не связавшихся компонентов, добавляют субстрат ферментной метки и регистрируют результат ИФА. Данный тип анализа с электрохимической детекцией продукта ферментативной реакции может быть реализован в компактных автоматизированных устройствах. В качестве ферментной метки и субстрата описано использование термостабильной щелочной фосфатазы (ЩФ) и 1-нафтилфосфата, гидролизуемого до электрохимически активного 1-нафтола, измеряемого при помощи одноразовых печатных электродов при потенциале 260 мВ относительно хлорсеребряного электрода сравнения.

Целью настоящей работы является разработка ИФА для экспрессного определения прокальцитонина в плазме крови человека с использованием магнитных частиц и электрохимической детекции.

Одним из затруднений на пути создания коммерческой тест-системы является низкая устойчивость при хранении буфера на основе диэтаноламина (ДЭА), рекомендуемого для ЩФ. Поэтому первой задачей настоящего исследования был поиск буферной системы, устойчивой при хранении и обеспечивающей высокую скорость ферментативной реакции и высокий электрохимический сигнал. Для диапазона pH 9-10,5, в котором щелочные фосфатазы типично проявляют наибольшую активность, помимо ДЭА, в литературе описано еще 3 типа буферных систем на основе карбоната, бората и глицина. В буфере на основе глицина термостабильная ЩФ LPP-229 (Toyobo Enzymes, Япония) демонстрирует снижение активности около 45% в течение часа как в присутствии рекомендуемых 5 мМ $MgCl_2$, так и повышенной концентрации ионов магния (53 мМ), поэтому данный буфер в дальнейшем не рассматривался. Для буферов на основе ДЭА, карбоната и бората (50 мМ, с добавками 100 мМ KCl и 5 мМ $MgCl_2$) были измерены зависимости v_0 от концентрации субстрата при pH = 9,6. Все три системы продемонстрировали Михаэлисовский вид зависимости; полученные кинетические параметры (0,27 нМ конъюгата АТ-ЩФ, 25°C) приведены в Таблице 1.

Таблица 1. Кинетические параметры ЩФ в конъюгате с антителами

Буфер	**V_{max}, мкМ/с**	**Эфф. K_M, мМ**
ДЭА 9.6	0,43 ± 0,01	0,31 ± 0,05
Карбонат 9.6	0,36 ± 0,01	0,84 ± 0,10
Борат 9.6	0,27 ± 0,01	0,56 ± 0,09

Для двух лучших систем (ДЭА и карбонат) были получены зависимости v_0 от pH. Для буфера на основе ДЭА наблюдается двукратный рост активности при изменении pH от 9,6 до 10,0 с плато от 10,0 до 10,4. Однако, начиная с pH 9,8, наблюдалось значительное возрастание электрохимического сигнала при нулевых концентрациях продукта, 1-нафтола. В буфере на основе карбоната, напротив, вплоть до pH = 11,0 сохранялись низкие фоновые сигналы, при этом активность ЩФ имела оптимум при pH = 10,2. В этих условиях зависимость начальной скорости от концентрации субстрата также имела Михаэлисовский вид с эффективной K_M = 3,2 ± 0,4 мМ и V_{max} = 0,83 ± 0,05 мкМ/с. Это означает, что при концентрации субстрата более 3,3 мМ скорость ферментативной реакции в карбонатном буфере с pH 10,2 выше, чем в описанных ранее условиях [2,3]. Например, при концентрации субстрата 4 мМ разница составляет уже около 20%. Таким образом, именно эта буферная система может быть рекомендована для использования в ИФА как обладающая улучшенными аналитическими характеристикам и стабильностью при долгосрочном хранении.

В ходе разработки ИФА был проведен многостадийный скрининг коммерчески доступных антител против прокальцитонина. Наилучшие результаты продемонстрировала пара моноклональных антител P123 (АТ захвата) – P138 (АТ детекции) производства HyTest. Был синтезирован конъюгат P123 с МЧ производства Sileks, модифицированными аминогруппами. Для целей экспрессности анализа (< 35 мин) длительности иммунохимической стадии и ферментативной реакции были выбраны по 10 мин каждая. Для этих условий были оптимизированы количество МЧ, вводимых в анализ, и разведение конъюгата детектирующих антител со ЩФ. Для полученного прототипа ИФА была измерена зависимость электрохимического сигнала от концентрации ПКТ (Рис. 2). Образцы с известным содержанием ПКТ готовили путем разведения образца пациента с высоким его содержанием (13,7 ± 0,7 нг/мл) в пулированной плазме здоровых доноров (0,035 ± 0,001 нг/мл).

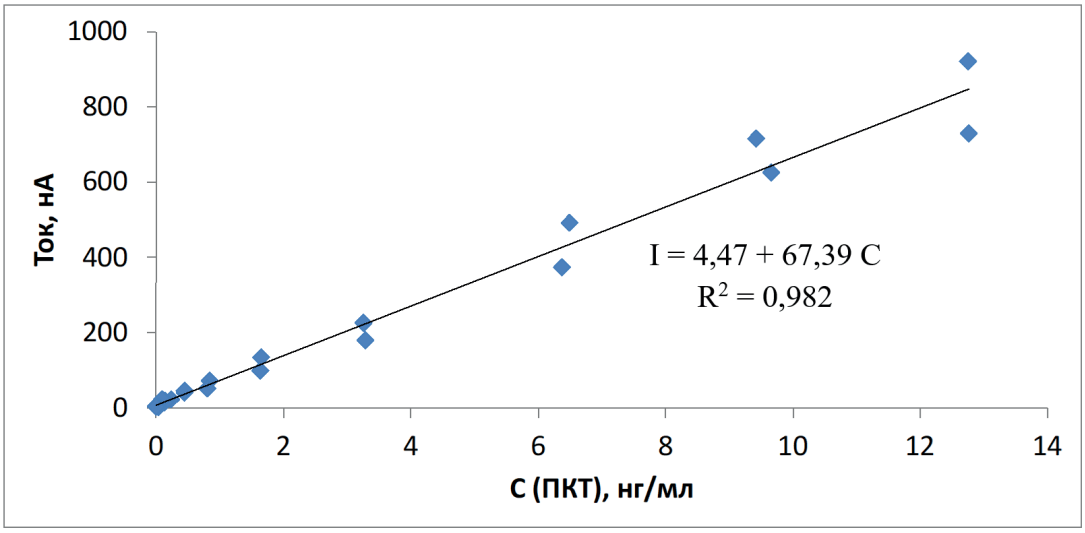


Рисунок 2. Зависимость электрохимического сигнала от концентрации ПКТ

Предел обнаружения ПКТ (3 σ) составил 0,02 нг/мл, предел количественного измерения (10 σ) составил 0,09 нг/мл с верхней границей измеряемого диапазона не менее 12,8 нг/мл. Среднее относительное стандартное отклонение составило 17%.

Таким образом, был разработан лабораторный прототип ИФА с ручным манипулированием магнитными частицами для экспрессного (< 35 мин) определения прокальцитонина в плазме крови человека с использованием магнитных частиц и электрохимической детекции.

Список литературы

1. Becker K.L., Snider R., Nylen E.S. Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection, and sepsis: Clinical utility and limitations: // Critical Care Medicine. — 2008. — Vol. 36. — Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection, and sepsis. — No. 3. — P. 941-952.

2. Sorokina O.N., Konstantinova T.S., Vorobyova A.K., Vasilyeva A.D., Eremenko A.V., Lyzhenkova A.V., Zobova E.V., Minushkina L.O., Kurochkin I.N. ELISA on Magnetic Microparticles with Electrochemical Detection for NT-proBNP Analysis in Human Serum // Journal of Analytical Chemistry. — 2025. — Vol. 80. — No. 11. — P. 1971-1978.

3. Sorokina O.N., Konstantinova T.S., Vorobyova A.K., Vasilyeva A.D., Yurina L.V., Eremenko A.V., Lyzhenkova A.V., Minushkina L.O., Zateyshchikov D.A., Kurochkin I.N. Cardiac Troponin I Determination by an ELISA on Magnetic Particles with Electrochemical Detection // Russian Journal of Physical Chemistry B. — 2024. — Vol. 18. — No. 6. — P. 1579-1584.

УДК 573.6.086.83

ГИБРИДНЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ, CRISPR/Cas12a И ИММУНОХРОМАТОГРАФИИ

Сафенкова И.В., **Камионская М.В.**, **Жердев А.В.**, **Дзантиев Б.Б.**

Институт биохимии имени А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва, РФ
safenkova@inbi.ras.ru

Аннотация. Представлены результаты систематического исследования факторов, определяющих эффективность иммунохроматографической детекции ампликонов, образующихся в результате изотермических амплификаций, и продуктов транс-нуклеазной CRISPR/Cas12a реакции. Разработаны гибридные биоаналитические системы, объединяющие молекулярную диагностику (петлевая изотермическая амплификация, CRISPR/Cas12a) с бесприборной визуальной детекцией посредством иммунохроматографических тест-полосок.

Ключевые слова: CRISPR/Cas12a, изотермическая амплификация, иммунохроматография, ДНК-репортеры, экспресс-диагностика.

Высокочувствительная диагностика, не зависящая от сложного лабораторного оборудования и реализуемая в формате point-of-care (POC), востребована для выявления вирусных и бактериальных патогенов. Эффективным решением для таких биоаналитических систем является сочетание изотермической амплификации, обеспечивающей экспоненциальное накопление целевых ДНК фрагментов при одной температуре, с последующим распознаванием ДНК-мишени в составе ампликонов эндонуклеазой Cas12a и иммунохроматографической (ИХ) детекцией продуктов транс-нуклеазной реакции (ДНК-репортеров). Включение в систему Cas12a и замена в ИХ-детекции ампликонов на ДНК-репортеры обеспечивает ряд преимуществ: усиливает специфичность, унифицирует мишень для ИХ-детекции, увеличивает чувствительность. Целью работы являлось систематическое исследование факторов, определяющих эффективность гибридных диагностических систем на основе изотермической амплификации, CRISPR/Cas12a и иммунохроматографии.

Наиболее распространенный формат CRISPR/Cas12a с ИХ-детекцией – DETECTR (DNA endonuclease-targeted CRISPR trans reporter) – основан на косвенной регистрации: неразрезанный одноцепочечный (оц) ДНК-зонд с флуоресцеиновой и биотиновой метками (FAM-оцДНК-биотин) блокирует миграцию конъюгата наночастиц золота в тестовую зону. На основе систематического экспериментального исследования (480 конфигураций ИХ-тестов формата DETECTR) и данных математического моделирования установлены кинетические ограничения в CRISPR/Cas12a системах формата DETECTR с ИХ-детекцией, приводящие к ложноположительным сигналам, и предложены стратегии их устранения (предварительная инкубация конъюгата с репортером, оптимизация концентрации репортера и структуры конъюгата наночастиц), обеспечивающие более чем 50-кратное снижение предела обнаружения (ПрО) (до 20 пМ, ДНК-мишень – фрагмент гена hisZ бактериального фитопатогена *Erwinia amylovora*).

Разработаны новые архитектуры репортерных ДНК-зондов для CRISPR/Cas12a с ИХ-детекцией и тест-полоски для их бесприборной детекции, обеспечивающие отсутствие ложноположительных результатов благодаря прямой детекции отрезанной части зонда на тест-полоске: ДНК-IgG зонд и зонд-тренога с тремя FAM-метками, показавшие меньшую зависимость от кинетических факторов комплексообразования при ИХ-детекции в сравнении с традиционными ДНК-зондами и тест-полосками. Без амплификации зонд-тренога обеспечил ПрО 1,4 пМ (фрагмент гена invA бактериального патогена *Salmonella* Typhimurium), впервые для CRISPR/Cas12a-биосенсоров показав опережение

бесприборной ИХ-детекцией приборной флуоресцентной детекции (ПрО 14 пМ). В тест-системах с предварительной петлевой изотермической амплификацией LAMP–CRISPR/Cas12a и предложенным использованием зонда-треноги и ИХ тест-полосок достигается ПрО с бесприборной детекцией ~1 кл./реакция (*Listeria monocytogenes*, *S.* Typhimurium), диагностическая чувствительность > 0,9, специфичность 1,0, время анализа – 1 ч 20 мин.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 25-16-00246.

УДК 577.151.01

СТРУКТУРНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ ГЛИКОЗИЛ-ГИДРОЛАЗ СЕМЕЙСТВА GH12

Селимзянова А.И.[1,2], **Рыков С.В.**[1], **Иванков Д.Н.**[3], **Березина О.В.**[1,2]

[1] НИЦ «Курчатовский институт», г. Москва, Россия
[2] Московский физико-технический институт (НИУ), г. Долгопрудный, Россия
[3] Сколковский институт науки и технологий, г. Москва, Россия
selimz.alina99@mail.ru

Аннотация. В работе исследованы факторы термостабильности гликозил-гидролаз семейства GH12. Методами сайт-направленного мутагенеза и биоинформатического анализа выявлено, что гидрофобные остатки с разветвлённой цепью, расположенные на N-конце белка, повышают его термостабильность. Показаны различия в предсказаниях программ DDGun, FoldX и INPS, что указывает на ограничения вычислительных подходов и необходимость экспериментальной верификации.

Ключевые слова: GH12, термостабильность, гидрофобные остатки, мутагенез.

Гликозил-гидролазы семейства GH12 применяют в различных технологических процессах, протекающих при повышенных температурах [1]. Их часто используют при запаривании кормов для животных, что создаёт потребность в термостабильных белках. Природные ферменты, обладающие высокой активностью и термостабильностью, встречаются редко. В связи с этим для направленного улучшения их свойств (в том числе термостабильности) применяют методы белковой инженерии. Однако для выявления наиболее результативных стратегий необходим детальный теоретический анализ с использованием биоинформатических подходов, так как механизмы термостабильности разнообразны, недостаточно изучены и плохо систематизированы.

Цель работы: исследование факторов термостабильности ферментов семейства GH12.

В качестве объектов исследования использованы гликозил-гидролазы семейства GH12: термостабильная эндоглюканаза Egh12 с максимальной активностью при 70°C из *Thielavia terrestris* и умеренно термостабильная ксилоглюканаза Xgh12B из *Aspergillus cervinus*, которая проявляет максимум активности при 55°C [2, 3]. В исследовании [4] показано, что мутации в позиции 35 аминокислотной последовательности целлюлазы Cel12A из *Hypocrea jecorina* (гомологичной положению 41 в Egh12 и 37 в Xgh12B) влияют на стабильность белковой молекулы.

В работе проведено множественное выравнивание последовательностей белков семейства GH12, которое позволило предположить, что их термостабильность может быть связана с наличием гидрофобных аминокислот в положении, соответствующем позиции 41 в Egh12.

Для повышения термостабильности Xgh12B была проведена замена тирозина на валин в положении 37 (Y37V) с помощью сайт-направленного мутагенеза. Кроме того, для доказательства значимости гидрофобных аминокислот для термостабильности эндоглюканазы Egh12, был сконструирован ее мутантный вариант Egh12 V41S.

Экспериментально подтверждено, что остаток V41 у Egh12 важен для термостабильности. Его замена на серин привела к потере гидрофобных связей на N-конце белка, снижению температурного оптимума с 70 до 60°C и значительному уменьшению термостабильности. Введение мутации Y37V в Xgh12B повысило оптимум на 5°C и увеличило термостабильность. Например, при 65°C время полуинактивации возросло в 3 раза (с 18 до 60 минут). Вероятно, это связано с образованием гидрофобных контактов с аминокислотами на соседней β-цепи, за счёт которых фиксируется N-конец молекулы.

Комбинирование мутаций у Xgh12B показало, что гидрофобные остатки с разветвлёнными радикалами на β-цепях вблизи N-конца положительно влияют на термостабильность. Время полуинактивации

варианта Xgh12B Y37V L18I при 65°C увеличилось по сравнению с Xgh12B и Xgh12B Y37V, достигнув 77 минут. Замена L18V привела к снижению стабильности белка относительно Xgh12B Y37V, вероятно, из-за более короткого радикала валина, который образует меньше гидрофобных контактов. При введении мутации L18F в последовательность Xgh12B Y37V снизились термостабильность белка и его температурный оптимум. Это может быть связано с образованием неблагоприятных стерических контактов между ароматическим кольцом фенилаланина и другими гидрофобными аминокислотами на соседних β-цепях [5].

В рамках исследования экспериментальные данные по термостабильности вариантов Egh12 и Xgh12B сопоставлены с энергетическими эффектами соответствующих мутаций, рассчитанными с помощью инструментов DDGun, FoldX и INPS. Целью сопоставления была оценка точности предсказаний этих программ. Экспериментально подтверждённый дестабилизирующий эффект замены V41S был предсказан всеми тремя программами, однако стабилизирующий эффект Y37V определила только DDGun. Для дестабилизирующей замены L18V предсказания FoldX и INPS оказались верными, а прогноз DDGun – нет. Для замены L18I в Xgh12B Y37V программа DDGun предсказывала незначительную стабилизацию, тогда как INPS и FoldX указывали на дестабилизацию. В отношении замены L18F только FoldX спрогнозировал значительную дестабилизацию, INPS – незначительную, а DDGun предположил возможную стабилизацию. Сравнение с экспериментом показало, что только прогноз FoldX в этом случае оказался верным. Хотя DDGun правильно предсказала стабилизирующий эффект Y37V, в отличие от двух других программ, в целом все три инструмента продемонстрировали значительные расхождения с экспериментальными данными.

Таким образом, ни одна из программ не обеспечила приемлемой точности, что подчёркивает необходимость сочетания биоинформатического анализа с экспериментальной проверкой.

В данной работе были идентифицированы структурные детерминанты термостабильности семейства GH12. Полученные варианты Xgh12B обладают более высоким температурным оптимумом и улучшенной термостабильностью по сравнению с диким типом. Впервые экспериментально показано, что гидрофобные аминокислоты с разветвлённой цепью на N-конце белка GH12 способствуют его термостабильности.

Работа проведена в рамках выполнения Государственного задания НИЦ «Курчатовский институт» и при частичной финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2025-527).

Список литературы

1. Ghosh S., Lepcha Kh., Basak A., Mahanty A.K. Chapter 16 – Thermophiles and thermophilic hydrolases // Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles. – 2020. – P. 219-236.
2. Rykov S.V., Kornberger P., Herlet J., Tsurin N.V., Zorov I.N., Zverlov V.V., Liebl W., Schwarz W.H., Yarotsky S.V., Berezina O.V. Novel endo-(1,4)-β-glucanase Bgh12A and xyloglucanase Xgh12B from *Aspergillus cervinus* belong to GH12 subgroup I and II, respectively // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2019. – Vol. 103. – P. 7553–7566.
3. Rykov S.V., Selimzyanova A.I., Nikolaeva A.Y., Lazarenko V.A., Tsurin N.V., Akentyev P.I., Zverlov V.V., Liebl W., Schwarz W.H., Berezina O.V. Unusual substrate specificity in GH family 12: structure-function analysis of glucanases Bgh12A and Xgh12B from *Aspergillus cervinus*, and Egh12 from *Thielavia terrestris* // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2022. – Vol. 106. – P. 1493–1509.
4. Sandgren M, Ståhlberg J, Mitchinson C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes // Progress in Biophysics and Molecular Biology. – 2005. – Vol. 89. – P. 246–291.
5. Ishikawa K., Okumura M., Katayanagi K., Kimura S., Kanaya S., Nakamura H., Morikawa K. Crystal structure of ribonuclease H from *Thermus thermophilus* HB8 refined at 2.8 A resolution // Journal of Molecular Biology. – 1993. – Vol. 230. – No. 2. – P. 529-542.

УДК 577.15

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ И КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ТЕРМИНАЛЬНОЙ ДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДИЛТРАНСФЕРАЗЫ ЧЕЛОВЕКА

Сенчурова С.И.[1], **Тюгашев Т.Е.**[1], **Кузнецов Н.А.**[1,2]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, РФ*
[2] *Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск, РФ*
senchurova@1bio.ru

Аннотация. В докладе представлена информация о молекулярных механизмах субстратной специфичности терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы (TdT) человека – уникальной матрица-независимой ДНК-полимеразы, участвующей в V(D)J-рекомбинации и представляющей интерес для биотехнологии. С использованием методов сайт-направленного мутагенеза и предстационарной кинетики установлена роль ключевых аминокислотных остатков активного центра фермента в процессах связывания и присоединения природных и модифицированных нуклеотидов к праймеру. Обнаружены мутантные формы фермента, обладающие измененной селективностью по отношению к входящим нуклеозидтрифосфатам и повышенной эффективностью элонгации ДНК. Полученные результаты создают основу для направленного инжиниринга TdT с целью его применения в ферментативном синтезе олигонуклеотидов.

Ключевые слова: терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза, матрица-независимый синтез ДНК, предстационарная кинетика.

Терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза (TdT), принадлежащая к семейству X ДНК-полимераз, является уникальным ферментом, способным вести матрица-независимый синтез ДНК. TdT присутствует только в клетках позвоночных и отвечает за добавление случайных нуклеотидов к 3’-концу одноцепочечной ДНК на V-D и J-D стыках иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов в ходе V(D)J рекомбинации. В отличие от матрица-зависимых полимераз, TdT не имеет ограничений, связанных с формированием комплементарных взаимодействий между входящим нуклеотидом и матричным основанием; тем не менее, встраивание природных нуклеотидов происходит с разной эффективностью и процессивностью, а механизм, лежащий в основе этих различий, остаётся неизвестным. Кроме того, использование TdT в ферментативном синтезе ДНК ограничено её субстратной специфичностью и недостаточной эффективностью включения 3’-модифицированных нуклеотидов. Поэтому для рационального улучшения свойств фермента необходимо понимание роли отдельных аминокислотных остатков активного центра в каталитическом цикле.

В настоящей работе было исследовано влияние аминокислотных замен в активном центре TdT человека на субстратную специфичность и каталитическую активность фермента. На основе анализа архитектуры dNTP-связывающего кармана были выбраны потенциально значимые остатки R336, H342, D345, L397, F400, F404, D395, E456, D472 и H474 TdT человека и получены мутантные формы фермента, несущие их замены Было установлено влияние замен данных остатков как на структуру белка, так и этапы связывания с одноцепочечным ДНК-праймером и dNTP, а также на эффективность встраивания природных и неприродных нуклеозидтрифосфатов. Параметры элементарных стадий каталитического цикла определяли методом остановленного потока с использованием флуоресцентных аналогов нуклеотидов (dεATP, dC^{py}TP).

Показано, что остатки R336, H342 и D345 активного центра TdT критически важны для координации фосфатных групп входящего dNTP и стабилизации 3’-конца праймера. Замена R336Q дестабилизирует белковую глобулу, снижает сродство к ДНК и вызывает комплексное нарушение всех этапов

формирования каталитического комплекса, включая затруднение формирования первичного комплекса с dNTP и последующей конформационной перестройки, а также нарушает позиционирование 3’-конца праймера, и стадии катализа. Замена H342A снижает эффективность формирования первичного комплекса с dNTP, но почти не влияет на скорость формирования каталитического комплекса, частично сохраняя способность фермента к позиционированию 3’-конца праймера в активном центре. Замена D345E приводит к значительному нарушению координации ионов металлов-кофакторов, ухудшая эффективность формирование первичного комплекса с dNTP и особенно стадию конформационной перестройки фермент-субстратного комплекса в каталитически активное состояние, что приводит к значительному снижению общей каталитической эффективности.

Остатки L397, F400 и F404, формирующие гидрофобную часть dNTP-связывающего кармана TdT, играют ключевую роль в позиционировании азотистого основания и стабилизации 3’-конца праймера. Замена L397A, удаляющая гидрофобный «клин», блокирует разрыв стэкинга 3’-концевых нуклеотидов в составе ДНК-праймера, нарушая как формирование первичного комплекса с dNTP, так и последующую конформационную перестройку в каталитическое состояние. Мутантная форма TdT F400A частично сохраняет способность к позиционированию 3›-конца праймера, но снижает эффективность формирования предкаталитического комплекса с dNTP. Замена F404A нарушает как позиционирование 3’-конца праймера, так и входящего нуклеозидтрифосфата, что приводит к полной потере активности. Тогда как мутантная форма, содержащая замену этого же остатка на триптофан (TdT F404W), практически полностью сохраняет каталитическую активность.

Анализ остатков D395 и E456 показал, что замена E456N и, особенно, комбинация D395N/E456N, нейтрализующие заряд и расширяющие объём dNTP-связывающего кармана, улучшают эффективность и процессивность синтеза ДНК и выравнивают селективность по отношению ко всем вариантам dNTP, нивелируя природное предпочтение к dGTP.

Таким образом, в ходе работы были установлены молекулярные механизмы, определяющие субстратную специфичность, процессивность и каталитическую эффективность TdT. Выявлены мутантные формы с улучшенными каталитическими свойствами, перспективные для биотехнологических применений.

Работа поддержана грантом РНФ № 21-64-00017П.

УДК 376:15

ВЛИЯНИЕ ЭКОПОЛЛЮТАНТОВ НА КИНЕТИКУ РОСТА ФОТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Сенько О.В.[1], Степанов Н.А.[1], Маслова О.В.[1], Асланлы А.Г.[1], Bhattacharya A.[2], Ефременко Е.Н.[1]

[1] Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
[2] Amity Institute of Environmental Sciences, Amity University, Noida, India
senkoov@gmail.com

Аннотация. Регулярные загрязнения различных водных сред разными экополютантами влияют в первую очередь на состояние микроорганизмов – обитателей природных водоёмов, основными из которых являются микроводоросли и цианобактерии, осуществляющих фотосинтетические процессы. В докладе представлена информация об исследовании влияния ряда экополлютантов на кинетику роста клеток разных фототрофных микроорганизмов. Показано, что в ряде случаев, что именно персистирующие экополлютанты могут являться причиной увеличения биомассы микроводорослей и цианобактерий в объектах окружающей среды.

Ключевые слова: микроводоросли, цианобактерии, микропластики, перфторуглерод, аденозинтрифосфат

Микропластики, перфторуглероды и фармацевтические соединения относятся к числу персистирующих экополлютантов, длительно пребывающих в объектах окружающей среды, и потому их накопление в экосистемах считается не безопасным [1-3]. Перфторуглероды (ПФУ) активно используются в промышленности [2]. Из-за своей химической и биологической инертности ПФУ попадают в окружающую среду вместе с отходами и сточными водами, где они могут оставаться в течение длительного времени и постепенно накапливаться [4]. Присутствие ПФУ в водных экосистемах является сегодня одной из актуальных проблем, сопряженных с контролем состояния окружающей среды [2].

Фармацевтические поллютанты обнаруживаются в различных концентрациях в сточных водах городских очистных сооружений [1]. Физико-химические процессы обеспечивают удаление этих загрязняющих веществ из обрабатываемых водных сред, но имеют определенные ограничения в эффективности действия. В результате эти вещества часто присутствуют в «проскоке» через очистные сооружения и попадают далее в природные водные источники, накапливаясь в объектах окружающей среды и оказывая негативное влияние на биологические компоненты экосистем [1].

Загрязнение микропластиком различных природных объектов сегодня широко обсуждается, поскольку его присутствие выявляется в различных образцах, особенно в водных средах, куда он попадает с очистных сооружений, обрабатывающих промышленные и бытовые стоки, в которых выявляются нано- и микрочастицы различных синтетических полимеров [5].

Микроводоросли и цианобактерии занимают ключевое место в экосистемах благодаря своему фототрофному типу питания, что делает их начальным звеном трофических цепей. Кроме того, такие микроорганизмы способны осуществлять и гетеротрофный (включая миксотрофный) типы питания, используя для роста органические соединения [6]. Эта особенность микроводорослей и цианобактерий активно используется для реализации очистки сточных вод. В результате их реакции на присутствие различных загрязнителей в условиях как окружающей среды, так и биокаталитических процессов чрезвычайно важны. Интенсивный рост и развитие клеток фототрофных микроорганизмов в воде приводит к нежелательному явлению – «цветению» водоемов, которое, в свою очередь, может стать причиной накопления токсинов в объекте [7].

Экополлютанты могут стимулировать накопление биомассы микроводорослей и цианобактерий, поскольку выступают в качестве источника питания, вещества с газотранспортной функцией или матрицей для самоиммобилизации микроорганизмов [1,2,8]. Многие фармацевтические соединения, попадая в сточные воды, усваиваются клетками фототрофных микроорганизов. Клетки зеленых микроводорослей родов *Chlorella* и *Scenedesmus* являются одними из наиболее «универсальных» биодеструкторов фармполлютантов [1]. Анализ влияния ПФУ (в различной исходной концентрации) на рост фототрофных микроорганизмов продемонстрировал значительное увеличение биомассы клеток в среде [2].

Исследование накопления биомассы фототрофных микроорганизмов в пресных и морских средах в присутствии частиц различных синтетических микропластиков (МП) (биоразлагаемых и не поддающихся биологическому разложению) показал, что эффект МП зависит от их концентрации в среде (1-5 г/л), а также от начальной концентрации клеток. Морские представители фототрофных микроорганизмов (*Nannochloropsis* sp. и *Tetraselmis suecica*) проявили наибольшую чувствительность к присутствию МП, что было подтверждено как снижением концентрации внутриклеточного аденозинтрифосфата в клетках, так и уровнем концентрации их биомассы.

В то же время клетки пресноводных микроводорослей *C. vulgaris*, а также и пресноводных цианобактерий *Arthrospira platensis* одинаково положительно реагировали на присутствие микрочастиц полиэтилена, поликапролактона и полимолочной кислоты. Одной из причин такой метаболической реакции фототрофных клеток на эти МП была способность этих частиц удерживаться в поверхностном слое водных сред с клетками и способствовать удержанию фототрофных клеток в том же слое. Это способствовало улучшению условий для фотосинтеза. Явное увеличение количества суспензионных клеток *C. vulgaris* сопровождалось заметной сорбцией микроводорослей на частицах МП. Концентрация внутриклеточного АТФ в клетках *C. vulgaris* несколько снижалась, что, с одновременным накоплением биомассы, свидетельствовало о том, что клетки тратили АТФ на размножение, перестройку своего метаболизма с ориентацией на новые условия существования и адаптацию к ним.

Таким образом, различные экополютанты, попадая в объекты окружающей среды и накапливаясь там, могут приводить к увеличению численности фототрофных микроорганизмов.

Исследование было выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 25-44-01003).

Список литературы

1. Efremenko E., Stepanov N., Senko O., Maslova O., Lyagin I., Aslanli A. Progressive biocatalysts for the treatment of aqueous systems containing pharmaceutical pollutants //Life. – 2023. – Vol. 13. – No. 3. – Art. e841.

2. Senko O., Maslova O., Aslanli A., Efremenko E. Impact of perfluorocarbons with gas transport function on growth of phototrophic microorganisms in a free and immobilized state and in consortia with bacteria // Applied Sciences. – 2023. – Vol. 13. – No. 3. – Art. e1868.

3. Senko, O., Stepanov, N., Aslanli, A., Efremenko, E. Bioluminescent ATP-metry in assessing the impact of various microplastic particles on fungal, bacterial, and microalgal cells //Microplastics. – 2025. – Vol. 4. – No. 4. – Art. e72.

4. Wu J.Y.; Hua Z.L.; Gu L. Planktonic microbial responses to perfluorinated compound (PFC) pollution: Integrating PFC distributions with community coalescence and metabolism. // Science of the Total Environmental. – 2021. - Vol. 788– Art. e147743.

5. Wu P., Huang J., Zheng Y., Yang Y., Zhang Y., He F., Quan G., Yan J., Li T., Gao B. Environmental occurrences, fate, and impacts of microplastics. // Ecotoxicology and environmental safety. – 2019. – Vol. 184 – Art. e109612.

6. Senko O., Stepanov N., Maslova O., Efremenko E. “Nature-like” cryoimmobilization of phototrophic microorganisms: New opportunities for their long-term storage and sustainable use //Sustainability. – 2022. – Vol. 14. – No. 2. – Art. e661.

7. Agathokleous E., Peñuelas J., Azevedo R. A., Rillig M. C., Sun H., Calabrese E. J. Low levels of contaminants stimulate harmful algal organisms and enrich their toxins. // Environmental Science & Technology. – 2022. – Vol. 56. – No. 17. – P. 11991-12002.
8. Senko O., Stepanov N., Maslova O., Efremenko E. What Can Contribute to Weakening of Poly (Vinyl Alcohol) Cryogels Used for Cell (Self) Immobilization? //Applied Microbiology. – 2025. – Vol. 5. – No. 3. – Art. e 97.

УДК 376:15

ПОЛИАМИНОКСИДАЗЫ ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫХ ДРОЖЖЕЙ ДЛЯ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛИАМИНОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

Сергеев Е.П.[1,2], **Хасанова М.Р.**[1,3], **Ефремова Е.Д.**[1,4], **Головина Д. И.**[1,2], **Атрошенко Д.Л.**[1,2]

[1] *Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия*
[2] *ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва, Россия*
[3] *РХТУ им. Д.И.Менделеева, г. Москва, Россия*
[4] *РТУ МИРЭА, г. Москва, Россия*
egor.sergeev@chemistry.msu.ru

Аннотация. В докладе представлена информация о полученных нами новых ферментах – полиаминоксидазах из различных термотолерантных дрожжей, на основе которых в дальнейшем мы планируем построить систему анализа полиаминов в биологических жидкостях. В результате работы нами были получены в биотехнологически релевантной системе экспрессии *Escherichia coli* три новых полиаминоксидазы и описаны их основные свойства, необходимые для анализа. Также нами были получены условия пробоподготовки слюны, позволяющие получать повышенный отклик флуоресценции продукта пероксидазной реакции при добавлении экзогенных полиаминов.

Ключевые слова: полиамины, полиаминоксидазы, биоаналитические системы.

Полиамины – линейные биологические молекулы, имеющие 2 и более свободных или ацилированных аминогруппы \(путресцин, спермидин, спермин и их ацилированные формы), участвующие в различных клеточных процессах, включая пролиферацию клеток. При раковых заболеваниях метаболизм полиаминов нарушается, вследствие чего меняется их концентрация в биологических жидкостях. Это позволяет использовать их как биомаркеры для диагностики и контроля лечения рака, что подтверждается различными метаболомными исследованиями последних лет. Кроме того, концентрация полиаминов изменяется в крови и моче при нейродегенеративных заболеваниях, инсульте, почечной недостаточности, сердечной недостаточности, инфаркте миокарда и атопическом дерматите. Основным методом определения концентрации полиаминов является хроматография, и большая часть методик требует масс-спектрометрической детекции. Это крайне дорогой и сложный метод, требующий высококвалифицированного персонала и мощной материально-технической базы аналитической лаборатории. Использование ферментативных методов является альтернативой для массового применения, лишенной данных недостатков. Методики на основе ферментативных реакций доступны широкому кругу пользователей, что упрощает масштабирование и внедрение. Полиаминоксидазы – это ферменты, катализирующие окисление вторичных аминогрупп полиаминов кислородом с выделением пероксида водорода, что позволяет использовать их в составе электрохимических сенсоров, а также быстро создавать фотометрические и флуориметрические методики определения.

В ходе работы мы клонировали 8 генов, потенциально кодирующих полиаминоксидазы, из 5 различных штаммов термотолерантных дрожжей. Из них при экспрессии в *Escherichia coli* нам удалось получить 5 ферментов в растворимой форме — все ферменты из *Ogataea parapolymorpha* DL-1 (**OpaPAO1**–**3**), фермент из *Kluyveromyces marxianus* (**KmaPAO**) и фермент из *Lachancea thermotolerans* (**LtePAO**). Однако фермент из *L. thermotolerans* синтезировался в крайне малом количестве и выделялся с низкой чистотой на металлоаффинной хроматографии. Исходя из выхода фермента с литра среды и субстратной специфичности, оптимальными для дальнейшей работы оказались OpaPAO1 и OpaPAO3, обладающие специфичностью к ацилированным полиаминам, и KmaPAO, показавший активность со всеми распространёнными полиаминами. Мы изучили основные физико-химические свойства этих трёх ферментов.

Данные ферменты оказались достаточно термостабильны. При этом OpaPAO1 имеет высокую удельную активность и k_{cat} с ацилированными полиаминами (>100 $с^{-1}$ для каждого субстрата), в то время как активность OpaPAO3 и KmaPAO со своими субстратами ниже (k_{cat} в диапазоне 1–10 $с^{-1}$). Все ферменты наиболее активны при pH 9. Кроме того, нами было замечено, что окисление $N^{1,12}$-диацетилспермина происходит по обеим вторичным аминогруппам, что необходимо учитывать при проектировании анализа.

В качестве первого объекта для анализа мы выбрали слюну. Данная биологическая жидкость на данный момент достаточно редко используется в медицинских лабораториях, однако ее отбор наименее инвазивен и не вызывает негативной реакции пациентов. Кроме того, согласно имеющимся в литературе данным, в слюне концентрация полиаминов для здоровых и больных людей отличается наиболее сильно. Мы опробовали разные методы депротеинизации и удаления веществ, влияющих на анализ. На данный момент мы остановились на подходе с использованием экстракции этилацетатом, анионообменной хроматографии и упаривания образцов, но в дальнейшем мы планируем упростить данную схему. Таким образом, OpaPAO1, OpaPAO3 и KmaPAO являются перспективными ферментами для разработки ферментативных методов определения полиаминов, а предложенная схема пробоподготовки слюны может служить основой для дальнейшей оптимизации анализа в биологических жидкостях.

УДК 577:15

ВЛИЯНИЕ ОСТАТОЧНОГО ЛИГНИНА НА ВЫХОД САХАРОВ В ХОДЕ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ДРЕВЕСНЫХ ЦЕЛЛЮЛОЗ

Серкова С.Ю.[1], Каретова К.М.[2], Аксенов А.С.[1]

[1] Северный (Арктический) федеральный университет, Архангельск, РФ
[2] Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, РФ
Sonyaserkova2101@gmail.com

Аннотация. В работе проведено сравнение влияния сульфатного и сульфитного способов делигнификации на эффективность гидролиза целлюлозных полуфабрикатов из древесины лиственных и хвойных пород целлюлазами и гемицеллюлазами. Показано, что сульфитный метод обеспечивает более глубокую деструкцию лигноуглеводного комплекса: остаточный сульфированный лигнин менее гидрофобен и в меньшей степени препятствует ферментативному гидролизу целлюлозы.

Ключевые слова: лигнин, целлюлозы, делигнификация, активность, сахара.

Лигноцеллюлозная биомасса характеризуется сложной иерархической структурой, где элементарные фибриллы целлюлозы инкапсулированы в матрикс гемицеллюлоз и лигнина, целлюлоза обладает кристалличностью, лигнин – гидрофобностью, что значительно влияет на способность полисахаридов к ферментативному гидролизу в ходе разложения или биотехнологической конверсии [1]. Таким образом, для увеличения реакционной способности целлюлозосодержащих материалов и обеспечения экономически целесообразной ферментативной конверсии требуется стадия предварительной обработки, направленная на измельчение сырья, разрушение кристаллической структуры целлюлозы и, что наиболее важно, делигнификацию. В контексте биокатализа древесных материалов рационально рассматривать цикл целлюлозно-бумажного производства как наиболее экономически эффективный промышленно отлаженный способ делигнификации, однако необходим поиск менее энергозатратных технологий, позволяющих эффективно разрушать лигнин-гемицеллюлозный матрикс. Цель данной работы: сравнить влияние различных способов делигнификации и установить взаимосвязь между количеством лигнина и эффективностью ферментативного осахаривания целлюлозы на примере модельных полуфабрикатов целлюлозно-бумажной промышленности.

В качестве объектов для исследования использовались образцы влажных промышленных целлюлозных полуфабрикатов из лиственных (до кислородно-щелочной обработки (КЩО), после КЩО и после стадии D_0) и хвойных пород древесины с различным содержанием остаточного лигнина и типом его химической модификации. Для гидролиза применяли ферментный комплекс продуцента *Talaromyces verruculosus* [2] с расходом 8,1 единиц активности по ФБ/г а.с.ц. в шейкере-инкубаторе Biosan es-20/60 (Biosan, Латвия) при концентрации субстрата 5%, температуре 50°C, pH 5 на протяжении 24 и 48 часов. С целью повышения эффективности процесса, моделирующего промышленный, ферментативный гидролиз проводили аналогично, но при концентрации субстрата 2% в лабораторном биореакторе Biostat A Plus (Sartorius, Германия) при постоянном перемешивании 200 – 300 об/мин, в объёме 1 л реакционной смеси с пробоотбором через 1, 2, 3 и 24 часа. Концентрацию глюкозы определяли глюкозооксидазным методом на автоматическом анализаторе глюкозы Энзискан Ультра (Лабовэй, Россия), количество восстанавливающих сахаров (ВС) (в г/л) – колориметрически, по методу Шомоди-Нельсона. Компонентный состав растворимых продуктов гидролиза целлюлоз анализировали методом высокоэффективной анионообменной хроматографии с помощью системы Agilent 1200 («Agilent technologies», США) с автоматической системой ввода пробы, электрохимическим детектором Coulochem III («Thermo Scientific ESA», США) и системой обработки данных ChemStation

на оборудовании ФИЦ Биотехнологии РАН (углеводы) и с помощью УФ-спектрофотометра UV-1800 (Shimadzu, Япония). Регистрация спектров поглощения осуществлялась в диапазоне 190 – 1100 нм. с шагом сканирования 1 нм. Компонентный состав непрогидролизованного целлюлозного остатка определяли методом ИК-спектроскопии на ИК Фурье-спектрометре IR Prestige 21 (Shimadzu) относительно воздуха: приставка НПВО MIRacle с призмой ZnSe («Pike», США), диапазон 4000-600 $см^{-1}$, разрешение 2 $см^{-1}$, 128 сканирований, функция аподизации SqrTriangle. Оптические плотности рассчитаны относительно внутреннего стандарта 2920 $см^{-1}$ и базовой линии, проведенной по точкам 4000, 3700, 2700, 1800 и 850 $см^{-1}$.

После 24 часов гидролиза самый высокий выход сахаров показала лиственная сульфатная целлюлоза с минимальным содержанием лигнина 1%. Хвойные сульфатная и сульфитные целлюлозы за 24 часа уступали лиственным. Однако увеличение продолжительности процесса до 48 часов показало, что образец хвойной сульфитной целлюлозы с самым большим содержанием лигнина 6,8% имеет наибольшую реакционную способность при ферментативном гидролизе и по выходу глюкозы на 18% превышает хвойную сульфатную целлюлозу.

Для изучения структурных изменений, происходящих в древесных целлюлозах в процессе ферментативного гидролиза, был проведен сравнительный анализ ИК-спектров полученных образцов. Показано, что сульфированный лигнин является более окисленным что положительно влияет на процесс ферментативного гидролиза, предотвращая вероятность неспецифичного связывания ферментов. Помимо этого, за счет присоединения к лигнину, в процессе сульфитной варки, полярных карбонильных и карбоксильных групп он становится менее гидрофобным, что облегчает доступ ферментов к целлюлозе.

Таким образом, проведенное исследование подтвердило определяющую роль метода предварительной обработки древесины в эффективности последующего ферментативного гидролиза. Сравнительный анализ различных видов технических целлюлоз показал, что на эффективность осахаривания лигноцеллюлозных материалов древесного происхождения оказывает влияние не только уровень содержания лигнина, но и его модификация в ходе стадий предварительной подготовки.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 26-14-00455.

Список литературы

1. Shafiei-Alavijeh, R., Aghbashlo, M., Tabatabaei, M., Denayer, J. F. M., & Karimi, K. (2024). A critical review of sustainable biorefineries utilizing high-solid processing for industrial crop lignocellulosic wastes valorization. Industrial Crops and Products, 211, Article 118236. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.118236.
2. Kellett, F.; Tikhomirova, N.; Zhukov, V.; Volkov, P.; Sinitsyn, A.; Rozhkova, A. Transcription Factors ClrB and XlnR and Their Effect on the Transcription of Cellulase Genes in the Filamentous Fungus *Penicillium verruculosum*. Int. J. Mol. Sci. 2024, *25*, 13373. https://doi.org/10.3390/ijms252413373.

УДК 577.15.03:036

ЭФФЕКТИВНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДВОЙНОЙ СТИМУЛЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ПОЛИМЕРОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ФЕРМЕНТНЫХ БИОСЕНСОРОВ

Сиголаева Л.В.[1], **Рудаков Н.С.**[1,2], **Пергушов Д.В.**[1]

[1] Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
[2] Факультет наук о материалах МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
lsigolaeva@genebee.msu.ru

Аннотация. В докладе рассмотрены перспективы и преимущества использования полимеров, обладающих двойной стимулчувствительностью, для эффективной модификации ими поверхностей, а также последующей нековалентной иммобилизации ферментов на модифицированных такими полимерами поверхностях с целью создания ферментных биосенсорных систем.

Ключевые слова: иммобилизация ферментов, стимулчувствительные полимеры, полимер-ферментные плёнки, биосенсорные покрытия, оксидоредуктазы.

Разработка эффективных подходов к недеструктивной иммобилизации ферментов, на твердых поверхностях является актуальной задачей современной биотехнологии и медицины. Один из перспективных подходов, активно применяемый в настоящее время для решения этой задачи, заключается в использовании функциональных полимеров для модификации поверхностей с целью дальнейшей (либо ковалентной либо нековалентной) иммобилизации на них ферментов [1,2].

В этом отношении особый интерес представляют стимулчувствительные («умные») полимеры [3], которые способны значительно, быстро и обратимо изменять свои свойства, и прежде всего свой гидрофильно-гидрофобный баланс, при изменении условий окружающей среды, в том числе состава растворителя (включая pH и ионную силу) и температуры. Высокая адаптивность подобных полимеров, проявляющаяся в их способности эффективно подстраиваться под условия окружающей среды, позволяет применять их для модификации поверхностей различной природы и последующей нековалентной иммобилизации на модифицированных ими поверхностях разнообразных биомолекул, в том числе и ферментов. Таким образом, стимулчувствительные полимеры можно эффективно использовать для формирования полимер-ферментных покрытий на твердых поверхностях, например, путём последовательной (двухстадийной) адсорбции полимерного компонента (стадия 1), а затем фермента (стадия 2), что открывает широкие возможности для конструирования на их основе высокочувствительных биоаналитических систем.

В данной работе в качестве стимулчувствительных полимеров были использованы полидиметиламиноэтилметакрилат (ПДМАЭМА) и поли-1-этил-3-винилимидазолий бромид (ПВИ), которые при определенных условиях в водных средах способны проявлять двойную стимулчувствительность. В частности, ПДМАЭМА является pH- и термочувствительным полимером, обладающим нижней критической температурой растворения (НКТР), которая зависит от pH его водного раствора [4]. В то же время, термочувствительность ПВИ проявляется в присутствии йодид-анионов и характеризуется наличием верхней критической температуры растворения (ВКТР), которая определяется концентрацией йодида в его водном растворе [5].

Методом пьезоэлектрического микровзвешивания с мониторингом диссипации показано, что масса адсорбированного полимера (полимерной плёнки) на покрытой тонким слоем золота поверхности кварцевого резонатора сильно зависит от условий, при которых происходит его адсорбция. Так, она значительно (многократно) возрастает, если этот процесс проводить при условиях, когда макромолекулы полимера находятся в существенно гидрофобизованном состоянии. В частности, подобные условия соответствуют pH 10 и 40°C (T > НКТР) в случае ПДМАЭМА [4] и 60 мМ NaI и 25°C (T < ВКТР) в

случае ПВИ [5]. При этом происходит формирование «жёстких» полимерных покрытий, которые при pH 7 способны нековалентно связывать значительные количества ферментов с низкими изоэлектрическими точками (глюкозооксидазу, холиноксидазу и др.). Установлено, что масса иммобилизованного фермента определяется в первую очередь массой полимерной плёнки.

Методом атомно-силовой микроскопии проведено исследование нанорельефа полимерных покрытий на золотой и графитовой поверхностях. Обнаружено, что наибольшей степени заполнения поверхности полимером и толщины полимерной плёнки можно достичь, если адсорбцию полимера проводить при обозначенных выше «наилучших» условиях, которые соответствуют существенно гидрофобизованному состоянию его макромолекул [4,5]. При этом формируются сплошные полимерные покрытия, толщина которых находится в нанометровом диапазоне, Показано, что инкубация полимерной плёнки в растворе фермента (pH 7, 25°C) меняет его нанорельеф за счет взаимодействия его глобул с адсорбированным полимером, не изменяя значительно степень заполнения исходной поверхности.

Продемонстрировано применение полученных полимер-ферментных покрытий для конструирования электрохимических (амперометрических) биосенсорных систем. Для этого их формировали путём последовательной (двухстадийной) адсорбции полимера (при «наилучших» условиях, соответствующих существенно гидрофобизованному состоянию его макромолекул), а затем фермента (pH 7, 25°C) на поверхность планарных графитовых электродов, предварительно модифицированных пероксидчувствительным медиатором (наночастицы диоксида марганца). Методом амперометрии определены аналитические характеристики (чувствительность, предел обнаружения, линейный диапазон) и изучена операционная стабильность таких биосенсорных систем [4,5], которые свидетельствуют о перспективности их практического использования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 25-23-00125, https://rscf.ru/project/25-23-00125/). Эксперименты методами атомно-силовой микроскопии и пьезоэлектрического микровзвешивания с мониторингом диссипации проведены с использованием оборудования, приобретенного по Программе развития МГУ имени М. В. Ломоносова.

Список литературы

1. Sheldon R.A., van Pelt S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how // Chemical Society Reviews. – 2013. – Vol. 42. – No. 15. – P. 6223–6235.
2. Rodriguez-Abetxuko A., Sánchez-deAlcázar D., Muñumer P., Beloqui A, Tunable polymeric scaffolds for enzyme immobilization // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2020. – Vol. 8. – Art. 830.
3. Cohen Stuart M.A., Huck W.T.S., Genzer J., Müller M., Ober C., Stamm M., Sukhorukov G.B., Szleifer I., Tsukruk V.V., Urban M., Winnik F., Zauscher S., Luzinov I., Minko S. Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials // Nature Materials. – 2010. – Vol. 9. – No. 2. – P. 101–113.
4. Sigolaeva L.V., Rudakov N.S., Pergushov D.V. Polymer-enzyme films on conductive surfaces: from surface modification by a dual-stimuli-sensitive polymer to design of electrochemical biosensors // ACS Applied Polymer Materials 2025. – Vol. 7. – No. 17. – P. 11690–11702.
5. Sigolaeva L.V., Rudakov N.S., Pergushov D.V. Leveraging sodium iodide for improved modification of conductive surfaces by an imidazolium-based poly(ionic liquid): toward engineering the electrochemical enzymatic biosensors // Macromolecular Chemistry and Physics. – 2026. – Vol. 227. – No. 2. – Art. e00396.

УДК 577.151, 615.468.7

КОМБИНИРОВАННЫЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА, КАТАЛАЗЫ И НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА: СТРУКТУРА И СВОЙСТВА

Скуредина А.А., Костин М.Ю., Ле-Дейген И.М., Клячко Н.Л.

Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
anna.skuredina@yandex.ru

Аннотация. В докладе представлена информация о получении и физико-химических свойствах гелей хитозана, нагруженных наночастицами серебра и каталазой. Показана эффективность загрузки обоих компонентов, распределение частиц в матрице хитозана, а также влияние наночастиц на активность фермента. Полученный материал, потенциально обладающий антибактериальным и антиоксидантным действием, перспективен для терапии хронических ран.

Ключевые слова: хитозан, наночастицы серебра, каталаза, терапия хронических ран

Процесс заживления повреждения кожных покровов представляет собой многостадийный и сложный физиологический процесс, играющий ключевую роль в поддержании тканевого гомеостаза. В условиях открытых ран в зоне поражения генерируются активные формы кислорода (АФК) [1]. В течение воспалительной реакции биологическая роль АФК сводится к реализации защитных функций против патогенов, а также к участию в качестве сигнальных молекул во внутриклеточных каскадах и индукции иммунного ответа. Однако длительное течение воспалительной фазы, что особенно характерно при ожогах и у пациентов с сахарным диабетом, сопровождается избыточным накоплением АФК. Превышение физиологически допустимых значений концентраций АФК индуцирует локальный апоптоз фибробластов [2,3].

Кроме того, высокие концентрации АФК не всегда способны обуславливать предотвращение возникновения заражения. Так, хронические раны крайне подвержены инфицированию, которое может усугубить состояние пациента, иногда приводя к ампутации. Среди наиболее часто встречающихся патогенов можно отметить *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis* и *Pseudomonas aeruginosa*, которые способны образовать биопленку и снижать эффективность действия противомикробных препаратов [4].

Таким образом важным направлением является разработка комбинированных систем для заживления ран, включающих, как антиоксидантные, так и антибактериальные свойства. В данной работе предлагаются системы на основе гелей высокомолекулярного хитозана (190-375 кДа) с инкапсулированными наночастицами серебра (НЧ) в качестве противомикробного агента и ферментом каталазой (Кат) как антиоксиданта для снижения концентрации АФК.

Для равномерного распределения НЧ в образце загрузку частиц осуществляли следующим образом: в раствор 1%-го Хитозана в 1% уксусной кислоте вносили разное количество НЧ (0.019 - 0.129 мМ), полученных классическим цитратным методом. При интенсивном перемешивании растворов добавляли по каплям раствор 1 М NaOH до появления устойчивой мутности. Полученные образцы оранжевого цвета промывали дистиллированной водой и определяли содержание НЧ в супернатантах методом УФ спектроскопии на длине волны 420-430 нм.

По данным NTA в растворе с нейтральным значеним pH НЧ представляют собой гомогенный образцы со средним диаметром 36 нм. В результате добавления щелочи наблюдается обесцвечивание раствора и образование агрегатов до 100 нм. Установлено, что в матрице хитозана частицы преимущественно сохраняют свой размер. НЧ сорбируются в широком интервале концентраций (Рисунок 1.А), при этом эффективность загрузки составляет от 40 до 85%.

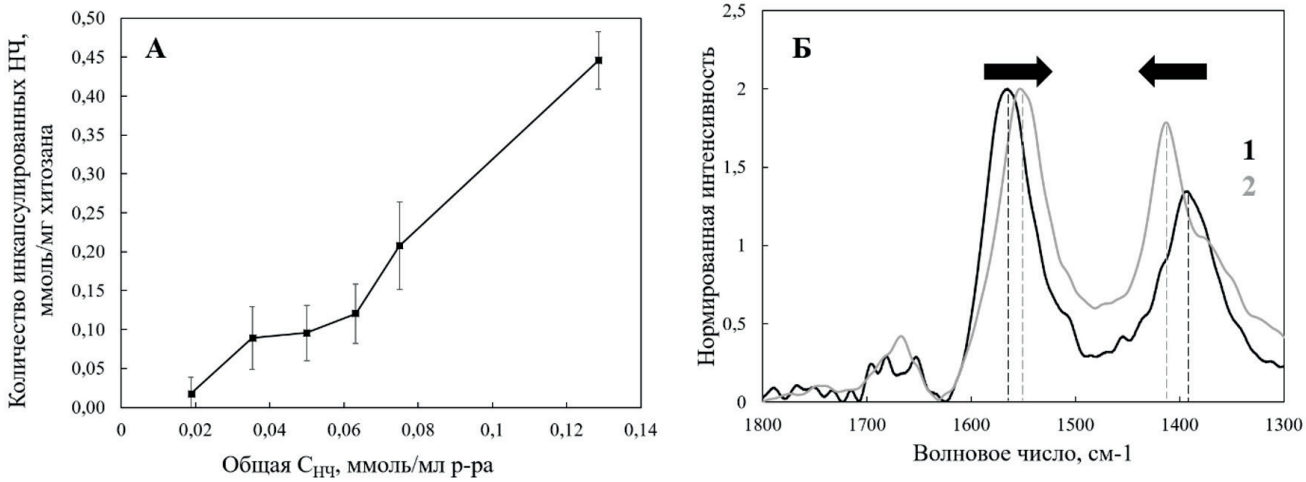


Рисунок 1. А. Кривая сорбции НЧ в хитозан, H_2O. Б. ИК-спектры НЧ (1) и НЧ в матрице хитозана (2), 22°С.

Для исследования межмолекулярных взаимодействий между матрицей хитозана и НЧ был использован метод ИК-спектроскопии. В ИК-спектре НЧ присутствует две интенсивные полосы поглощения 1567 $см^{-1}$ и 1393 $см^{-1}$, соответсвующие валентным ассиметричным и симметричным колебаниям COO^- группы соответственно (Рисунок 1.Б). При вычитании ИК-спектра Хитозана из ИК-спектра НЧ-Хитозан обнаружено, что полосы частиц претерпевают разнонаправленные сдвиги на 7-10 $см^{-1}$. В литературе сближение полос поглощения COO^- указывает на образование функциональными группами ионных взаимодействий и снижения вклада свободных ионных форм в растворе, что было продемонстрировано в присутствии ионов металлов [5]. Таким образом, НЧ удерживаются в матрице носителя не только посредством стерических ограничений, но и вследствие ионных взаимодействий, вероятно с заряженными аминогруппами Хитозана.

Для анализа распределения НЧ в образцах был использован метод ИК-микроскопии. Построение карты по полосе поглощения 1567 $см^{-1}$ показало равномерное распределение компонентов по поверхности хитозана.

Перед получением комбинированных систем Кат-НЧ-Хитозан было исследовано влияние НЧ на физико-химические свойства Кат. Растворы Кат-НЧ в разных мольных соотношениях выдерживали в течение получаса при интенсивном перемешивании. Взаимодействие компонентов оценивали с помощью метода флуоресцентной спектроскопии. Показано, что спектр эмиссии каталазы (λ_{ex} = 280 нм) не изменяет свое положение и интенсивность при мольных соотношениях Кат : НЧ от 1 : 0.5 до 1 : 100. Для данных образцов также была исследована пероксидазная активность (изменение сигнала H_2O_2 на 240 нм, pH 7.4). Установлено, что НЧ не влияют на концентрацию перекиси в растворе в течение 60 с, при этом активность фермента сохраняется постоянной. Таким образом, НЧ не взаимодействуют с Кат и не оказывают влияние на её пероксидазную активность.

В результате физической иммобилизации Кат в НЧ-Хитозан были получены комбинированные системы с разным содержанием НЧ: Кат-НЧ-Хитозан-1 и Кат-НЧ-Хитозан-2, в которых содержание частиц составляет 0,13 и 0,45 ммоль/мг соответственно. Эффективность загрузки Кат оказалась невысока (5% и 30%), однако системы продемонстрировали выраженную ферментативную активность: константы Аеби, нормированные по концентрации каталазы составляет примерно 0,1 мг каталазы / мг образца × с. Установлено, что активность каталазы в комбинированных системах сохраняется постоянной при хранении систем при 4°С в течение 14 дней.

Таким образом, в работе получены и исследованы физико-химические свойства комбинированных систем на основе Хитозана, Кат и НЧ серебра, потенциально обладающие антибактериальными и антиоксидантными свойствами. Показано, что НЧ включаются в хитозан в широком диапазоне концен-

траций, при этом распределены в системе равномерно. НЧ не оказывают влияния на каталитические свойства свободной Кат. Несмотря на умеренную эффективность загрузки Кат в НЧ-Хитозан системы обладают выраженной ферментативной активностью, которая сохраняется при длительном хранении образцов.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 25-45-02002. Работа выполнена с использованием приборов, закупленных при поддержке Программы Развития МГУ (Bruker Tensor 27, Simex Микран).

Список литературы

1. Jiri Kanta. The Role of Hydrogen Peroxide and Other Reactive Oxygen Species in Wound Healing // Acta Medica (Hradec Kralove Czech Republic). – 2016. – Vol. 54. – P. 97-101.
2. Parihar A., Parihar M.S., Milner S., Bhat S. Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury // Burns. – 2008. – Vol 34. – P. 6-17.
3. Wenqian Z., Lang C., Yuan X. et al. Antioxidant Therapy and Antioxidant-Related Bionanomaterials in Diabetic Wound Healing // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2021. – Vol. 9. – Art. 707479.
4. Norton P., Trus P., Wang F., Thorton J. M., Chang C. Understanding and treating diabetic foot ulcers: Insights into the role of cutaneous microbiota and innovative therapies // Skin Health and Disease. – 2024. – Vol. 4. – Issue 4.
5. Park J.-W., Shumaker-Parry J.S. Structural Study of Citrate Layers on Gold Nanoparticles: Role of Intermolecular Interactions in Stabilizing Nanoparticles // Journal of the American Chemical Society. – 2014. – Vol. 136. – Issue 5. – P. 1907-1921.

АНАЛИЗ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ. SPR, BLI, MST, ITC. ЧТО ВЫБРАТЬ?

Смирнов А.С.

ООО «Техноинфо», г. Москва, РФ
a.smirnov@technoinfo.ru

Аннотация. В докладе представлена информация об популярных методах анализа межмолекулярных взаимодействий, в частности, рассмотрены качественные и количественные подходы к аффинности. Проведено сравнение методов SPR, BLI, MST, ITC и соответствующих им коммерческих приборов. Также на примере корейской компании icluebio рассмотрено, как различные технические подходы решают основные ограничения SPR-биосенсоров.

Ключевые слова: SPR, BLI, MST, ITC, аффинность, межмолекулярные взаимодействия.

Аффинность в биохимии – это сила взаимодействия между биомолекулой (лигандом) и молекулой—партнёром (аналитом). Наиболее важной характеристикой аффинности является равновесная константа диссоциации (K_D). В простейшем случае, при связывании 1:1, она отвечает такой концентрации аналита, при которой 50% молекул лиганда находится в связанном состоянии. Иными словами, K_D даёт информацию о том, образуется ли молекулярный комплекс при заданных концентрациях субстратов; чем она меньше, тем выше аффинность [1].

Необходимость определять аффинность возникает и в фундаментальных, и в прикладных исследованиях. При изучении внутриклеточных процессов нужно учесть и охарактеризовать огромное число взаимодействий между тысячами различных молекул. Это становится возможным благодаря современным высокопроизводительным методам определения аффинности. Кроме того, измерение аффинности – это неотъемлемая часть процесса разработки лекарств. На начальных этапах нужно не только провести скрининг большого количества молекул-кандидатов, но и «ранжировать» наиболее перспективные соединения по силе связывания с мишенью. Определение аффинности также может быть полезно при разработке новых анализов и тест-систем.

Существует множество как качественных, так и количественных методов изучения аффинности. Качественные методы, такие как иммуноферментный анализ, биохимическая экстракция белков, гель-электрофорез и др., просто дают понять, происходит ли связывание в заданных условиях; это наиболее «грубая» оценка аффинности. Во многих же аспектах важно иметь информацию о силе того или иного межмолекулярного взаимодействия. На сегодняшний день для этих целей применяют самые разные количественные методы, но наиболее популярны четыре из них: изотермическая титрационная калориметрия (ITC), поверхностный плазмонный резонанс (SPR), интерферометрия биослоя (BLI) и микроскопический термофорез (MST) [2].

Каждый из описанных методов обладает своими преимуществами и недостатками. При выборе подходящего для конкретной лаборатории оборудования необходимо руководствоваться не только кругом решаемых задач, но и сложностью в использовании и обслуживании. Для российских исследователей также важен вопрос доступности нового оборудования, обусловленный уходом многих ведущих компаний с рынка. Какие же решения доступны на данный момент?

В последние несколько лет в России набирают популярность южнокорейские биосенсоры SPR от компании icluebio. Их системы поверхностного плазмонного резонанса iMSPR-Pro series смогли решить основные проблемы присущие классическим SPR системам сделав их более компактными, доступными, при этом сохраняя в себе точность, качество и производительность на уровне мировых производителей. Компания icluebio значительно упростила одно из главных ограничений метода SPR – обучение методологии. Это стало возможным благодаря специально разработанной системе iMSPR-mini, которая позиционируется, как прибор, идеально подходящий для образовательных программ в

университетах и институтах для обучения специалистов методу SPR, различным экспериментальным подходам и нюансам по интерпретации результатов. Доступность для поставок в Россию и функциональность систем могут стать прекрасной заменой привычным системам Octet, MicroCal ITC или Biacore.

Список литературы

1. Panagiotis L Kastritis, Alexandre M J J Bonvin. On the binding affinity of macromolecular interactions: daring to ask why proteins interact. // J R Soc Interface. – 2013. – Vol. 10. – No. 79.
2. Thomas D. Pollard. A Guide to Simple and Informative Binding Assays. // Molecular Biology of the Cell. – 2017. – Vol. 21. – No. 23. – P. 827–839.

УДК 543.424.2

ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ РЕГИСТРАЦИИ СПЕКТРОВ ГКР ПУРИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

Сокол М.Б.[1], Никольская Е.Д.[1], Чиркина М.В.[1], Моллаева, М.Р.[1], Яббаров Н.Г.[1], Клименко М.А.[1], Гуляев И.А.[1], Евтушенко Е.Г.[1, 2], Курочкин И.Н.[1]

[1] Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, г. Москва, РФ
[2] Химический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, г. Москва, РФ
mariyabsokol@gmail.com

Аннотация. В докладе представлена информация о влиянии типа и концентрации агрегирующего агента на сигнал ГКР пуриновых производных. Установлены оптимальные условия, специфично влияющие на интенсивность сигнала ГКР различных типов пуриновых производных.

Ключевые слова: пуриновые производные, ГКР, антибиотикорезистентность, агрегирующий агент, серебряные наночастицы.

Пурины являются ключевыми метаболитами, участвующими в синтезе нуклеотидов и нуклеиновых кислот, а также выполняют сигнальные функции у эукариот, регулируя клеточные процессы [1]. У микроорганизмов пуриновый метаболизм связан с ростом и выживаемостью в изменяющихся условиях среды, что делает его важной мишенью для изучения физиологии бактерий.

Показано, что пуриновый метаболизм влияет на эффективность действия антибиотиков и формирование антибиотикорезистентности [2], которая на сегодняшний день остаётся глобальной проблемой здравоохранения. В связи с этим актуальна разработка экспресс - методик оценки метаболизма бактерий.

Метод гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) позволяет регистрировать спектры различных молекул с высокой чувствительностью; при этом спектры бактерий формируются преимущественно смесью шести пуриновых производных: аденина, гуанина, аденозинмонофосфата (АМФ), гипоксантина, ксантина и мочевой кислоты [3]. Интенсивный сигнал пуринов характерен для жизнеспособных клеток, что открывает возможности применения ГКР для оценки антибиотикорезистентности бактерий.

Эффект ГКР наблюдается на поверхности наночастиц благородных металлов за счёт локального поверхностного плазмонного резонанса. Максимальное усиление сигнала достигается в «горячих точках» — областях с высокой напряженностью электрического поля, формирующихся в межчастичных зазорах при агрегации частиц, индуцированной повышением ионной силы. Однако зачастую агрегирующей агент, помимо неспецифической агрегации частиц, дополнительно влияет на связывание аналита с поверхностью частиц, либо конкурируя с ним и снижая сигнал ГКР, либо способствуя связыванию за счет образования комплексов и ионных пар на поверхности.

Целью данной работы являлось изучение влияния типа и концентрации агрегирующего агента на интенсивность сигнала ГКР пуриновых производных для определения оптимальных условий их регистрации в контексте метаболического профилирования пуринов и оценки антибиотикорезистентности бактерий.

Для снижения вариабельности спектров из-за присутствия различных кислотно-основных форм было выбрано значение pH = 6,4, максимально удаленное от pKa всех исследуемых пуриновых производных. Для поддержания выбранного значения pH использовали 20 мМ натрий-фосфатный буфер. В качестве агрегирующих агентов применяли NaCl, $NaNO_3$, CH_3COONa и Na_2SO_4 в диапазоне концентраций 0–1000 мМ.

Спектры регистрировали на спектрометре innoRam BWS445(B)-785S (BWTek, США) при длине волны 785 нм и мощности 135 мВт. В качестве ГКР-субстратов использовали серебряные наночастицы, полученные гидроксиламиновым методом [5].

Интенсивности сигнала ГКР пуриновых производных значительно отличались в зависимости от типа и концентрации агрегирующего агента. Так, при использовании NaCl интенсивность сигнала гипоксантина и гуанина была близка к нулю. В случае с ксантином и аденином максимум наблюдался при концентрации NaCl 50 мМ и 750 мМ, соответственно. Для мочевой кислоты интенсивность сигнала монотонно возрастала до концентрации агрегирующего агента 1000 мМ. В случае АМФ максимум интенсивности наблюдался в диапазоне концентраций NaCl 100-500 мМ. Наблюдаемые эффекты NaCl могут быть связаны с тем, что хлорид-ионы являются специфическими для поверхности серебра, формируя адсорбционный слой, таким образом, конкуруя с гипоксантином, гуанином и ксантином за свободные поверхностные атомы серебра, что приводит к снижению их сигнала ГКР. При этом для аденина и мочевой кислоты избыток хлорид-иона, напротив, способствует связыванию.

Оптимальный диапазон концентраций Na_2SO_4 для мочевой кислоты, гуанина и ксантина составил 25-50 мМ. Для аденина и гипоксантина максимум интенсивности наблюдался при наибольшей концентрации агрегирующего агента (1000 мМ). Для АМФ, аналогично системе с NaCl, наибольшая интенсивность сигнала соответствовала диапазону концентраций 100–500 мМ.

Агрегирующие агенты $NaNO_3$ и CH_3COONa демонстрировали сходные зависимости. Для всех исследованных аналитов, за исключением АМФ и гипоксантина, выраженный максимум интенсивности сигнала соответствовал области 25-50 мМ. В случае гипоксантина для обоих агрегирующих агентов наблюдалась высокая интенсивность сигнала в широком диапазоне концентраций. Для АМФ оптимальный диапазон концентраций $NaNO_3$ и CH_3COONa составлял 100–500 мМ.

Сходство зависимостей для нитрата и ацетата, вероятно, обусловлено сравнительно слабой специфической адсорбцией этих анионов на поверхности серебра, в отличие от Cl^-. Для дальнейших экспериментов был выбран $NaNO_3$, поскольку при его использовании регистрировались более высокие значения интенсивности сигнала по сравнению с CH_3COONa.

На основании полученных экспериментальных данных были выделены три набора условий, потенциально обеспечивающие наибольшую селективность регистрации отдельных аналитов при измерении спектров бактериальных образцов: (1) 750 мМ NaCl, (2) 1000 мМ Na_2SO_4 и (3) 50 мМ $NaNO_3$ (рисунок 1).

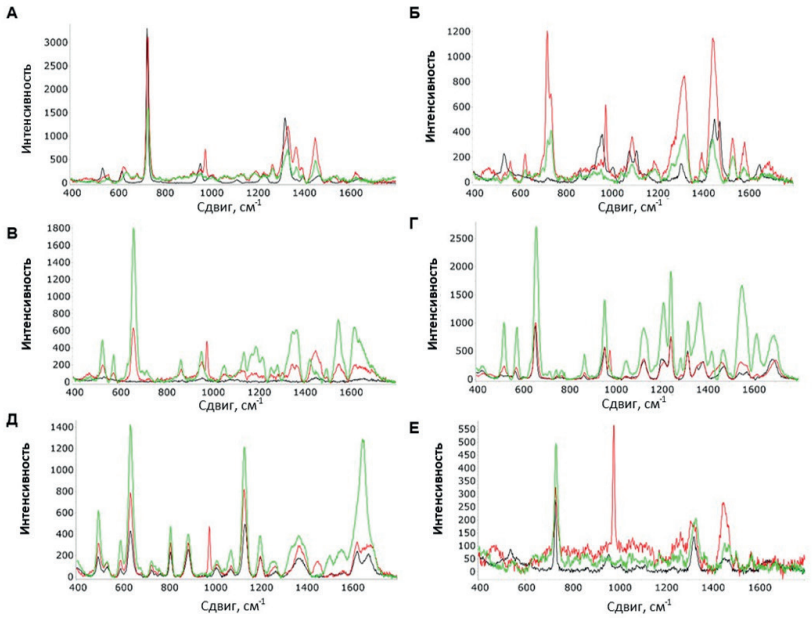


Рисунок 1. Спектры ГКР в оптимизированных условиях: А) аденина, Б) гипоксантина, В) гуанина, Г) ксантина, Д) мочевой кислоты, Е) АМФ. Черный - 750 мМ NaCl, красный - 1000 мМ Na_2SO_4, зеленый - 50 мМ $NaNO_3$

Таким образом, варьирование типа и концентрации агрегирующего агента позволяет управлять селективностью детекции пуриновых производных. Одновременное применение трех условий, специфично влияющих на интенсивность сигнала ГКР различных типов пуриновых производных, открывает возможности для повышения чувствительности и информативности анализа.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (FFZR—2024—0005, соглашение № 075-00422-24-02 от 28 мая 2024 г.).

Список литературы

1. Monteagudo-Cascales E., Gumerov V. M., Fernández M., Matilla M. A., Gavira J. A., Zhulin I. B., Krell T. Ubiquitous purine sensor modulates diverse signal transduction pathways in bacteria //Nature Communications. – 2024. – V. 15. – №. 1. – P. 5867.
2. Stevens C. E., Deventer A. T., Hobbs J. K. The impact of bacterial purine metabolism on antibiotic efficacy //npj Antimicrobials and Resistance. – 2025. – V. 3. – №. 1. – P. 69.
3. Premasiri W.R., Lee J. C., Sauer-Budge A., Théberge R., Costello C. E., Ziegler L. D. The biochemical origins of the surface-enhanced Raman spectra of bacteria: a metabolomics profiling by SERS // Analytical and bioanalytical chemistry. – 2016. – V. 408. – №. 17. – P. 4631-4647.

УДК 663.53

ИНТЕГРАЦИЯ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ПРЕДОБРАБОТКИ И МУЛЬТИФЕРМЕНТНОГО ГИДРОЛИЗА ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ПЕРЕРАБОТКИ ЛЬНЯНОЙ КОСТРЫ В БИОЭТАНОЛ

Соколова А.В., Степачева А.А., Ожимкова Е.В., Матвеева В.Г., Сульман М.Г.

ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», г. Тверь, РФ
alena.svet.00@yandex.ru

Аннотация. В докладе представлена информация об особенностях процесса производства биоэтанола второго поколения из льняной костры с целью утилизации агропромышленных отходов. Установлено, что предварительная обработка сырья ультразвуком является эффективной альтернативой кислотному гидролизу, обеспечивая высокую степень делигнификации и предотвращая образование соединений-ингибиторов ферментации. Последующий мультиферментный гидролиз и ферментация позволили достичь высокого выхода редуцирующих сахаров и целевого продукта. Результаты демонстрируют перспективность предложенной технологии для создания устойчивого и экономически эффективного процесса получения биотоплива.

Ключевые слова: биоэтанол, биотопливо второго поколения, лигноцеллюлозная биомасса, переработка биомассы, делигнификация, ферментативный гидролиз

Конец XX века характеризуется интенсификацией выпуска научно-исследовательских работ в области технологий конверсии биомассы в топливо. Данная тенденция обусловлена комплексом факторов, ключевыми из которых являются эскалация глобального спроса на энергоресурсы, прогнозируемое истощение запасов ископаемых энергоносителей, а также глобальный тренд на экологизацию промышленных производств, реализуемый через ориентацию на методы и принципы «зеленой химии», положения концепции устойчивого развития.

Биоэтанол и сегодня остается наиболее востребованным видом биотоплива. Мировой рынок этого продукта в 2025 году оценивается в 67 миллиардов долларов США, а в 2026 году ожидается рост до 13%. Классическая технология получения биоэтанола основана на микробиологической конверсии сахаров, полученных из сырья пищевого назначения (сахаросодержащих и крахмалосодержащих культур), посредством спиртового брожения. Получаемый данным способом этанол относят к биотопливу первого поколения, существенным недостатком которого является конкуренция за сырьевую базу с пищевой промышленностью. Данный фактор послужил стимулом для разработки технологий второго поколения, основанных на использовании непищевого лигноцеллюлозного сырья (агроиндустриальных отходов, растительной биомассы и т.п.). Технологическая схема производства биоэтанола из лигноцеллюлозы является многостадийной и включает следующие ключевые этапы: предварительную физико-химическую обработку сырья для разрушения/частичного разрушения полимерной матрицы, последующий ферментативный или кислотный гидролиз для получения редуцирующих моносахаридов, спиртовую ферментацию и финальную стадию разделения и очистки продукта – дистилляцию и ректификацию [1, 2].

Ключевыми стадиями процесса получения биоэтанола, определяющими экономическую целесообразность производственной линии, являются – предварительная обработка лигноцеллюлозного материала и гидролиз подготовленного субстрата. В качестве альтернативы традиционному кислотному гидролизу в последнее время все чаще рассматривается биотехнологический подход с использованием ферментных препаратов. Данный процесс протекает в мягких условиях, как правило, при температуре 45–50 °C и слабокислом значении pH (4,8–5,0), что позволяет минимизировать коррозионное воздействие на технологическое оборудование, накопление в гидролизате соединений-ингибиторов

спиртового брожения и т.д. Ключевым достоинством метода является его высокая селективность и эффективность, обеспечивающая максимальный выход редуцирующих сахаров. Эффективность ферментативного катализа определяется рядом параметров, среди которых можно выделить pH среды, доза внесения ферментативного препарата, продолжительность процесса, температурный режим и концентрация субстрата.

Ключевой технологической задачей при переработке лигноцеллюлозного сырья является стадия предварительной обработки, целью которой является эффективная делигнификация и повышение доступности целлюлозной фракции для последующего гидролиза. В рамках настоящего исследования была рассмотрена возможность применения ультразвуковой обработки в качестве метода предобработки растительной биомассы. Основное внимание уделялось оценке влияния рассматриваемого физического воздействия на эффективность делигнификации, а также на кинетические параметры последующего ферментативного гидролиза и общий выход биоэтанола.

В качестве объекта исследования в работе рассмотрена льняная костра – лигноцеллюлозный материал, представляющий собой крупнотоннажный побочный продукт льноперерабатывающей промышленности, состоящий из одревесневших фрагментов стеблей льна. Для количественной оценки химического состава сырья применялись стандартизированные аналитические методики.

Предварительная обработка льняной костры осуществлялась методом ультразвукового воздействия с использованием гомогенизатора Bandelin SONOPLUS HD 3100 (Bandelin, Германия). В качестве контрольного эксперимента для сравнения эффективности делигнификации сырья была применена традиционная двухстадийная обработка субстрата растворами азотной кислоты (HNO_3).

Ультразвуковое облучение разрушает растительные клетки благодаря кавитации, что приводит к вымыванию неорганических соединений из сырья. Кроме того, молекулы растворителя, быстро движущиеся в ультразвуковом поле, деполимеризуют молекулы биополимера, что приводит к образованию растворимых олигомеров. Деполимеризация молекул с более высокой молекулярной массой (т. е. лигнина) происходит с большей скоростью. Гемицеллюлозы, чувствительные к гидролизу, также деполимеризуются под действием ультразвукового облучения.

Ферментативный гидролиз льняной костры проводен с использованием мультиферментного комплекса, состоящего из коммерческих ферментных препаратов «Целлюлаза» (Биопрепарат, Россия), «Ксиланаза» (Биопрепарат, Россия), «Пектиназа» (Биопрепарат, Россия).

Количественный анализ гидролизатов осуществлен методом ВЭЖХ с использованием хроматографа UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, США), оснащенного рефрактометрическим детектором. Концентрации моносахаридов (глюкозы, фруктозы, рамнозы, мальтозы и ксилозы) определены с помощью калибровочных кривых.

Для производства биоэтанола использованы дрожжи SafSpirit D-53 Fermentis (SafSpirit, Франция). Коммерческий препарат содержит культуру *Saccharomyces cerevisiae* и моностеарат сорбитана в качестве эмульгатора. Концентрация биоэтанола в реакционной среде определена с использованием ареометра. Расчет проведен с использованием стандартных таблиц с термометрической поправкой.

Экспериментально установлено, что ультразвуковая предварительная обработка является эффективным методом повышения производства биоэтанола из льняной костры. Оптимизированные условия ультразвуковой предварительной обработки: интенсивность ультразвука 25 Вт/см², продолжительность обработки 30 мин. Предварительная обработка обеспечивает делигнификацию до 70 %, значительно снижая содержание лигнина (в 3,35 раза) и золы (в 2,2 раза) по сравнению с необработанной биомассой. Ультразвуковая предварительная обработка превосходит обработку азотной кислотой по эффективности делигнификации и позволяет избежать нежелательных побочных эффектов (например, деградации целлюлозы и образования фурфурола), которые снижают эффективность процесса ферментации. Дальнейший ферментативный гидролиз предварительно обработанной льняной костры проводился с использованием мультиферментного комплекса (ксиланаза : пектиназа : целлюлаза в соотношении 1/4:1/2:1/4) при pH 5,0, температуре 50 ºС. Достижение выхода редуцирующих сахаров на уровне 44 г/л обеспечивается при использовании мультиферментного комплекса в концентрации 210 мг/г. Установлено, что продолжительность гидролиза, равная 24 часам, является оптимальной, поскольку позволяет достичь необходимого баланса между выходом глюкозы и реологическими

свойствами среды, что является ключевым фактором для последующего процесса ферментации. Выход биоэтанола с использованием *Saccharomyces cerevisiae* достигает 15 г/л гидролизата (или 70 % на 1 т сырья). Таким образом, ультразвуковая предварительная обработка в сочетании с целенаправленным ферментативным гидролизом предлагает перспективный и устойчивый способ производства биоэтанола из льняной костры.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-79-10096-П)

Список литературы

1. Kusmayadi A, Leong Y K, Ong H C, Hidayatullah I M, Budiastuti H, Ridwan I. Advancements in low-carbon biofuel production from agricultural waste valorization. Biomass and Bioenergy, 2026, 207: 108726. DOI:: 10.1016/j.biombioe.2025.108726

2. Tanwar M D, Tanwar P K, Bhand Y, Bhand S, Jadhav K, Bhand S. Biofuels: Production and Properties as Substitute Fuels, From the Edited Volume Advanced Biodiesel - Technological Advances, Challenges, and Sustainability Considerations, Edited by Islam Md Rizwanul Fattah. London: IntechOpen, 2024, 180 p. DOI: 10.5772/intechopen.109073

УДК 663.1: 628.35

ДРОЖЖИ В СОСТАВЕ ИСКУССТВЕННЫХ КОНСОРЦИУМОВ ДЛЯ РЕШЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЗАДАЧ

Степанов Н.А., Ефременко Е.Н.

Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
na.stepanov@gmail.com

Аннотация. В докладе представлена информация об исследовании условий применения дрожжевых клеток в составе искусственных консорциумов в качестве биокаталитических систем для решения актуальных биотехнологических процессов, в частности, конверсии различных отходов, получения биотоплив и композитных материалов, а также очистки сточных вод. Показана высокая эффективность применения таких биокаталитических систем, в том числе с применением иммобилизованных форм клеток.

Ключевые слова: консорциумы, деградация поллютантов, биогаз, бактериальная целлюлоза, иммобилизация.

Некоторые виды дрожжей находят широкое применение в различных промышленных и биотехнологических процессах благодаря высокой скорости роста на широком спектре субстратов и способности синтезировать коммерчески значимые метаболитов, как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Наиболее часто используемыми являются виды дрожжей *Saccharomyces*, *Kluyveromyces, Candida* и другие [1]. В последнее время растет интерес к созданию искусственных микробных консорциумов, в том числе с применением клеток дрожжей, особенно для очистки сточных вод, получения биотоплив и реализации других процессов, аналоги которых могут встречаться в природных условиях [2]. Разнообразный микробный состав позволяет клеткам в консорциумах использовать общий метаболический потенциал для глубокой конверсии субстратов и преодолевать действие негативные факторов (наличие ингибиторов, повышение температуры, давления, изменение pH и т.д) [2]. Клетки дрожжей могут быть объединены с другими штаммами дрожжей, бактериями или мицелиальными грибами. Например, искусственные консорциумы дрожжей и мицелиальных грибов применяются главным образом с целью создания консолидированных биопроцессов, в которых гидролиз субстрата и его ферментация происходят одновременно. В этих консорциумах грибы путем секреции ферментов гидролизуют субстрат до соответствующих мономеров, которые впоследствии потребляются дрожжами, что одновременно позволяет предотвратить потенциальное ингибирование ферментов гриба, продуктами гидролиза [3].

В процессах очистки стоков от промышленных красителей эффективными представляются дрожжевые консорциумы, состоящие из нескольких культур, способных к деградации различных красителей в течение 6-12 ч с эффективностью 90-100% благодаря синтезу ряда окислительно-восстановительных ферментов [4].

Большую проблему представляет накопление больших объемов органических отходов, в частности пищевых и сельского хозяйства, которые требуют рациональной и безопасной утилизации. Анаэробная конверсия таких отходов позволяет получать биогаз с высоким содержанием метана. Добавление дрожжей к анаэробному илу позволяет повысить эффективность производства биогаза и CH_4. Например, с помощью консорциума, состоящего из метаногенного ила и дрожжевых клеток рода *Pachysolen* была показана возможность высокоэффективной анаэробной конверсии глицерина в биогаз [5].

Особое внимание в настоящее время уделяется биосинтетическому получению различных композитных материалов на основе бактериальной целлюлозы (БЦ), находящих широкое применение в различных отраслях. Для придания необходимых свойств БЦ проводят ее модификацию, которую возможно осуществлять непосредственно в процессе совместного культивирования клеток-продуцентов

с другими микроорганизмами, что позволяет получать материалы с заданными свойствами [6]. Например, был исследован процесс получения БЦ путем со-культивирования клеток *Komagataeibacter xylinus* с различными штаммами дрожжей (*Kluyveromyces marxianus*, *Pichia fermentans*, *Pichia pastoris*, *Candida stellata*, *Candida kefyr*) [7]. Совместное культивирование с дрожжами (*Kluyveromyces* и *Pichia*) приводило к повышению синтеза БЦ в 1,7-2,0 раза. При этом БЦ, полученная при совместном культивировании с *P. pastoris*, была более пористой.

Также стоит отметить, что применение иммобилизованных форм дрожжей позволяет повысить эффективность процессов за счет создания высококонцентрированных популяций клеток, благодаря чему часть потребляемого субстрата не расходуется на накопление биомассы, а используется непосредственно для синтеза целевых продуктов. Кроме того, иммобилизованные клетки по сравнению с суспензионными, характеризуются более высокой толератностью к негативным факторам, а также возможностью многократного применения с сохранением высокой метаболической активности [8].

Таким образом, создание искусственных консорциумов с клетками дрожжей весьма перспективно и может быть применено для решения самых разных биокаталитических задач.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова (тема № 121041500039-8).

Список литературы

1. Karim A., Gerliani N., Aïder M. *Kluyveromyces marxianus*: An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology // International Journal of Food Microbiology.– 2020. – Vol. 333. – P. 108818.
2. Efremenko E., Stepanov N., Senko O.; Aslanli A.; Maslova O.; Lyagin I. Using fungi in artificial microbial consortia to solve bioremediation problems // Microorganisms. – 2024. – Vol. 12. – P. 470.
3. Mittermeier F., Bäumler M., Arulrajah P., García Lima J.D.J., Hauke S., Stock A., Weuster-Botz D. Artificial microbial consortia for bioproduction processes // Engineering in life sciences. – 2023. – Vol. 23. – P. e2100152.
4. Ali S.S., Al-Tohamy R., Koutra E., El-Naggar A.H., Kornaros M., Sun J. Valorizing lignin-like dyes and textile dyeing wastewater by a newly constructed lipid-producing and lignin modifying oleaginous yeast consortium valued for biodiesel and bioremediation // Journal of Hazardous Materials. – 2021. – Vol. 403, – P. 123575.
5. Stepanov N., Senko O., Aslanli, A., Maslova O., Efremenko E. Enhanced biogas production from glucose and glycerol by artificial consortia of anaerobic sludge with immobilized yeast. // Fermentation. – 2025, – Vol. 11. – P. 352.
6. Efremenko E., Stepanov N., Aslanli A., Maslova O., Chumachenko I., Senko O., Bhattacharya A. Changed characteristics of bacterial cellulose due to its *in situ* biosynthesis as a part of composite materials // Polysaccharides. – 2025. – Vol. 6. – P. 114.
7. Paronyan M., Saghatelyan L., Avetisyan S., Koloyan H., Kinosyan M., Bagiyan V., Hovhannisyan S., Akopian O., Hovsepyan A. Co-cultivation of *Komagataeibacter xylinus* MS2530 with various yeast strains: production and characterization of bacterial cellulose films. // Carbohydrate Polymer Technologies and Applications. – 2025, – Vol. 11. – P. 100840.
8. Stepanov N., Efremenko E. Immobilised cells of *Pachysolen tannophilus* yeast for ethanol production from crude glycerol // New Biotechnology. – 2017; – Vol. 34, – P. 54-58.

УДК 577.15.08

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К СОВМЕСТНОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ МУЛЬТИФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ ДЛЯ ПЕРЕРАБОТКИ РАСТИТЕЛЬНОЙ БИОМАССЫ

Сульман А.М., Гребенникова О.В., Матвеева В.Г.

Тверской государственный технический университет, 170026, Тверь, наб. А. Никитина, 22
alexsulman@mail.ru

Аннотация. В работе рассматриваются современные подходы к переработке лигноцеллюлозной биомассы (ЛЦБ) в биотопливо и химические вещества с добавленной стоимостью. Описана сложная композитная структура ЛЦБ, состоящая из целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина, которая выступает главным препятствием для эффективного одноферментного гидролиза. Для глубокой деполимеризации сырья обоснована необходимость применения мультиферментных систем, включающих целлюлазы, ксиланазы, лакказы и вспомогательные ферменты. Особое внимание уделено технологии ко-иммобилизации — совместному закреплению нескольких ферментов на едином носителе (альгинат натрия, магнитные наночастицы, обратимые растворимые полимеры, мезопористый диоксид кремния). Показано, что данный метод обеспечивает синергетический эффект за счет пространственной близости ферментов, повышает их структурную стабильность и позволяет многократно использовать биокатализаторы, что делает процесс получения биопродуктов второго поколения экологически чистым и экономически рентабельным.

Ключевые слова: Лигноцеллюлозная биомасса; мультиферментные системы; ко-иммобилизация; ферментативный гидролиз; биокатализатор; целлюлаза; биотопливо.

Лигноцеллюлозная биомасса является наиболее распространенным и возобновляемым ресурсом на Земле, представляя собой основу для «зеленой» химии и энергетики будущего. Переработка сельскохозяйственных, лесных и бытовых отходов позволяет получать широкий спектр биотоплива и ценных химических веществ, таких как биоэтанол, бутанол и молочная кислота. По сравнению с химическим гидролизом, ферментативный подход с использованием целлюлаз обеспечивает высокую специфичность, мягкие условия протекания реакций, экологическую безопасность и отсутствие побочных продуктов.

Главным препятствием для эффективной переработки лигноцеллюлозной биомассы является ее сложная композитная структура. Она состоит из целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина. Лигнин образует жесткую, гидрофобную матрицу, которая надежно защищает полисахариды от ферментативного и микробного воздействия. В связи с этим, использование только одного фермента недостаточно для эффективного разрушения этой сети. Кроме того, свободные ферменты отличаются высокой стоимостью, энергоемкостью производства, а также сложностью извлечения и повторного использования, что повышает общие эксплуатационные расходы [1-2].

Для решения вышеописанных проблем необходимо использование мультиферментных систем, которые обеспечивают глубокую конверсию сырья за счет синергетического действия различных ферментов: целлюлаз, ксиланаз, лакказ, пероксидаз и вспомогательных оксидаз. Чтобы преодолеть ограничения свободных ферментов, применяется технология иммобилизации, повышающая структурную жесткость белковых молекул и их стабильность. Наиболее передовым подходом является ко-иммобилизация нескольких ферментов на одном носителе. Данный метод обладает рядом ключевых преимуществ, таких как создание эффекта близости, при котором промежуточный продукт реакции не рассеивается, а мгновенно передается следующему ферменту в каскаде, обеспечивая высокую локальную концентрацию интермедиатов. Ко-иммобилизация ограничивает диффузию нестабильных интермедиатов во внешнюю среду и обеспечивает взаимную защиту ферментов от денатурации и деградации.

Также метод устраняет необходимость в отдельных этапах иммобилизации для каждого фермента и позволяет многократно использовать биокатализатор, легко отделяя его от реакционной среды [3-4].

Исследования демонстрируют высокую эффективность совместной иммобилизации ферментов на различных носителях. Например, ко-иммобилизация целлюлазы и β-глюкозидазы на альгинате натрия в оптимальном соотношении доказала синергетический эффект, при котором совместное разложение целлюлозы превосходит раздельное действие ферментов [5]. Использование магнитных наночастиц для трехферментной системы, состоящей из целлюлазы, пектиназы и ксиланазы, продемонстрировало улучшенную стабильность при изменении водородного показателя, сдвиг оптимальной температуры до 60 °C и сохранение более 90% активности на протяжении 4 рабочих циклов. Создание магнитно-комбинированных кросс-сшитых агрегатов позволило использовать биокатализатор до 12 циклов с сохранением активности пектиназы, ксиланазы и целлюлазы на уровне от 86,45% до 90,3%. Применение обратимого растворимого носителя Eudragit L-100 для ко-иммобилизации целлюлазы, глюкозооксидазы и каталазы позволило достичь конверсии целлюлозы из кукурузной соломы в глюконовую кислоту на уровне 61,41%. Этот ферментный комплекс сохранял 52,38% активности после 6 циклов переработки. Совместная иммобилизация β-глюкозидазы и целлюлазы на морщинистых мезопористых наночастицах диоксида кремния позволила сохранить 83% исходного выхода реакции после 9 циклов использования и обеспечила высокую температурную стабильность вплоть до 90 °C.

Технология создания мультиферментных ко-иммобилизованных систем значительно повышает эффективность процессов биоконверсии. Разработка таких систем позволяет использовать один носитель и один цикл регенерации для целой цепи трансформаций, минимизируя побочные эффекты и стабилизируя каскадные реакции. Дальнейшее развитие этих технологий сделает возможной одностадийную комплексную переработку лигноцеллюлозной биомассы, что радикально снизит себестоимость получения ценных химических веществ и биотоплива второго поколения.

Работа выполнена при финансовой поддержке фонда РНФ (грант 24-79-10042).

Список литературы

1. Grebennikova O. V., Sulman A. M., Tikhonov B. B., Molchanov V. P., Matveeva V. G. The use of immobilized cellulase in the processing of cellulose-containing waste. Mini review // ChemChemTech [Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.]. — 2025. — Vol. 68 (12). — P. 23−33.
2. Manyatshe A., Sibali L. L. A review on the recovery of cellulose, lignin, and hemicellulose biopolymers from the same source of lignocellulosic biomass-Methodology, characterization and applications // Journal of Water Process Engineering. — 2025. — Vol. 70. — 107037.
3. Mohamed E. H., Xuhai Z., Evanildo F. Jr., Magdy M. E., Fang L. Enzyme immobilization advances: a key to unlocking renewable bioenergy potential // Green Chem. — 2025. — Vol. 27. — 11289.
4. Xiao M., Liu Y. J., Bayer E. A., Kosugi A., Cui Q., Feng Y. Cellulosomal hemicellulases: Indispensable players for ensuring effective lignocellulose bioconversion // Green Carbon. — 2024. — Vol. 2 (1). — P. 57-69.
5. Xiaoxiao Y., Jianzhen L., Yan S., Yubing X., Yingjie S., Shanshan T., Sijia B., Liying L., Fei H., Qing H., Guang C. Co-immobilized multi-enzyme biocatalytic system on reversible and soluble carrier for saccharification of corn straw cellulose. — 2024. — Vol. 395. — 130325.

УДК 535.518; 57.083.3

ПОЛЯРИЗАЦИОННЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ ПЕРФТОРОКТАНОВОЙ КИСЛОТЫ

Сюе Шися[1], Мухаметова Л.И.[1], Еремин С.А.[1,2]

[1] Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
[2] ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет», г. Москва, РФ
xuesx@yandex.com

Аннотация. Разработан поляризационный флуоресцентный иммуноанализ перфтороктановой кислоты (ПФОК) с минимальной определяемой концентрацией порядка 1 мкг/мл. Для определения использовали моноклональные антитела, полученные на конъюгат ПФОК с бычим сывороточным альбумином и трейсер ПФОК с этилендиамином-изотиоционата флуоресцеина.

Ключевые слова: поляризационный флуоресцентный иммуноанализ, пер- и полифторалкильные вещества, анализ поверхностных вод

Актуальность. Перфтороктановая кислота (ПФОК) является известным представителем пер- и полифторалкильных веществ (ПФАС), широко используемый в промышленности и накапливающийся в окружающей среде [1]. Из-за опасности для здоровья её содержание в воде строго нормируется. Традиционный метод анализа (ВЭЖХ-МС/МС) высокоточен, но является дорогим, медленным и требует сложной пробоподготовки. Оптимальной альтернативой для массового скрининга выступает поляризационный флуоресцентный иммуноанализ (ПФИА) [2]. Его главные преимущества: гомогенный формат без разделения комплексов, получение результата за несколько минут, низкая стоимость и возможность использования портативных приборов [2-4].

Цель работы. Разработка и оптимизация гомогенного ПФИА для определения ПФОК в пробах природной воды с использованием новых флуоресцентных трейсеров и антител, а также оценка его аналитических характеристик.

Материалы и методы. В работе использовали ПФОК, перфторпропионовую (ПФПнК), перфторнонановую (ПФНК) кислоты. Моноклональные антитела к ПФОК (МАт-ПФОК) получали иммунизацией мышей конъюгатом ПФОК с бычьим сывороточным альбумином (БСА) по стандартному протоколу гибридомной технологии [1]. Поликлональные антитела (Ат-ПФО-3) были получены в предыдущих исследованиях. Для синтеза флуоресцентных трейсеров активированную форму ПФОК конъюгировали с тремя разными аминосодержащими флуорофорами: этилендиамин-флуоресцеином (ЭДФ), 5-карбоксифлуоресцеином (ФАМ5) и 6-карбоксифлуоресцеином (ФАМ6). Полученные конъюгаты (ПФОК-ЭДФ, ПФОК-ФАМ5, ПФОК-ФАМ6) очищали тонкослойной хроматографией в системе метанол: хлороформ (1:4 об./об.). Измерение поляризации флуоресценции выполняли на портативном флуориметре Sentry-200 ($\lambda_{возб}$ = 485 нм, $\lambda_{эм}$ = 535 нм). Все измерения проводили в боратном буфере (pH 8.5). Для построения калибровочных кривых использовали стандартные растворы ПФОК в концентрационном диапазоне от 0.1 до 500 мкг/мл. К фиксированному количеству антител (подобранное рабочее разведение) добавляли трейсер (конечная концентрация ~2.5 нМ) и анализируемый раствор, инкубировали в течение 15 минут и измеряли сигнал ПФ.

Результаты. На первом этапе была проведена оценка связывающей способности трёх синтезированных трейсеров с моноклональными (МАт-ПФОК) и поликлональными (Ат-ПФО-3) антителами [3]. Наибольший прирост сигнала поляризации (ΔмП) после связывания с антителами продемонстрировал трейсер ПФОК-ЭДФ при использовании МАт-ПФОК: ΔмП составил 80 мП (с 30 до 110 мП) при оптимальном разведении антител 1:800. Трейсеры на основе ФАМ5 и ФАМ6 давали значительно меньший специфический сигнал (ΔмП не более 30 мП) и были исключены из дальнейшей работы. Причина, вероятно, в различной длине линкера и гидрофобности: ЭДФ содержит этилендиаминовый спейсер, который обеспечивает лучшее пространственное расположение флуорофора для взаимодействия

с паратопом антитела, в то время как прямое присоединение карбоксифлуоресцеина через амидную связь стерически экранировало детектируемую группу. Поликлональные антитела Ат-ПФО-3 показали более высокий ПФ сигнал, но низкую конкурентную способность (LOD> 50 мкг/мл), поэтому финальная пара иммунореагентов – трейсер ПФОК-ЭДФ и моноклональные антитела МАт-ПФОК.

Оптимизация времени инкубации показала, что равновесное связывание достигается уже через 10 минут, и последующее увеличение времени до 60 минут не приводит к значимому изменению сигнала. Для обеспечения воспроизводимости выбрано время инкубации 15 минут. Построена калибровочная кривая в полулогарифмических координатах (концентрация ПФОК – ПФ). Предел обнаружения (LOD) составил 0.7 мкг/мл. Полумаксимальная ингибирующая концентрация (IC50) – 6 мкг/мл. Рабочий диапазон – от 2 до 20 мкг/мл. Изучение перекрестной реактивности (CR) проводили с двумя структурно близкими перфторированными кислотами – перфторпропионовой (С3) и перфторнонановой (С9). Анализ показал, что CR для ПФПнК составляет менее 0.01 %, что объясняется короткой фторированной цепочкой, не обеспечивающей достаточных гидрофобных и электростатических взаимодействий с антителом. Для ПФНК (С9) CR также была низкой – около 10 %, что свидетельствует о высокой специфичности моноклональных антител к ПФОК (С8). Предположительно, эпитоп включает в себя анионную карбоксильную группу и перфторированный фрагмент из 7–8 атомов углерода. Такая специфичность является важным преимуществом, поскольку в реальных природных водах часто присутствуют смеси различных ПФАС.

Валидация метода проведена на модельных образцах речной воды (предварительно проверенной на отсутствие ПФОК методом ВЭЖХ-МС/МС). Образцы воды были допированы ПФОК на уровнях 8, 10 и 30 мкг/мл. Анализ выполняли без сложной пробоподготовки: образец центрифугировали при 5000 g в течение 5 минут для удаления взвешенных частиц и измеряли содержание ПФАС методом ПФИА. Степень извлечения составила от 106 до 112 %, что соответствует приемлемым критериям для скрининговых иммунохимических методов. Однако следует отметить, что разработанный метод не достигает сверхнизких пределов обнаружения (наномолярных), характерных для ВЭЖХ-МС/МС, но его чувствительность (0.7 мкг/мл ≈ 1.7 мкМ) достаточна для выявления высоких уровней загрязнения, например, при авариях, сбросах промышленных сточных вод или в зонах экологического бедствия.

Обсуждение. Сравнение разработанного ПФИА с литературными данными показывает, что использование моноклональных антител позволило достичь более высокой специфичности по сравнению с поликлональными антисыворотками. В то же время чувствительность является компромиссной: известны конкурентные ИФА-методы для ПФОК с пределом обнаружения до 0.05–0.1 мкг/мл, но они требуют многостадийного анализа и времени 1–2 часа. ПФИА выигрывает в простоте и быстроте. Для повышения чувствительности в будущем можно рассмотреть использование трейсера с более длинным и гибким линкером или применение антител с более высокой авидностью. Тем не менее, рабочий диапазон 2–20 мкг/мл перекрывает уровни ПФОК, которые могут встречаться в промышленных сточных водах (сотни мкг/л), пожарных тренировочных полигонах (тысячи мкг/л), а также в некоторых природных водоёмах вблизи химических производств.

Выводы. Разработан гомогенный ПФИА для специфического определения ПФОК со временем анализа 15 минут. Выбрана оптимальная пара иммунореагентов: МАт-ПФОК и трейсер ПФОК-ЭДФ. Аналитические характеристики ПФИА: LOD = 0.7 мкг/мл, IC50 = 6 мкг/мл, рабочий диапазон 2–20 мкг/мл, что достаточно для выявления значительных загрязнений воды ПФОК. Метод высокоспецифичен – перекрестная реактивность с перфторпропионовой и перфторнонановой кислотами не превышает 10 %. Разработанный ПФИА успешно применён для анализа модельных образцов природной воды (извлечение 106–112 %) и может быть рекомендован для скринингового мониторинга объектов окружающей среды, особенно в условиях неотложного контроля и при ограниченном лабораторном оснащении.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 25-43-02081) – «Разработка простых и быстрых способов обнаружения пер- и полифторалкильных соединений в образцах пищевых продуктов на основе нового распознающего материала».

Список литературы
1. H. Wu, L. Guo, X. Xu, J. Zou, H. Kuang, C. Xu, X. Wu. On-site rapid detection of **perfluorooctanoic acid** by visual immunochromatographic strip biosensor in domestic water and real human samples // Environmental Pollution. 348, 123776 (2024). https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123776
2. Мухаметова Л.И., Еремин С.А. Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ для определения и скрининга лекарственных веществ // Трансляционная медицина. 2023; 10(5):412-422. DOI: 10.18705/2311-4495-2023-10-5-412-422. EDN:DAAWNH
3. Арутюнян Д.А., Мухаметова Л. И., Шанин И. А., Кондаков С. Э., Еремин С. А. Применение поляризационного флуоресцентного иммуноанализа для определения флуниксина в молоке // Журнал Аналитической химии, 80(6), 592-603 (2025). DOI: 10.31857/S0044450225060061
4. L.I. Mukhametova, M.K. Kolokolova, I.A. Shevchenko, B.S. Tupertsev, A.V. Zherdev, C. Xu, S. A. Eremin. Fluorescence Polarization Immunoassay for Rapid, Sensitive Detection of the Herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in Juice and Water Samples. Biosensors, 15(1), 32 (2025). https://doi.org/10.3390/bios15010032

УДК 543.544-414.6

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДВУХ ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ПОДХОДОВ К СИНТЕЗУ АФФИННЫХ СОРБЕНТОВ ДЛЯ ОЧИСТКИ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА G

Телепенина К.П.[1], Баскова М.В.[1,2], Комякова А.М.[1,2], Терешин М.Н.[1], Берзина М.Я.[1], Мелихова Т.Д.[1], Степаненко В.Н.[1,2]

[1] ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), г. Москва, РФ
[2] ФГБОУ ВО МИРЭА – Российский технологический университет, г. Москва, РФ
telepenina_kristina@mail.ru

Аннотация. В исследовании представлен химико-ферментативный способ получения аффинных сорбентов на основе рекомбинантного аналога стафилококкового белка А, предварительно ферментативно модифицированного алкином и иммобилизованного на активированные матрицы. Эффективность полученных аффинных смол оценивали по показателю динамической связывающей способности. В результате была выявлена зависимость емкости полученных сорбентов от типа химической реакции и природы полимерной матрицы.

Ключевые слова: сортаза А (SrtA), белок А (SpA), аффинный сорбент, клик-химия (CuAAC), реакция Глейзер-Хея.

Аффинный сорбент с лигандом, представляющим собой рекомбинантный аналог белка А *Staphylococcus aureus* (SpA), в настоящее время является эффективным инструментом для хроматографической очистки моноклональных антител (мАТ) [1]. Получение подобных смол предполагает иммобилизацию белков на поверхности полимерной матрицы посредством различных методов. Наиболее распространенным, на сегодняшний день, способом является химическое лигирование, которое обладает рядом недостатков, связанных со случайной неспецифической ориентацией лигандов на поверхности, в результате которой возможно снижение функциональной активности белков из-за конформационных нарушений [2]. Другим подходом является ферментативная иммобилизация, обеспечивающая направленную ориентацию белков [3]. Нами ранее уже был применен данный метод биоконъюгации аналогов SpA на полимерной матрице с использованием высокоспецифичного фермента сортаза А (SrtA, *Staphylococcus aureus*) [4,5]. SrtA относится к классу транспептидаз (EC 3.4.22.70) и распознает консервативный мотив LPXTG (Leu-Pro-Any amino acid-Thr-Gly) в белке-доноре, при этом нуклеофильно атакует пептидную связь между треонином (Thr) и глицином (Gly), образуя новую амидную связь между карбоксильной группой Thr и аминогруппой олигоглицинового акцептора. Согласно литературным данным, введение такого рода линкера способствует оптимальной пространственной ориентации функциональной группы для взаимодействия с ферментом [6,7].

В данной работе описывается химико-ферментативная иммобилизация рекомбинантного аналога белка А, предварительно модифицированного алкином, на полимерные матрицы. Биоконъюгацию осуществляли с использованием двух типов реакций: CuAAC (медь-катализируемое азид-алкиновое циклоприсоединение) и реакции Глейзера-Хея (медь-катализируемое алкин-алкиновое соединение). Иммобилизация проводилась на полиметакрилатную матрицу, предварительно модифицированную азидными группами (для CuAAC) и агарозную матрицу, активированную алкиновыми группами (для реакции Глейзера-Хея). В качестве лиганда был использован белок, в состав которого входили 2 домена B SpA (BDPA2), с целью повышения связывающей способности получаемых аффинных сорбентов [8]. Необходимым условием лигирования, опосредованного CuAAC и реакцией Глейзер-Хея, является наличие алкиновых функциональных групп в структуре белка. Поскольку в нативной аминокислотной

последовательности белка А они отсутствуют, нами была проведена ферментативная модификация BDPA2 терминальным алкином. Для этого белок-донор, содержащий в своей структуре вышеупомянутый сайт узнавания LPETG, вступал в реакцию транспептидации с сортазой А и пропаргиламином, который выполнял функцию акцепторного пептида. В результате нами был получен модифицированный лиганд с выходом 70-80%, благодаря чему появилась возможность опустить этап синтеза сложных пептидных фрагментов, значительно упростив процедуру сайт-специфичного введения алкиновых групп в белки [9].

Синтезированные аффинные сорбенты оценивались по показателю динамической связывающей способности (DBC_{10}) с использованием иммуноглобулинов класса G1 бевацизумаб (Avastin®, F Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland) при времени удерживания 6 минут (RT=6 минут) и 10% проскоке антител. DBC_{10} полиметакрилатной смолы, полученной в результате классической реакции клик-химии (CuAAC), составила 37,5 мг/мл. В случае агарозного сорбента, полученного реакцией Глейзер-Хея, DBC_{10} оказалась ниже ожидаемых значений и составила 27 мг/мл. Это может свидетельствовать о том, что данная реакция требует дальнейшей оптимизации условий. Также стоит отметить, что использование разных типов матриц (полиметакрилатной и агарозной) могло внести свой вклад в полученные результаты.

Таким образом, нами был разработан химико-ферментативный подход к синтезу аффинных сорбентов на основе рекомбинантного аналога белка А для очистки мАТ. Была успешно отработана методика ферментативной модификации белка алкиновыми группами при помощи фермента сортаза А с участием пропаргиламина. По результатам оценки полученных образцов аффинных смол можно сделать вывод, что способ иммобилизации и природа полимерной матрицы могут оказывать влияние на функциональные характеристики аффинных сорбентов.

Список литературы

1. Ayyar B. V. et al. Affinity chromatography as a tool for antibody purification // Methods. – 2012. – Vol. 56. – No. 2. – P. 116-129.
2. Steen Redeker E. et al. Protein engineering for directed immobilization // Bioconjugate chemistry. – 2013. – Vol. 24. – No. 11. – P. 1761-1777.
3. Robescu M. S., Bavaro T. A comprehensive guide to enzyme immobilization: All you need to know // Molecules. – 2025. – Vol. 30. – No. 4. – P. 939.
4. Tereshin M. N. et al. Biocatalytic Method for Producing an Affinity Resin for the Isolation of Immunoglobulins // Biomolecules. – 2024. – Vol. 14. – No. 7. – P. 849.
5. Tereshin M. N. et al. Affinity Resins for the Isolation of Immunoglobulins G Obtained Using Biocatalytic Technology // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Vol. 25. – No. 3. – P. 1367.
6. Pishesha N., Ingram J. R., Ploegh H. L. // Sortase A: a model for transpeptidation and its biological applications // Annual review of cell and developmental biology. – 2018. – Vol. 34. – No. 1. – P. 163-188.
7. Rodrigues R.C., Virgen-Ortiz J.J., Santos J.C.S, Berenguer-Murcia A., Alcantara A.R., Barbosa O., Ortiz C., Fernandez-Lafuente R. // Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. Biotechnology Advances. – 2019. – Vol. 37. – No. 5. – P. 746-770.
8. Zhang, X.; Duan, Y.; Zeng, X. // Improved Performance of Recombinant Protein A Immobilized on Agarose Beads by Site-Specific Conjugation // ACS Omega. – 2017. – Vol. 2. – P. 1731–1737.
9. Мелихова Т.Д., Степаненко В.Н. и др. Способ сайт-специфического введения алкиновых групп в белки с использованием фермента сортаза А и пропаргиламина в качестве акцепторного пептида для последующей конъюгации с азид- и алкин-содержащими соединениями. Заявка на изобретение. RU 2025 133 114. 26 ноября 2025.

УДК 615.457

НАНОЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И АЛЬГИНАТА НАТРИЯ ДЛЯ ДОСТАВКИ МЕЛАТОНИНА В ТКАНИ ГЛАЗА

Тихомирова В.Е., Попова Е.В., Кост О.А.

Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
tikhomirovave@my.msu.ru

Аннотация. Представлена разработка системы доставки малорастворимого в воде мелатонина на основе мукоадгезивных биополимеров: хитозана и альгината натрия. Эффективность включения мелатонина составила около 16%. Профиль высвобождения в физрастворе характеризовался первоначальным быстрым выходом активного вещества, 50% за 5 мин, с последующим медленным выходом мелатонина. Предложенная лекарственная форма перспективна для комплексной терапии глаукомы.

Ключевые слова: глаукома, мелатонин, хитозан, альгинат натрия.

Глаукома входит в число главных причин необратимого ухудшения или потери зрения в мире. Данное заболевание характеризуется постепенной гибелью ганглиозных клеток сетчатки и поражением зрительного нерва [1]. Существующие методы лечения глаукомы в основном направлены на снижение внутриглазного давления (ВГД), оставляя без внимания нейродегенеративные механизмы, которые действуют независимо от давления.

В современной терапии глаукомы все больший приоритет отдается бесконсервантным формам глазных капель, включая комбинированные препараты с двумя действующими веществами. Наряду со снижением ВГД врачи все чаще включают в схему лечения нейропротекторы для защиты зрительного нерва [2]. В этом контексте особый интерес представляет мелатонин: он обеспечивает комплексный эффект, не только регулируя уровень ВГД через отток и секрецию жидкости, но и выступая в роли мощного антиоксиданта и нейропротектора [3].

Основными препятствиями для доставки мелатонина в ткани глаза являются его низкая растворимость в воде и светочувствительность. Включение мелатонина в наночастицы позволит не только преодолеть барьеры глаза и обеспечить постепенное высвобождение активного препарата, но и сохранить его антиокислительную активность.

В настоящем исследовании предложен метод инкапсуляции мелатонина в частицы на основе мукоадгезивных биополимеров — альгината натрия (200–400 кДа) и хитозана (50–190 кДа). Путем варьирования условий синтеза (соотношения компонентов, концентрации хитозана, альгината натрия и содержания ионов кальция) были получены частицы с минимальным размером (Рисунок 1).

Таким образом были выбраны: концентрация хитозана 0,5 мг/мл, альгината натрия 0,04 мг/мл и 6-9 мМ хлорида кальция, pH 5,0. Сформированные частицы обладали средним гидродинамическим диаметром 300-400 нм и электрокинетическим потенциалом +23±2 мВ, что обеспечило высокую седиментационную устойчивость коллоидной системы в течение 1,5 месяцев. Инкапсуляция мелатонина производилась в процессе формирования альгинатного ядра в присутствии 5% ДМСО, что позволило достичь эффективности включения 16±4%. При этом включение мелатонина увеличило размер частиц практически вдвое до 860±50 нм и значительно снизило их электрокинетический потенциал до 13±3 мВ, что свидетельствует о частичном экранировании заряженных групп хитозана молекулами мелатонина.

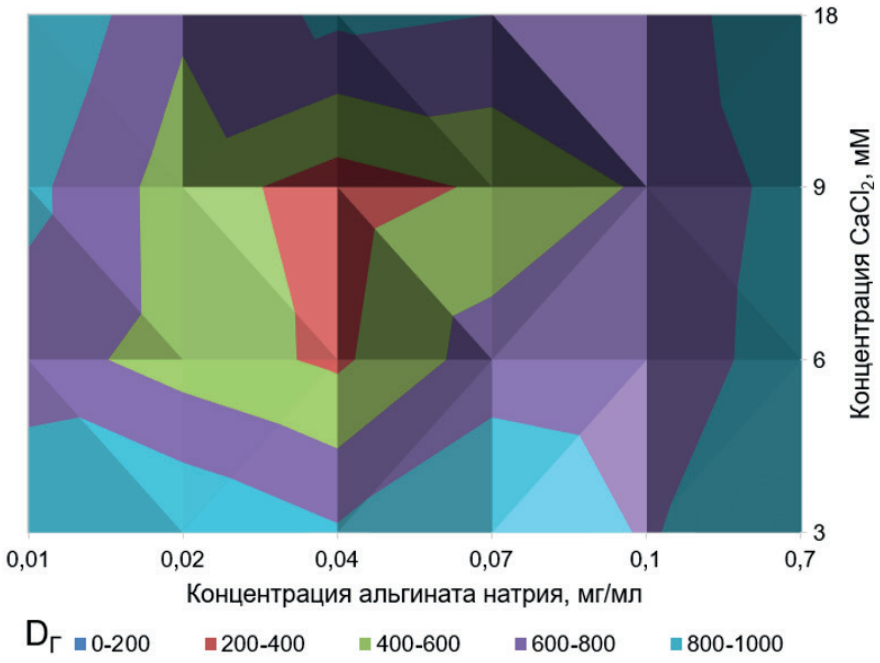


Рисунок 1. Контурная диаграмма поверхности, отражающая изменения гидродинамического диаметра синтезируемых частиц в зависимости от концентрации альгината натрия и хлорида кальция. Фиксированная концентрация хитозана 0,5 мг/мл.

Кинетику высвобождения мелатонина из хитозан-альгинатных частиц исследовали в физрастворе, содержащем 5% ДМСО для поддержания растворимости включенного вещества (Рисунок 2). Процесс высвобождения характеризовался выраженным эффектом «начального выброса», в течение первых 5 минут инкубации в водную среду перешло 50% препарата. Через 2 часа высвобождение достигало 80%, а полная десорбция активного вещества наблюдалась только после смены элюирующего раствора.

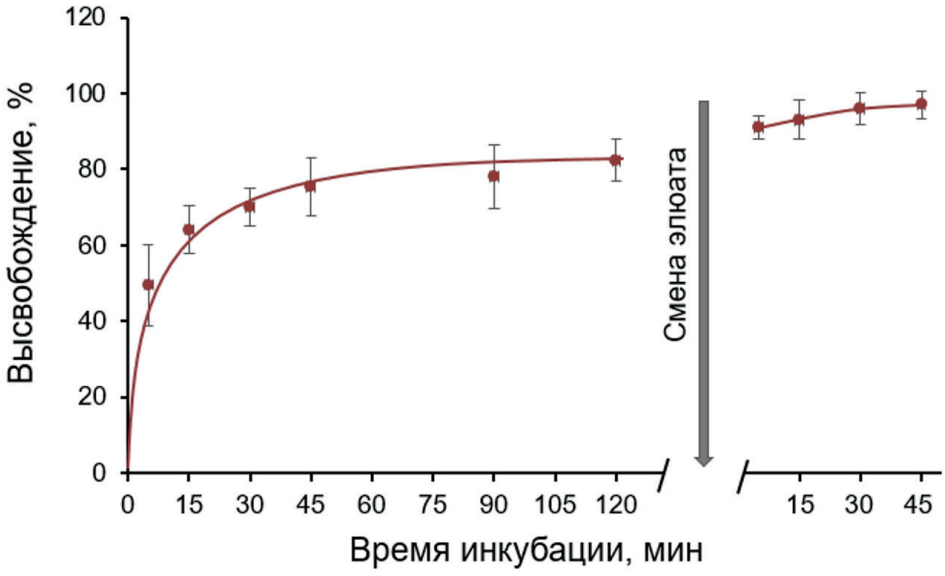


Рисунок 2. Высвобождение мелатонина из частиц на основе хитозана и альгината натрия в 0,15 М NaCl, 5% ДМСО, pH 7,5.

Предложенная система доставки на основе хитозана и альгината натрия представляет интерес для терапии глаукомы. Использование мукоадгезивных биополимеров позволит увеличить время контакта препарата с роговицей, компенсируя быстрый выход действующего вещества. Благодаря сочетанию гипотензивного и нейропротекторного эффектов мелатонина, данная форма может стать базой для офтальмологических средств нового поколения, обеспечивающих комплексную защиту зрительного нерва.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова, регистрационный номер 121041500039-8.

Список литературы

1. Lim S.H., Laroche D. New Insights into Glaucoma-An Editorial Review on Broadening Risk Assessment, Refining Surgical Strategy, and Standardizing Clinical Practice // J. Clin. Med. – 2026. – Vol. 15. – No. 3. – Art. 1213.
2. Garcia-Medina J.J., Rubio-Velazquez E., Lopez-Bernal M.D., Cobo-Martinez A., Zanon-Moreno V., Pinazo-Duran M.D., del-Rio-Vellosillo M. Glaucoma and Antioxidants: Review and Update // Antioxidants. – 2020. – Vol. 9. – No. 11. – Art. 1031.
3. Hou X, Pan Y. Melatonin in Glaucoma: Integrative Mechanisms of Intraocular Pressure Control and Neuroprotection // Biomedicines. – 2025. – Vol. 13. – No. 5. – Art. 1213.

УДК 577:152

КОМБИНИРОВАННЫЕ МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ И МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Хренова М.Г., Поляков И.В.

Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
khrenovamg@my.msu.ru

Аннотация. В докладе обсуждается совместное применение методов искусственного интеллекта и молекулярного моделирования для анализа механизмов ферментативных реакций. Приведены примеры применения нейросетевых моделей для прогнозирования профилей субстратной специфичности гидролаз. Показано как модели машинного обучения позволяют детализировать механизмы ферментативных реакций из анализа динамического поведения фермент-субстратного комплекса.

Ключевые слова: механизмы ферментативных реакций, методы ИИ, молекулярное моделирование.

В докладе будут обсуждаться примеры и реализации совместного применения методов искусственного интеллекта и молекулярного моделирования для решения задач, связанных с определением молекулярных механизмов функционирования ферментов. В последние несколько лет произошел серьезный прорыв в развитии методов молекулярного моделирования, связанный с разработкой программных кодов для графических ускорителей. Это дает возможность быстро и эффективно проводить расчёты методами квантовой химии, в том числе гибридными методами квантовой механики/молекулярной механики (КМ/ММ). Стало возможным рассчитывать молекулярно-динамические траектории с КМ/ММ-потенциалами, что приводит к получению большого массива данных об электронной структуре, свойствах систем и их эволюции во времени. Применение методов искусственного интеллекта существенно расширяет возможности анализа этих данных и извлечения дополнительной информации, в том числе о каталитических свойствах ферментативных систем. Так, нейросетевые подходы для анализа карт лапласиана электронной плотности реакционной области дают возможность определить профиль субстратной специфичности ферментов класса гидролаз. Важной особенностью многомерного анализа данных методами ИИ является получение дополнительных взаимосвязей между свойствами системы, что, в том числе, позволяет более детально определить механизмы реакций. Это будет продемонстрировано на примерах ферментативных реакций разрыва P-O связи.

УДК

ФЕРМЕНТ РЕПАРАЦИИ ТИРОЗИЛ-ДНК-ФОСФОДИЭСТЕРАЗА 1 КАК ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ ПРОТИВОРАКОВОЙ ТЕРАПИИ

Чепанова А.А.[1], **Чернышова И.А.**[1], **Захаренко А.Л.**[1], **Дырхеева Н.С.**[1], **Дреничев М.С.**[2], **Лузина О.А.**[3], **Салахутдинов Н.Ф.**[3], **Лаврик О.И.**[1]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, РФ*
[2] *Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгарда РАН, г. Москва, РФ*
[3] *Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, г. Новосибирск, РФ*
arinachepanova@mail.ru

Аннотация. В докладе представлена информация об исследовании ингибиторов тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 (TDP1) на клеточных линиях с нокаутом по гену *TDP1*, в монорежиме и в комбинации с топотеканом. Показано, что усиление действия топотекана в присутствии ингибиторов TDP1 наблюдалось только для клеточной линии дикого типа и полностью отсутствовало для клеток нокаутных по гену *TDP1*. Такой результат может говорить о том, что синергетическое действие топотекана совместно с ингибиторами TDP1 обусловлено именно подавлением активности TDP1 выбранными ингибиторами.

Ключевые слова: система репарации ДНК, тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1, топоизомераза 1, противоопухолевые препараты, ингибиторы.

Фундаментальные механизмы восстановления повреждений ДНК имеют ключевое значение для поддержания геномной стабильности и определения клеточного ответа на генотоксический стресс, в том числе возникающий при противоопухолевой терапии. Тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (TDP1) — фермент репарации ДНК, обеспечивающий удаление ковалентных аддуктов топоизомеразы I (TOP1cc), возникающих под действием эндогенных повреждений и противоопухолевых препаратов камптотецинового ряда [1, 2]. Благодаря способности гидролизовать с 3›-конца ДНК различные аддукты, TDP1 снижает эффективность терапии ингибиторами TOP1 и рассматривается как перспективная мишень для разработки сенсибилизирующих противоопухолевых препаратов [3, 4, 5]. Нашим коллективом выявлен ряд соединений, эффективно подавляющих активность TDP1 *in vitro*, сенсибилизирующих цитотоксическое действие топотекана *in cellulo* и противоопухолевое и антиметастатическое действие *in vivo* [6, 7].

Данная работа направлена на углубленное изучение действия полученных ранее ингибиторов TDP1 на клеточных линиях с нокаутом по гену *TDP1* (*TDP1*-/-). Нами было изучено влияние соединений на выживаемость клеток A549 дикого типа (WT) и A549 с нокаутом по гену *TDP1* в монорежиме и в комбинации с топотеканом. Соединения оказались малотоксичными как для дикого типа клеток A549 WT, так и для клеток, нокаутных по гену *TDP1*. Далее было изучено влияние топотекана на выживаемость контрольной клеточной линии и выживаемость клонов TDP1-/-. Было показано, что нокаутные по гену *TDP1* раковые клеточные линии более чувствительны к топотекану по сравнению с клетками дикого типа. Изучение влияния ингибиторов TDP1 на цитотоксическое действие топотекана показало, что усиление действия топотекана в присутствии ингибиторов TDP1 наблюдалось только для клеточной линии дикого типа A549WT и полностью отсутствовало для клеток нокаутных по гену *TDP1*. Такой результат может говорить о том, что синергетическое действие топотекана совместно с ингибиторами TDP1 обусловлено именно подавлением активности TDP1 выбранными ингибиторами.

Для изучения генотоксичности ингибиторов TDP1 и их влияния на накопление повреждений ДНК под действием топотекана был использован метод электрофореза одной клетки или метод ДНК-комет. Анализ ДНК-комет подтвердил, что комбинированная обработка клеток A549 WT комбинацией

топотекана и ингибиторов TDP1 усиливает повреждения ДНК в зависимости от дозы ингибитора. При этом сами соединения в отсутствие топотекана не вызывали повреждений, что позволяет связать синергический эффект с подавлением активности TDP1 ее ингибиторами. Клеточная линия A549 с нокаутом по гену *TDP1* проявила повышенную чувствительность к топотекану в монотерапии, но добавление ингибиторов TDP1 не усиливало повреждения, независимо от их концентрации. Так же сами по себе соединения не вызывали повреждений. Это может косвенно подтверждать, что мишенью исследуемых ингибиторов действительно является TDP1, а отсутствие данного фермента аннулирует синергизм с топотеканом, полученный на клетках дикого типа.

Исследование ингибиторов TDP1 методом проточной цитометрии с окрашиванием клеток Аннексином V-FITC и пропидий йодидом (PI), полностью согласуются с результатами, полученными нами методом ДНК-комет и МТТ-тестом и подтверждают, что совместное использование ингибиторов TDP1 и топотекана может быть перспективной стратегией для повышения цитотоксичности в опухолевых клетках.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 25-74-30006).

Список литературы

1.Comeaux E. Q., Van Waardenburg R. C. A. M. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase I resolves both naturally and chemically induced DNA adducts and its potential as a therapeutic target // Drug Metabolism Reviews. 2014. Т. 46, № 4. С. 494–507.
2.Pommier Y. и др. Tyrosyl-DNA-phosphodiesterases (TDP1 and TDP2) // DNA Repair. Elsevier B.V., 2014. Т. 19. С. 114–129.
3. Beretta G. и др. Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 Targeting for Modulation of Camptothecin-Based Treatment // Current Medicinal Chemistry. Bentham Science Publishers Ltd., 2010. Т. 17, № 15. С. 1500–1508
4.Laev S. S., Salakhutdinov N. F., Lavrik O. I. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase inhibitors: Progress and potential // Bioorganic and Medicinal Chemistry. Elsevier Ltd, 2016. Т. 24, № 21. С. 5017–5027.
5.Zakharenko A., Dyrkheeva N., Lavrik O. Dual DNA topoisomerase 1 and tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibition for improved anticancer activity // Medicinal Research Reviews. John Wiley and Sons Inc., 2019. Т. 39, № 4. С. 1427–1441.
6.Kornienko T. E. и др. Enhancement of the Antitumor and Antimetastatic Effect of Topotecan and Normalization of Blood Counts in Mice with Lewis Carcinoma by Tdp1 Inhibitors—New Usnic Acid Derivatives // Int J Mol Sci. 2024. Т. 25, № 2. С. 1210.
7.Zakharenko A. L. и др. Natural Products and Their Derivatives as Inhibitors of the DNA Repair Enzyme Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 // Int J Mol Sci. 2023. Т. 24, № 6. С. 5781.

УДК 577.213.3

ФЕРМЕНТЫ В БЫСТРОЙ ПЦР-ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Черкашин Е.А., Замотаева Т.Л. Акимкин В.Г.

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва, РФ
e.cherkashin@cmd.su

Аннотация. В докладе рассматриваются ферменты для методов амплификации нуклеиновых кислот, обеспечивающие быструю диагностику инфекций. Предложен подход к оперативной разработке ПЦР-тестов для научных целей. Разработаны и внедрены в промышленное производство универсальные лиофилизированные смеси, содержащие все необходимые компоненты реакции. В сочетании с готовыми панелями олигонуклеотидов они позволяют быстро конструировать наборы для выявления различных патогенов под конкретные задачи.

Ключевые слова: инфекционные заболевания, ПЦР, разработка наборов, ферменты.

Современное развитие молекулярной диагностики инфекционных заболеваний направлено на сокращение времени анализа и упрощение процедуры детекции. Изотермические методы, в частности LAMP, позволяют использовать простое оборудование (флуориметр с функцией термостатирования) и сократить время реакции до 10–40 минут, однако их ключевым ограничением является невозможность эффективного мультиплексирования для одновременного выявления нескольких патогенов в одной пробе. В случае классической ПЦР, мультиплексирование позволяет дифференцировать до 5 патогенов в одной пробе, но проведение амплификации в условиях диагностической лаборатории занимает, как правило, не менее 90 минут. Для сокращения времени ПЦР требуется использовать «быстрые полимеразы», способные максимально быстро синтезировать ДНК без потери чувствительности метода.

В рамках решения данной задачи был создан фермент Taqполимераза с ДНК-аптамером (TaqA) и налажено его промышленное производство. Данный фермент позволяет сократить время проведения анализа в условиях клинико-диагностической лаборатории (амплификация без учета экстракции нуклеиновых кислот) до 50-60 минут, сохраняя при этом все ключевые преимущества метода ПЦР перед LAMP: возможность мультиплексирования, использование флуоресцентных олигонуклеотидных зондов различных типов, а также применение LNA-модифицированных олигонуклеотидов. Кроме того, благодаря высокой эффективности встраивания 2′дезоксиуридин-5′-трифосфата (dUTP), сохранена возможность применения технологии борьбы с контаминацией на основе фермента урацил-ДНК гликозилазы (UDG), что критически важно для предотвращения ложноположительных результатов, вызванных переносом ампликонов из предыдущих реакций. В рамках работы был предложен новый алгоритм тестирования биологических и клинических образцов на наличие ДНК или РНК возбудителя с использованием TaqA. Алгоритм подразумевает использование исследователем готовых наборов, содержащих сухие лиофилизированные смеси для ПЦР и ОТ-ПЦР, специализированные панели праймеров и контрольные образцы. Комбинируя панели олигонуклеотидов, исследователь в полевых условиях собирает по типу «модульного конструктора» необходимую методику для выявления патогена. Далее происходит добавление выделенной ДНК/РНК и проведение амплификации.

Лиофилизированный формат компонентов меняет логистику, снимая жесткие требования к соблюдению «холодовой цепи» на всех этапах транспортировки и хранения. Это позволяет доставлять готовые реакционные смеси в труднодоступные регионы или зоны эпизоотий без использования специализированного холодильного оборудования. Благодаря стабильности сухих смесей исследователь получает возможность оперативно конструировать и валидировать необходимую диагностическую методику непосредственно в полевых условиях или в мобильных лабораториях. Принцип модульного комбинирования различных панелей олигонуклеотидов с универсальными мастер-миксами позволяет быстро адаптировать протокол анализа под выявление РНК или ДНК конкретных патогенов. Такой

подход существенно снижает временные затраты на подготовку и проведение тестирования: отсутствие необходимости в многократном размораживании и точном дозировании отдельных компонентов минимизирует риск преаналитических ошибок. Высокая процессивность и скорость работы фермента TaqA в сочетании с сокращением ручных манипуляций обеспечивают значительное увеличение пропускной способности лабораторий, позволяя обрабатывать большой объем образцов в максимально сжатые сроки. В конечном итоге внедрение данной технологии делает возможным проведение масштабных скрининговых исследований высокоточным методом ПЦР в нестационарных условиях (в «полевых условиях»), обеспечивая надежность и чувствительность анализа.

Список литературы

1. Симанова, И. Н. Сравнительная характеристика термостабильных ДНК-полимераз для экспресс-диагностики инфекционных заболеваний / И. Н. Симанова, В. Л. Коннин // Клиническая лабораторная диагностика. – 2022. – Т. 67, № 2. – С. 88–94.
2. Stabilization of PCR reagents by lyophilization for sustainable point-of-care testing / S. Choi, M. Kim, J. Park [et al.] // Analytical Methods. – 2022. – Vol. 14, № 12. – P. 1245–1252.
3. Highly processive Taq DNA polymerase variants for rapid PCR / L. N. Krasnoperov, M. Belungu, J. Koelbl [et al.] // Analytical Biochemistry. – 2019. – Vol. 584. – Art. 113388.
4. Lyophilized pre-mixed reagents for rapid and sensitive detection of RNA viruses / Y. Zhang, L. Chen, J. Yang [et al.] // Journal of Virological Methods. – 2020. – Vol. 282. – Art. 113882.
5. Chen, Y. Ambient-temperature stable PCR master mixes: Lyophilization and beyond / Y. Chen, M. Liu, J. Sun // Biotechnology Journal. – 2023. – Vol. 18, № 2. – Art. 2200315.

УДК 376:15

ПОЛИМЕРАЗЫ С АКТИВНОСТЬЮ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ - УНИВЕРСАЛЬНЫЙ ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ОТ-ПЦР?

Черкашина А.С., Федакова Ю.В., Соловьева Е.Д., Михеева О.О., Голубева А.Г., Акимкин В.Г.

ФБУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия
cherkashina@pcr.ms

Аннотация: Работа посвящена получению универсальной полимеразы, обладающей активностью обратной транскриптазы, для целей детекции РНК-содержащих патогенов с использованием метода ОТ-ПЦР. В работе получен рекомбинантный фермент полимераза из бактерий *Thermus species* Z05. Разработан протокол получения и очистки фермента, а также охарактеризованы его свойства. Показано наличие активности обратной транскриптазы.

Ключевые слова: ДНК-полимераза Z05, рекомбинантный фермент, активность обратной транскриптазы, ПЦР-диагностика.

Получение универсального фермента для ОТ-ПЦР, который объединяет в себе функции полимеразы и обратной транскриптазы, является актуальной задачей. Такой подход упростит производство тест-систем и снизит издержки. Кроме того, применение универсального термостабильного фермента может позволить повысить температуру проведения этапа обратной транскрипции, что потенциально способно упростить задачу детекции РНК-матриц, склонных к образованию сложных вторичных структур. В данной работе *de novo* собран ген полимеразы Z05 (2528 п.о.). Полученная последовательность клонирована в вектор pET16b. Для сравнения свойств полученного фермента использовалась также ранее полученная в лаборатории полимераза Tth, Taq-полимераза и MMLV-ревертаза (Амплисенс, Россия). Полимераза Z05 экспрессирована в клетках *E. coli* и очищена методом аффинной хроматографии.

Свойства ферментов изучали в условиях ПЦР, варьируя состав буфера, время элонгации и длительность температурной инкубации. Проведено масштабное тестирование буферных систем с варьированием концентраций $(NH_4)_2SO_4$ (от 0 до 150 мМ) и KCl (от 0 до 150 мМ), $MgCl_2$ и $MnSO_4$. Установлено, что полимеразы Z05 и Tth сохраняют активность в широком диапазоне солености: до 50 мМ $(NH_4)_2SO_4$ и до 150 мМ KCl. В тестах на термостабильность Z05 сохраняла активность после инкубации при 95°C в течение 60 мин, а Tth — до 120 мин. Обе полимеразы продемонстрировали высокую скорость элонгации (5 сек/т.п.н.). На протяженных матрицах (5000 п.н.) наиболее эффективной оказалась полимераза Tth, скорость синтеза 15 сек/т.п.н. позволяет существенно сократить время реакции. Было показано, что полимераза Z05 проявляет активность обратной транскриптазы в условиях ОТ-ПЦР при наличии в буферном растворе ионов Mn^{2+} в конечной концентрации 1,5 mM, при этом присутствие ионов Mg^{2+} в реакции не обязательно. Показана возможность успешной детекции РНК-содержащих матриц на примере модельных и клинических образцов с использованием полимеразы Z05 без добавления ревертазы. Полученная рекомбинантная полимераза Z05 характеризуется высокой термостабильностью и скоростью элонгации. Каталитические характеристики, такие как высокая процессивность на длинных фрагментах, термостабильность, наличие ревертазной активности делают полимеразу Z05 перспективным инструментом для ПЦР-диагностики и различных молекулярно-биологических приложений.

УДК 616.71-006.3.04-08-036.8:616.15-074

ПОКАЗАТЕЛИ ВЫЖИВАЕМОСТИ БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ КОСТЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЕЙ ММП-2, 7 И ТИМП-1, 2 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Черномаз И.С.[1,2], **Прищеп П.Л.**[1], **Герштейн Е.С.**[1], **Кушлинский Н.Е.**[1]

[1] ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия
[2] ФГБУ «Центральная клиническая больница с поликлиникой» Управления делами Президента РФ
marvel2602@mail.ru

Аннотация. Представлены данные отдаленных результатов лечения больных злокачественными опухолями костей с учетом содержания матриксных металлопротеиназ (ММП-2, ММП-7) и их тканевых ингибиторов (ТИМП-1, ТИМП-2) в сыворотке крови для выявления возможной взаимосвязи с прогнозом заболевания. Исследования ММП и ТИМП проведены до начала специфического лечения иммуноферментным методом. Установлено, что определение уровня ММП и ТИМП в сыворотке крови может служить дополнительным фактором в оценке прогноза злокачественных опухолей костей.

Ключевые слова: злокачественные опухоли костей, прогноз, ММП, ТИМП.

Матриксные металлопротеиназы (ММП) - это ферменты, которые расщепляют белки и требуют присутствия активных атомов металла. Существует более 20 типов ММП, и они способствуют миграции клеток посредством протеолитической деградации внеклеточной основы. ММП имеют три консервативных домена: про-ММП, каталитический и гемопексиновый. Через эти домены ММП расщепляют матрикс и межклеточные барьеры. Следовательно, ММП расщепляют весь внеклеточный матрикс (ВКМ) [1]. ММП можно разделить на шесть групп в зависимости от субстратной специфичности и структурных различий: коллагеназы, желатиназы, стромелизины, матрилизины, металлоэластазы и мембранные ММП [2]. Благодаря разнообразию субстратов, ММП участвуют в различных гомеостатических функциях, таких как ремоделирование костной ткани, заживление ран и нескольких аспектах иммунитета. Однако ММП также участвуют в ряде патологических процессов, таких как прогрессирование опухолей, фиброз, хроническое воспаление, разрушение тканей и многое другое. Ключевым этапом в регуляции протеолиза ММП является превращение зимогена в активную протеиназу. Несколько проММП активируются в пути секреции фуриновыми пропротеинконвертазами, но для большинства механизмы активации в значительной степени неизвестны [3]. Наиболее важными физиологическими ингибиторами функции ММП являются тканевые ингибиторы металлопротеиназ (ТИМП). ТИМП блокируют катализ матриксных металлопротеиназ (ММП) и обладают дополнительными биологическими свойствами, включая регуляцию роста и дифференцировки клеток, апоптоз, ангиогенез и онкогенез [4].

Нами было установлено, что наиболее эффективным в оценке прогноза злокачественных опухолей костей является комплекс лабораторных показателей в сыворотке крови: ММП-2, ММП-7, ТИМП-1 и ТИМП-2. Мы обнаружили, что уровни исследованных ММП в сыворотке крови больных злокачественными опухолями костей, статистически значимо ассоциированы с показателями выживаемости.

При низких (менее 150 нг/мл) концентрациях ММП-2 в группе больных остеосаркомой (ОС) с I-II стадиями опухолевого процесса выявлено статистически значимое снижение общей выживаемости ($p=0,03$). У больных саркомой Юинга с исходными уровнями ММП-2 <150 нг/мл 3-летняя общая выживаемость снижалась на 72%, безрецидивная на 48%.

У больных остеосаркомой с содержанием ММП-7 ≥3,4 нг/мл в сыворотке крови показатели 5-летней общей выживаемости статистически значимо снижались на 34% (p=0,038), при хондросаркоме 5-летняя безрецидивная выживаемость снижалась на 66% (p<0,05).

По данным многофакторного анализа, нами было установлено, что пороговые уровни ТИМП-1 более 343 нг/мл и ТИМП-2 более 120 нг/мл можно рассматривать в качестве значимых и независимых факторов неблагоприятного прогноза общей выживаемости больных саркомами костей.

Таким образом, при ведении больных злокачественными опухолями костей определение белков ММП-2, ММП-7, ТИМП-1 и ТИМП-2 в сыворотке крови до начала лечения может служить дополнительным фактором в оценке прогноза заболевания. Все изучаемые белки в той или иной степени имеют прогностическое значение, при этом выявленные закономерности были различны для общей и безрецидивной выживаемости при разных вариантах гистологического строения опухолей костей.

Список литературы

1. Kim I.S., Yang W.S., Kim C.H. Physiological Properties, Functions, and Trends in the Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Inflammation-Mediated Human Diseases // Curr. Med. Chem. – 2023. – Vol. 30. – No. 18. – P. 2075-2112. doi: 10.2174/0929867329666220823112731.

2. Almutairi S., Kalloush H.M., Manoon N.A., Bardaweel S.K. Matrix Metalloproteinases Inhibitors in Cancer Treatment: An Updated Review (2013-2023) // Molecules. – 2023 Jul 21. – Vol. 28. – No. 14. – P. 5567. doi: 10.3390/molecules28145567.

3. Ra H.J., Parks W.C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity // Matrix Biol. – 2007 Oct. – Vol. 26. – No. 8. – P. 587-596. doi: 10.1016/j.matbio.2007.07.001.

4. *Герштейн Е.С.*, *Кушлинский Н.Е.* Клинические перспективы исследования ассоциированных с опухолью протеаз и их тканевых ингибиторов у онкологических больных // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2013. – № 5. – С. 16–27.

УДК 616.71-006.3.04-08-036.8:616.15-074

ПОКАЗАТЕЛИ ВЫЖИВАЕМОСТИ БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ КОСТЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЕЙ ММП-2, 7 И ТИМП-1, 2 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Черномаз И.С.[1,2], **Прищеп П.Л.**[1], **Герштейн Е.С.**[1], **Кушлинский Н.Е.**[1]

[1] ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

[2] ФГБУ «Центральная клиническая больница с поликлиникой» Управления делами Президента РФ

marvel2602@mail.ru

Аннотация. Представлены данные отдаленных результатов лечения больных злокачественными опухолями костей с учетом содержания матриксных металлопротеиназ (ММП-2, ММП-7) и их тканевых ингибиторов (ТИМП-1, ТИМП-2) в сыворотке крови для выявления возможной взаимосвязи с прогнозом заболевания. Исследования ММП и ТИМП проведены до начала специфического лечения иммуноферментным методом. Установлено, что определение уровня ММП и ТИМП в сыворотке крови может служить дополнительным фактором в оценке прогноза злокачественных опухолей костей.

Ключевые слова: злокачественные опухоли костей, прогноз, ММП, ТИМП.

Матриксные металлопротеиназы (ММП) - это ферменты, которые расщепляют белки и требуют присутствия активных атомов металла. Существует более 20 типов ММП, и они способствуют миграции клеток посредством протеолитической деградации внеклеточной основы. ММП имеют три консервативных домена: про-ММП, каталитический и гемопексиновый. Через эти домены ММП расщепляют матрикс и межклеточные барьеры. Следовательно, ММП расщепляют весь внеклеточный матрикс (ВКМ) [1]. ММП можно разделить на шесть групп в зависимости от субстратной специфичности и структурных различий: коллагеназы, желатиназы, стромелизины, матрилизины, металлоэластазы и мембранные ММП [2]. Благодаря разнообразию субстратов, ММП участвуют в различных гомеостатических функциях, таких как ремоделирование костной ткани, заживление ран и нескольких аспектах иммунитета. Однако ММП также участвуют в ряде патологических процессов, таких как прогрессирование опухолей, фиброз, хроническое воспаление, разрушение тканей и многое другое. Ключевым этапом в регуляции протеолиза ММП является превращение зимогена в активную протеиназу. Несколько проММП активируются в пути секреции фуриновыми пропротеинконвертазами, но для большинства механизмы активации в значительной степени неизвестны [3]. Наиболее важными физиологическими ингибиторами функции ММП являются тканевые ингибиторы металлопротеиназ (ТИМП). ТИМП блокируют катализ матриксных металлопротеиназ (ММП) и обладают дополнительными биологическими свойствами, включая регуляцию роста и дифференцировки клеток, апоптоз, ангиогенез и онкогенез [4].

Нами было проведено изучение содержания ММП-2, ММП-7, ТИМП-1 и ТИМП-2 в сыворотке крови больных первичными злокачественными новообразованиями костей до начала специфического лечения для выявления возможной взаимосвязи их уровней с прогнозом заболевания.

В исследование были включены 108 больных злокачественными опухолями костей (ЗОК) в возрасте от 5 до 76 лет. Среди них: остеосаркома (ОС) – 58 (45,3%), хондросаркома (ХС) – 29 (22,7%), саркома Юинга (СЮ) – 15 (11,7%), хордома – 3 (2,3%), недифференцированная плеоморфная саркома (НПС) кости – 3 (2,3%). У всех больных диагноз установлен впервые и подтвержден данными гистологического исследования опухоли. Пациенты находились под наблюдением от 1 до 144 месяцев. Из этой группы 19 пациентов умерли от основного заболевания в сроки от 19 до 133 мес от начала

лечения. Исследования проведены с помощью наборов реактивов для иммуноферментного анализа «R&D systems» (США).

Нами было установлено, что при низких (менее 150 нг/мл) концентрациях ММП-2 в группе больных остеосаркомой (ОС) с I-II стадиями опухолевого процесса статистически значимо снижались показатели общей выживаемости (p=0,03) (таблица 1).

Таблица 1. Показатели общей и безрецидивной выживаемости больных остеосаркомой в зависимости от уровня ММП-2 в сыворотке крови

Остеосаркома		N	Медиана срока жизни, мес.	Общая выживаемость (%)			
				1-летняя	3-летняя	5-летняя	10-летняя
Общая группа		57	125,7	92,1 ± 3,8	81,9 ± 5,9	76,5 ± 7,6	68,0 ± 10,5
ММП-2 нг/мл; P = 0,21	< 150	12	90,0	90,0 ± 9,5	70,0 ± 14,5	70,0 ± 14,56	58,3 ± 16,1
	≥ 150	45	Не достигнута	92,5 ± 4,1	85,2 ± 6,3	79,7 ± 10,5	75,7 ± 10,5
I–II стадия; P = 0,03	< 150	10	90,0	90,0 ± 9,5	70,0 ± 14,5	70,0 ± 14,56	58,3 ± 16,1
	≥ 150	35	Не достигнута	96,8 ± 3,2	96,8 ± 3,2	84,7 ± 11,7	84,7 ± 11,7

Таким образом, определение сывороточного белка ММП-2 у больных ОС начальных стадий до начала лечения может быть дополнительным фактором в оценке прогноза заболевания. В то же время в группе больных ОС с IVb стадией мы не отметили взаимосвязи между уровнем маркера ММП-2 в сыворотке крови и показателями общей выживаемости.

В группе больных СЮ также отмечена тенденция к различию общей выживаемости больных при значениях сывороточного ММП-2 ниже и выше 150 нг/мл (p=0,1). Так, 3-летняя общая выживаемость в этих группах равнялась соответственно 0% и 72,9±16,5%. Аналогичные результаты получены и для безрецидивной выживаемости (0% и 48,2±18,8 соответственно, p=0,2).

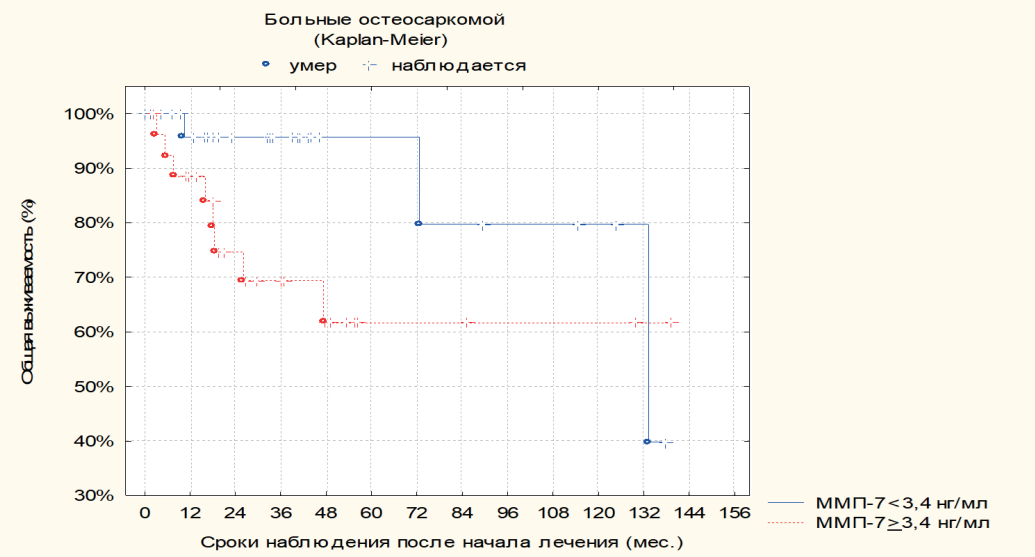


Рисунок 1. Показатели общей выживаемости больных остеосаркомой при концентрациях ММП-7 в сыворотке крови менее и более 3,4 нг/мл

При хондросаркоме кости обнаружены статистически значимые различия (p=0,044) в показателях безрецидивной выживаемости больных с учетом содержания ММП-7 (пороговое значение — 3,4 нг/мл) в сыворотке крови. Так, у 10 больных хондросаркомой кости и значениями ММП-7 < 3,4 нг/мл не отмечено прогрессирования заболевания на протяжении всего срока наблюдения, тогда как при уровнях ММП-7 ≥ 3,4 нг/мл (18 больных) 5-летняя безрецидивная выживаемость составила 33,7 ± 24,7% с медианой длительности ремиссии 43 месяца. Таким образом, определение уровня ММП-7 в сыворотке крови до лечения может служить дополнительным фактором прогноза при хондросаркоме кости.

У больных остеосаркомой с содержанием ММП-7 в крови < 3,4 нг/мл общая 5-летняя выживаемость составила 95,7 ± 4,3%, а при более высоких значениях маркера — 61,7 ± 11,4% (p=0,038) (рисунок 1).

В объединенной группе больных (саркома Юинга, хондросаркома, недифференцированная плеоморфная саркома кости, хордома) различия безрецидивной выживаемости при концентрациях сывороточного ТИМП-1 ниже и выше порогового уровня (343 нг/мл) статистически значимы: при уровне ТИМП-1 ≥ 343 нг/мл 3-летняя выживаемость снижалась на 27%, 5-летняя — на 60% (p=0,049).

По данным многофакторного анализа общей выживаемости больных саркомами костей повышенные концентрации ТИМП-2 (p=0,031) и ТИМП-1 (p=0,019) в сыворотке крови оказались сопоставимы по значимости с основным прогностическим фактором — стадией заболевания (p=0,011) и были более значимы, чем морфологический вариант строения опухоли. Следовательно, пороговые уровни: ТИМП-1 — более 343 нг/мл и ТИМП-2 — более 120 нг/мл — можно рассматривать в качестве значимых и независимых факторов неблагоприятного прогноза общей выживаемости больных саркомами костей.

Таким образом, при ведении больных злокачественными опухолями костей определение белков ММП-2, ММП-7, ТИМП-1 и ТИМП-2 в сыворотке крови до начала лечения может служить дополнительным фактором в оценке прогноза заболевания. Все изучаемые белки в той или иной степени имеют прогностическое значение, при этом выявленные закономерности были различны для общей и безрецидивной выживаемости при разных вариантах гистологического строения опухолей костей.

Список литературы

1. Kim I.S., Yang W.S., Kim C.H. Physiological Properties, Functions, and Trends in the Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Inflammation-Mediated Human Diseases // Curr. Med. Chem. – 2023. – Vol. 30. – No. 18. – P. 2075-2112. doi: 10.2174/0929867329666220823112731.

2. Almutairi S., Kalloush H.M., Manoon N.A., Bardaweel S.K. Matrix Metalloproteinases Inhibitors in Cancer Treatment: An Updated Review (2013-2023) // Molecules. – 2023 Jul 21. – Vol. 28. – No. 14. – P. 5567. doi: 10.3390/molecules28145567.

3. Ra H.J., Parks W.C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity // Matrix Biol. – 2007 Oct. – Vol. 26. – No. 8. – P. 587-596. doi: 10.1016/j.matbio.2007.07.001.

4. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Клинические перспективы исследования ассоциированных с опухолью протеаз и их тканевых ингибиторов у онкологических больных // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2013. – № 5. – С. 16–27.

УДК 543.424.2

ВЛИЯНИЕ ТИПА АНИОНА АГРЕГИРУЮЩЕГО АГЕНТА НА ДЕТЕКЦИЮ ПУРИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ МЕТОДОМ ГКР С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

Чиркина М.В.[1], Никольская Е.Д.[1], Сокол М.Б.[1], Моллаева М.Р.[1], Яббаров Н.Г.[1], Клименко М.А.[1], Гуляев И.А.[1], Евтушенко Е.Г.[1,2], Курочкин И.Н.[1]

[1] Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, г. Москва, РФ
[2] Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
chir.marg@mail.ru

Аннотация. Проблема антибиотикорезистентности требует разработки быстрых и надёжных методов оценки чувствительности бактерий к антибиотикам, поскольку существующие подходы обладают рядом ограничений. Перспективным инструментом является спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния (ГКР), позволяющая регистрировать спектры пуриновых метаболитов, выделяемых жизнеспособными бактериальными клетками, и использовать их для метаболического профилирования. В работе исследовано влияние типа агрегирующего агента на интенсивность сигнала ГКР пуриновых производных с целью оптимизации условий их детекции. Показано, что выбор аниона существенно влияет на адсорбцию аналитов на поверхности серебряных наночастиц, при этом замена хлорида на более индифферентные агенты (нитрат, ацетат) позволяет повысить чувствительность регистрации ряда соединений.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, гигантское комбинационное рассеяние, пуриновые производные, серебряные наночастицы, метаболическое профилирование пуринов.

Проблема устойчивости бактерий к антибиотикам является глобальной и быстро растущей угрозой системе здравоохранения [1]. Одной из причин антибиотикорезистентности является некорректное назначение антибиотиков. Существующие методы оценки чувствительности бактерий к антибиотикам обладают рядом недостатков, в частности длительное проведение анализа с использованием фенотипических методик, высокая вероятность ложноположительных результатов и сложность интерпретации результатов для генотипических подходов. В связи с этим разработка более быстрых, точных и простых методик оценки чувствительности бактерий к антибиотикам является актуальной и важной задачей [2].

Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) – оптический бесконтактный метод, широко применяемый при создании высокочувствительных и экспрессных аналитических методик. Увеличение интенсивности сигнала комбинационного рассеяния в этом методе достигается за счет использования наноразмерных металлических субстратов, обеспечивающих усиление локального электрического поля вблизи поверхности наноструктуры. Бактериальные препараты демонстрируют ярко выраженные и разнообразные спектры ГКР при использовании длинноволновых лазеров, например, 785 нм. В этих условиях источником сигнала являются шесть пуриновых производных — аденин, гуанин, аденозинмонофосфат, гипоксантин, ксантин и мочевая кислота — выделяемых бактериями во внеклеточную среду [3]. Таким образом, ГКР может служить основой метаболического профилирования пуринов в бактериях. Кроме того, было показано, что наличие сигнала пуринов характерно только для жизнеспособных клеток, что открывает возможности использования данного подхода для оценки антибиотикорезистентности.

Одним из часто используемых ГКР-субстратов являются коллоидные суспензии наночастиц благородных металлов. Для их эффективного применения требуется проведение управляемой агрегации

частиц, приводящей к формированию в зазорах между ними так называемых «горячих точек» — областей дополнительного многократного усиления электрического поля. Кроме того, взаимодействие плазмонов индивидуальных частиц в составе агрегата смещает максимум поглощения в длинноволновую область. При использовании электростатически стабилизированных наночастиц агрегирующим агентом может выступать любой электролит в концентрации выше порога коагуляции. Одним из часто используемых агентов является NaCl [4]. В то же время нередки случаи, когда действие электролита не ограничивается сжатием двойного электрического слоя [5]. Специфическая адсорбция ионов на поверхность металла изменяет ее заряд. Она может способствовать повышению поверхностной концентрации аналита за счет формирования ионных комплексов или, наоборот, уменьшать ее, если аналит связывается непосредственно с поверхностными атомами металла.

Целью данной работы является изучение влияния типа агрегирующего агента на концентрационные зависимости сигнала ГКР пуриновых производных, что позволяет оценить оптимальные условия для их регистрации в контексте метаболического профилирования пуринов и оценки антибиотикорезистентности. Для минимизации вариации спектров, вызванной протонированием аналитов, был выбран pH = 6,4, максимально удаленный от pKa всех исследуемых пуриновых производных. Для поддержания этого значения в качестве основы был использован 20 мМ натрий-фосфатный буфер. Спектры регистрировали с использованием спектрометра innoRam BWS445(B)-785S (BWTek; США) при длине волны возбуждения 785 нм и мощности на образце 135 мВт. В качестве ГКР-субстратов использовали серебряные наночастицы, полученные с помощью гидроксиламинового метода [6]. Результаты с использованием 0,5 М NaCl в качестве агрегирующего агента представлены на рисунке 1.

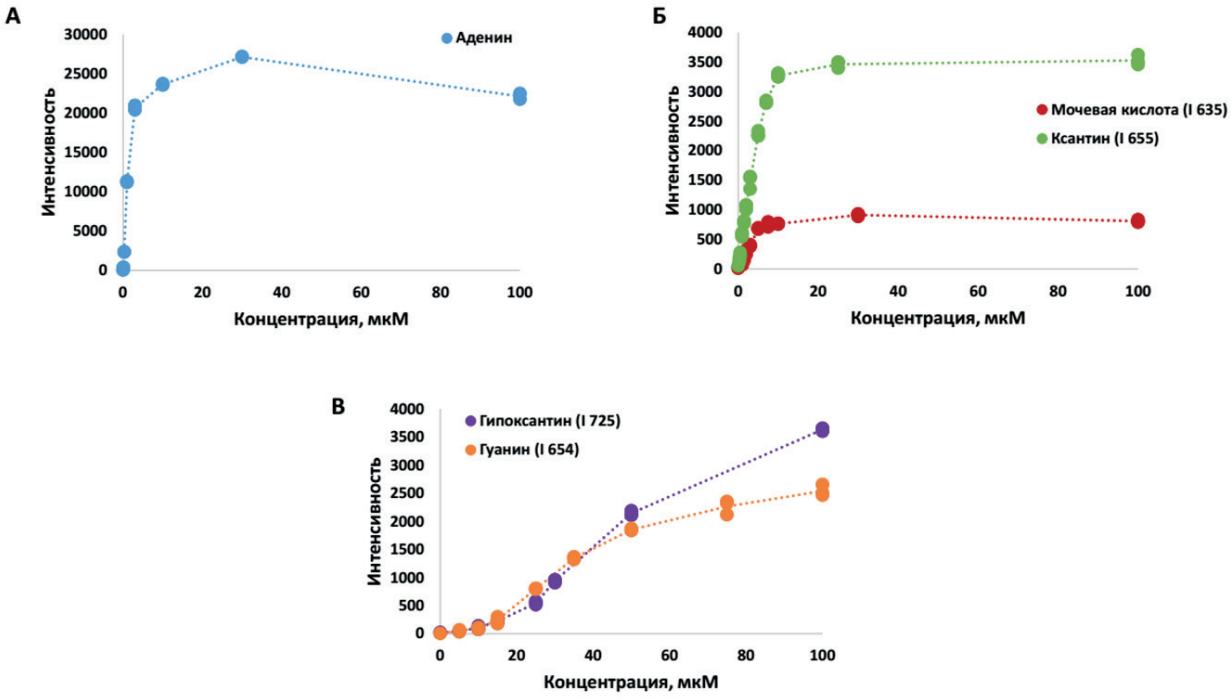


Рисунок 1. Концентрационные зависимости
А) аденина, Б) ксантина и мочевой кислоты, В) гипоксантина и гуанина. Агрегатор – 0.5 М NaCl.

В случае аденина, мочевой кислоты и ксантина наблюдается быстрый рост сигнала в диапазоне до 20 мкМ с выходом на плато вследствие исчерпания центров связывания на поверхности наночастиц. Для аденина при высоких концентрациях характерно небольшое снижение сигнала, что в совокупности с минорными изменениями формы спектров может свидетельствовать об изменении ориентации молекул при высоких степенях заполнения поверхности. Таким образом, для практически значимого диапазона низких концентраций аденина, ксантина и мочевой кислоты NaCl может рассматриваться как перспективный агрегирующий агент.

Для гипоксантина и гуанина наблюдается замедленное возрастание сигнала на участке начальных концентраций при использовании NaCl. Замена хлорида на ионы ацетата или нитрата, обладающие гораздо более низким сродством к поверхности серебра, приводит к резкому возрастанию интенсивности сигнала в области низких концентраций этих аналитов (рисунок 2).

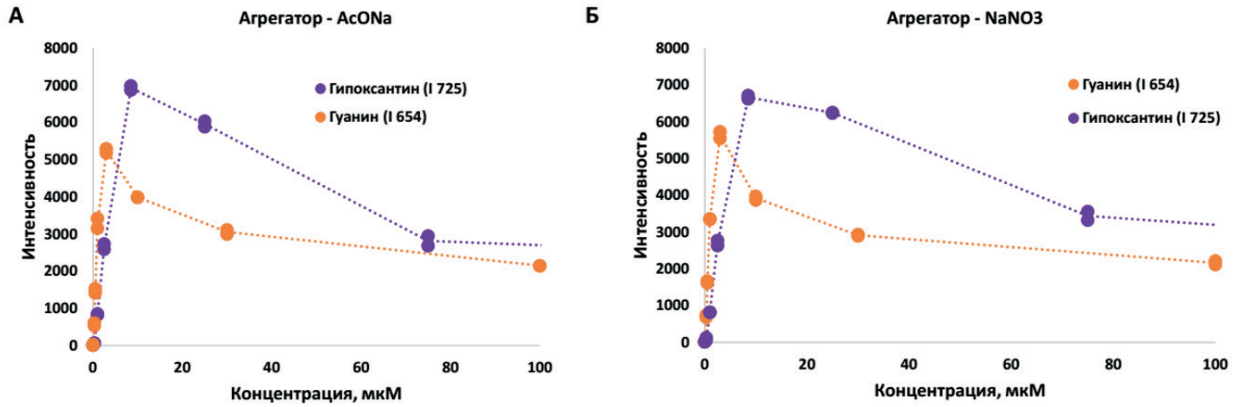


Рисунок 2. Концентрационные зависимости гуанина и гипоксантина А) агрегатор – 50 мМ AcONa, Б) агрегатор – 50 мМ $NaNO_3$.

Можно предположить, что адсорбция гипоксантина и гуанина на серебряных частицах происходит за счет взаимодействия с поверхностными атомами металла. Хлорид, являющийся специфическим ионом для серебряных поверхностей, конкурирует с этими аналитами. Следовательно, рациональным подходом для регистрации их низких концентраций является замена хлорида натрия на более индифферентные агрегирующие агенты, такие как ацетат или нитрат.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (FFZR-2024-0005, соглашение № 075-00422-24-02 от 28 мая 2024 г.).

Список литературы

1. Ferri M. et al. Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems //Critical reviews in food science and nutrition. – 2017. – Т. 57. – №. 13. – С. 2857-2876.
2. Яббаров Н. Г. и др. методы быстрой оценки резистентности микроорганизмов к антибиотикам // Успехи биологической химии. – 2025. – Т. 65. – С. 457-502.
3. Premasiri W.R. et al. The biochemical origins of the surface-enhanced Raman spectra of bacteria: a metabolomics profiling by SERS // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2016. – Vol. 408. – No. 17. – P. 4631–4647.
4. Mostowtt T., Munoz J., McCord B. An evaluation of monovalent, divalent, and trivalent cations as aggregating agents for surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) analysis of synthetic cannabinoids // Analyst. – 2019. – Т. 144. – №. 21. – С. 6404-6414.
5. Oliveira M. J. S. et al. Consequences of Surface Composition and Aggregation Conditions of Ag Nanoparticles on Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) of Pesticides //Chemosensors. – 2025. – Т. 13. – №. 1. – С. 13.

УДК 615.273.3

ЭФФЕКТ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНКИНАЗ ГЕНОТОКСИЧЕСКОГО СТРЕССА НА ПРОДУКЦИЮ АЛЛЕРГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ В МОДЕЛИ БЕНЗО(А)ПИРЕН-ИНДУЦИРОВАННОЙ РЕСПИРАТОРНОЙ АЛЛЕРГИИ

Чудаков Д.Б.[1], Стрельцова М.А.[1], Титов М.М.[2], Паламарчук А.И.[1], Овсяникова О.В.[1], Фаттахова Г.В.[1]

[1] Лаборатория клеточных взаимодействий; ФГБУН «ГНЦ «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова», РАН
[2] Лаборатория молекулярной иммунологии; ФГБУН «ГНЦ «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова», РАН
boris-chudakov@yandex.ru

Аннотация. Механизмом токсичного действия бензо(а)пирена является индукция генотоксического стресса. Целью работы было определить влияние ингибиторов протеинкиназ генотоксического стресса ATM- и ATR на гуморальный ответ в модели бензо(а)пирен-индуцируемой респираторной аллергии. Введение животным ингибитора ATR-киназы VE-821, но не ингибитора ATM-киназы KU-55933, достоверно усиливало продукцию специфического IgE и подавляло продукцию IgG1 антител.

Ключевые слова: генотоксический стресс; бензо(а)пирен; модель аллергического воспаления дыхательных путей; ATM-киназа; ATR-киназа.

Введение. Рост заболеваемости IgE-зависимыми патологиями, среди которых бронхиальная астма и аллергический ринит, объясняют влиянием аэрополлютантов, в частности – полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), типичным представителем которых является бензо(а)пирен (BaP) [1]. Основными механизмами токсического действия BaP на живые клетки является индукция окислительного и генотоксического стресса [2]. В случае генотоксического стресса активируются специфические сигнальные пути, связанные с активностью ATM- и ATR-протеинкиназ [3]. Имеются данные, согласно которым продукция ряда цитокинов иммунного и аллергического воспаления запускается при активации сигнальных путей генотоксического стресса [3]. Роль активности ATM- и ATR-протеинкиназ в продукции аллергенспецифических антител, и эффект фармакологических модуляторов данных ферментов на гуморальный ответ на респираторный аллерген ещё не достаточно изучена. Целью настоящей работы было определить влияние ингибиторов ATM- и ATR-киназ на продукцию аллергенспецифических антител в модели респираторной аллергии, индуцируемой в присутствии BaP.

Методы. В эксперименте использовали мышей линии BALB/c, самки, 8 недель на момент начала эксперимента. Животным в группе положительного контроля течении 10 недель дважды в неделю интраназально в объёме 50 мкл физраствора вводили модельный аллерген овальбумин (OVA) в дозе 0,3 мкг и аэрополлютант BaP в дозе 4 нг. Контрольным группам вводили только физраствор (ФР), либо OVA без поллютанта. Опытным группам вместе с аллергеном и поллютантом вводили низкомолекулярные фармакологические ингибиторы активности ATM- и ATR-киназы, компоненты KU-55933 и VE-821, соответственно, в дозах 10 мг/кг, интраназально. Растворы были приготовлены из 100-кратных базовых разведений в ДМСО. По окончанию опыта у животных осуществляли забор крови из подглазничного синуса для получения сыворотки и оценки уровня специфических антител методом ИФА.

Результаты и обсуждение. В ходе работы были измерены титры специфических IgE и IgG1 в сыворотках иммунных мышей. Введение низких доз антигена без BaP индуцировало небольшую, но достоверную продукцию специфического IgG1 ($p<0,01$). В то же время, в отсутствии поллютанта, достоверное формирование продукции специфического IgE не наблюдалось. Введение BaP вместе с OVA стимулировали синтез специфического IgE с высокой достоверностью ($p<0,01$) как в сравнении с группой, которой вводили ФР, так и в сравнении с группой, которой вводили аллерген без BaP. Рост титров специфического IgE в сравнении с группой, которой не вводили поллютант, был примерно 3-кратный. В данной группе (положительного контроля) также наблюдали достоверный ($p<0,001$) и весьма сильный (примерно на порядок) рост титров специфического IgG1. Таким образом, поллютант значительно стимулировал формирование продукции аллерген-специфических IgG1 и индуцировал появление продукции специфического IgE. Данные обобщены в Таблице 1.

Таблица 1. Продукция аллергенспецифических антител в различных экспериментальных группах

Группа, вводимые компоненты	ФР	OVA	OVA+BaP	OVA+BaP+ KU-55933	OVA+BaP+ VE-821
IgE	57±19	90±30	200±40 ** §§	500±200 **	1100±200 ** ###
IgG1, $*10^{-3}$	44±11	110±30 **	1200±400 *** §§§	1200±400 **	97±14 * #
*/**/*** - $p<0,05/0,01/0,001$ в сравнении с группой ФР; §/§§/§§§ - $p<0,05/0,01/0,001$ между группами OVA и OVA+BaP; #/##/### - $p<0,05/0,01/0,001$ эффекта ингибиторов в сравнении с группой OVA+BaP					

Введение опытным животным ингибитора ATM-киназы, компонента KU-55933, способствовало некоторому увеличению среднего значения титров IgE, примерно вдвое, однако из-за довольно высокой индивидуальной вариабельности это различие не было статистически достоверным, поэтому здесь можно говорить лишь о слабой тенденции, нуждающейся в дальнейшей проверке. В то же время влияние фармакологического ингибитора ATR-киназы, компонента VE-821, имело достоверный ($p<0,001$) стимулирующий эффект на продукцию специфического IgE (более чем в 5 раз). Интересно отметить, что эффект VE-821 на продукцию специфических IgG1 был обратный – наблюдали сильное, примерно на порядок, и достоверное ($p<0,05$) ингибирование синтеза данных антител. Достоверного эффекта KU-55933 на продукцию IgG1 не отмечали. Полученные данные также представлены в Таблице 1.

ATM- и ATR-киназы имеют схожие функции при ответе на генотоксический стресс. Тем не менее, их функции в В-лимфоцитах могут различаться. Так, активность ATM-киназы, индуцируемой в процессе формирования двуцепочечных разрывов при запуске переключения изотипов и в условиях «умеренного» генотоксического стресса, важна для дифференциации В-лимфоцитов в клетки герминальных центров [4]. Активность ATR-киназы требуется для поддержания цитокининдуцируемой пролиферации В-лимфоцитов вне герминальных центров [5]. Разный эффект ингибиторов этих киназ, вероятно, связан с преимущественным влиянием на сигнальные пути ответа на генотоксический стресс в клетках герминальных центров, где, исходя из вышеизложенного, активна преимущественно киназа ATM в случае KU-55933, или с влиянием на В-лимфоциты вне герминальных центров, где может проявляться активность и ATR-киназы, в случае VE-821. К сожалению, активирующий эффект ингибитора ATR-киназы на продукцию анафилактогенных антител IgE и супрессорный – на продукцию протективных IgG1 не позволяет его рассматривать в качестве потенциального средства терапии IgE-зависимых патологий.

Выводы. Продукция аллергенспецифических анафилактогеныых антител класса IgE и протективных антител IgG1 ингибируется и активируется, соответственно, ATR-киназой, в связи с чем потенциальные активаторы, но не ингибиторы, данного фермента могут представлять перспективность как средства терапии IgE-зависимых патологий. Требуются дальнейшие исследования.

Список литературы

1. Орлова Г.П., Демидова С.В., Фридман К.Б., Лим Т.Е. Влияние аэрополлютантов на состояние неспецифического и атопического процессов при формировании болезней органов дыхания в экологических условиях Санкт-Петербурга // Биосфера. – 2010. – Т. 2, - № 4. – С: 566-575.
2. Почицкая И.М., Рябова К.С., Журня А.А., Алексеенко М.С., Окулова Т.В., Рослик В.Л. Проблема накопления бенз(а)пирена в пищевых продуктах // Пищевая промышленность: наука и технологии. – 2025. – Т. 18, - № 4(70). – С: 89-94.
3. Jin Y., Li Y., He S., Ge Y., Zhao Y., Zhu K., He A., Li S., Yan S., Cao C. ATM participates in fine particulate matter-induced airway inflammation through regulating DNA damage and DNA damage response // Environ. Toxicol. – 2023. – Vol. 38, - No 11. – P. 2668-2678.
4. Sherman M.H., Kuraishi A.I., Deshpande C., Hong J.S., Cacalano N.A., Gatti R.A., Manis J.P., Damore M.A., Pellegrini M., Teitell M.A. AID-induced genotoxic stress promotes B cell differentiation in the germinal center via ATM and LKB1 signaling // Mol. Cell. – 2010. – Vol. 39, - No 6. – P. 873-885.
5. Menolfi D., Lee B.J., Zhang H., Jiang W., Bowen N.E., Wang Y., Zhao J., Holmes A., Gershik S., Rabadan R., Kim B., Zha S. ATR kinase supports normal proliferation in the early S phase by preventing replication resource exhaustion // Nat. Commun. – 2023. – Vol. 14, - No 1: 3618.

УДК 615.273.3

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ НАД(Ф)Н-ОКСИДАЗ НА ГУМОРАЛЬНЫЙ ОТВЕТ В МОДЕЛИ РЕСПИРАТОРНОЙ АЛЛЕРГИИ, ИНДУЦИРУЕМОЙ БЕНЗО(А)ПИРЕНОМ

Чудаков Д.Б., Болховитина Е.Л., Гречихина М.В., Овсяникова О.В., Паламарчук А.И., Фаттахова Г.В.

Лаборатория клеточных взаимодействий; ФГБУН «ГНЦ «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова», РАН

Аннотация. НАД(Ф)Н-оксидазы являются основными продуцентами активных форм кислорода (АФК). Целью работы было установить влияние ингибиторов НАД(Ф)Н-оксидаз на гуморальный ответ на респираторный аллерген. Введение животным селективного ингибитора NOX2 GSK2795039, но не ингибитора широкой специфичности VAS2870 и не селективного ингибитора NOX1 2-ацетилфенотиазина, подавляло продукцию аллергенспецифических антител класса IgE в модели респираторной аллергии.

Ключевые слова: НАДФ(Н)-оксидазы; респираторный аллерген; бензо(а)пирен; IgE; гуморальный ответ.

Введение. В основе патогенеза локального аллергического воспаления, в том числе при IgE-зависимой бронхиальной астме, лежит окислительный стресс [1]. Основными продуцентами активных форм кислорода в организме, в том числе в случае бронхиальной астмы, являются НАД(Ф)Н-оксидазы [2]. У человека различают 5 (у мыши 4) изоформ НАД(Ф)Н-оксидаз NOX и 2 близких к ним изоформы «двойных» оксидаз DUOX [3, 4]. Считается, что основную роль в активации иммунного ответа и функции В-лимфоцитов играет NOX2, в то время как NOX1 экспрессируется в основном в эндотелии сосудов, NOX4 – в макрофагах, DUOX1-2 - в клетках барьерного эпителия, а NOX3 – вне иммунной системы [3]. Разработаны различные низкомолекулярные фармакологические ингибиторы НАД(Ф)Н-оксидаз, как широкого спектра действия, так и более селективные в отношении отдельных изоформ [4, 5]. В то же время эффект подобных модуляторов на формирование гуморального ответа на респираторный аллерген не достаточно изучен. Одна из ведущих гипотез, объясняющих рост частоты встречаемости аллергических заболеваний, предполагает ведущую роль аэрополлютантов [6], в связи с чем в работе был использован прототипный поллютант бензо(а)пирен – продукт неполного сгорания топлива [6].

Методы. В работе были использованы мыши линии BALB/c, самки. Животным производилось интраназальное введение низкой дозы овальбумина (OVA) 0,3 мкг на введение, в течение 10 недель вместе бензо(а)пиреном BaP (4 нг на введение). В качестве отрицательных контролей использовали животных, которым вводили интраназально только физраствор (ФР), и животных, которым вводили OVA без поллютанта. Опытным группам вместе с антигеном и поллютантом производилось введение ингибиторов НАД(Ф)Н-оксидаз, а именно: ингибитора NOX широкой специфичности компонента VAS2870; селективного ингибитора NOX1 компонента 2-ацетилфенотиазина; селективного ингибитора NOX2 компонента GSK2795039. Все три ингибитора вводились в дозе 3 мг/кг на введение, растворы приготовлялись из 100-кратных базовых разведений в ДМСО. По окончанию протокола у животных была взята кровь из подглазничного синуса для анализа продукции специфических антител методом иммуно-ферментного анализа (ИФА).

Результаты и обсуждение. Согласно полученным результатам, введение антигена стимулировало небольшую, но достоверную ($p<0,001$) продукцию специфического IgE, а также IgG_1 ($p<0,05$), IgG_{2a} ($p<0,001$), IgG_{2b} ($p<0,05$), но не IgA. Введение аэрополлютанта приводило к значительному росту продукции специфического IgE (почти в 20 раз, $p<0,001$), а также приводило к повышению синтеза IgG1 (примерно в

17 раз, $p<0,01$), IgG_{2b} (в 4 раза, $p<0,05$), не оказывая достоверного влияния на синтез IgA. В то же время, при сравнении с группой, иммунизированной физраствором, у животных, иммунизированных OVA и BaP наблюдали также достоверную продукцию IgA антител ($p<0,01$). Кроме того, поллютант подавлял продукцию IgG_{2a} ($p<0,05$), синтез которого, в отличие от прочих, связан с 1-м типом иммунного ответа [7]. Данные приведены в таблице 1. Таким образом, эффект BaP мог быть связан как с усилением активации В-лимфоцитов в целом, так и с усилением 2-го типа иммунного ответа при одновременном подавлении 1-го типа иммунного ответа.

Таблица 1. Продукция аллерген-специфических антител (титры) в различных экспериментальных группах.

Группа, вводимые компоненты	ФР	OVA	OVA+BaP	OVA+BaP+ VAS2870	OVA+BaP+ 2-ацетил-фенотиазин	OVA+BaP+ GSK2795039
IgE	33±15	250±70 ***	3700±800 *** §§§	700±600 ***	900±300 ***	400±250 *** #
IgG_1, $*10^{-3}$	19±8	150±100 *	2600±1500 *** §§	1300±800 ***	1100±700 **	240±200
IgG_{2a}, $*10^{-3}$	0,5±0,3	14±5 ***	1,4±0,5 §§	11±4 *** #	3,8±1,4 *	5±4 **
IgG_{2b}, $*10^{-3}$	3,4±1,2	14±3 *	60±40 *** §	40±30 ***	22±5 **	17±5 ** #
IgA, $*10^{-3}$	1,5±1,1	4,1±1,0	13±5 **	4±3	8±4	1,0±0,4 ##
*/**/*** - $p<0,05/0,01/0,001$ в сравнении с группой ФР; §/§§/§§§ - $p<0,05/0,01/0,001$ между группами OVA и OVA+BaP; #/##/### - $p<0,05/0,01/0,001$ эффекта ингибиторов в сравнении с группой OVA+BaP						

Данные о влиянии на гуморальный ответ изучаемых ингибиторов также приведены в таблице 1. Наибольший эффект на продукцию аллерген-специфических антител оказывал компонент GSK2795039, представляющий собой хорошо растворимый в воде селективный ингибитор NOX2. Введение данного компонента вместе с OVA и BaP достоверно подавляло продукцию специфических IgE в сравнении с группой иммунизированной только антигеном и поллютантом (почти на порядок, $p<0,05$), однако подавление было не полным, и у животных, которым вводили данный компонент, сохранялся уровень продукции специфических IgE, достоверно более высокий, чем у животных, иммунизированных физраствором. В то же время, ингибитор VAS2870 с широкой специфичностью к НАД(Ф)Н-оксидазам, как и селективный ингибитор NOX1 2-ацетилфенотиазин не оказали достоверного влияния на продукцию IgE. Отсутствие эффекта VAS2870 предположительно могло быть связано также с его относительно небольшой растворимостью в водной среде помимо иной активности в отношении ферментов. Хотя имелась некоторая тенденция к супрессии продукции IgG_1 в случае всех трёх ингибиторов, она не была статистически достоверна. Следует заметить, что в случае GSK279539 продукция IgG_1 в сравнении с интактным контролем также не была достоверна, что указывает на подавление и данных антител. Компонент GSK2795039 также достоверно, хотя и не полностью, подавлял продукцию специфических IgG2b ($p<0.05$) и IgA ($p<0,01$). Известно, что переключение на эти изотипы у мышей зависит от продукции ТРФβ [7]. Хотя ингибитор VAS2870 и не оказывал влияния на продукцию IgE и IgG1, его введение повышало ($p<0,05$) продукцию OVA-специфических IgG2a.

Выводы. Таким образом, селективный ингибитор GSK2795039 представляется наиболее перспективным средством для профилактики развития IgE-зависимого ответа на респираторный аллерген, механизм его действия может быть связан со смещением баланса 2-го и 1-го типов иммунного ответа в сторону последнего. В то же время, значение эффекта подавления продукции IgG_{2b} и IgA под действием этого компонента требует дальнейшего анализа.

Список литературы

1. Нгуен В.Ч., Солдатов Д.Г. Окислительный стресс у пациентов с тяжёлой бронхиальной астмой // Пульмонология. – 2025. – Т. 35. - № 4. – С: 540-552.
2. Киселёва Р.Е., Федотова Г.Г., Новожилова О.С. Изменение активности НАД- и ФАД-дегидрогеназ и НАДФН-оксидаз при бронхолёгочных заболеваниях // Морфологические ведомости. – 2006. - № 1-2. – С: 88-90.
3. Cipriano A., Viviano M., Feoli A., Milite C., Sarno G., Castellano S., Sbardella G. NADPH Oxidases: From Molecular Mechanisms to Current Inhibitors // J. Med. Chem. – 2023. – Vol. 66. – No 17. – P. 11632-11655.
4. Altenhofer S., Radermacher K.A., Kleikers P.W.M., Wingler K., Schmidt H.H.W. Evolution of NADPH Oxidase Inhibitors: Selectivity and Mechanisms for Target Engagement // Antioxid. Redox Signal. – 2015. – Vol. 23. – No 5. – P. 406-427.
5. Погонялова М.Ю, Применение природных физиологически активных веществ для ингибирования НАД(Ф)Н-оксидаз в патологических клетках при развитии эндометриоза // Сборник статей международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Горизонты биотехнологий». – 2024. – С: 225-228.
6. Yanagisawa R., Koike E., Win-Shwe T.-T., Ichinose T., Takano H. Low-dose benzo[a]pyrene aggravates allergic airway inflammation in mice // J. Appl. Toxicol. - 2016. – Vol. 36. – No 11. – P. 1496-1504.
7. Xu Z., Zan H., Pone E.J., Mai T., Casali P. Immunoglobulin class switch DNA recombination: induction, targeting and beyond // Nat. Rev. Immunol. – 2012. – Vol. 12. – No 7. – P. 517-531.

УДК 376:15

ФЛАВИН-ЗАВИСИМЫЕ ОКСИДАЗЫ В МЕДИЦИНЕ

Чудин А.А.[1], **Кудряшова Е.В.** [1,2]

[1] *Центральный университет, г. Москва, РФ*
[2] *Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ*
andrew_18@inbox.ru
helenakoudriachova@yandex.ru

Аннотация. Доклад посвящён флавин-зависимым оксидазам как лекарственным мишеням, в том числе для лечения лейшмании, малярии и болезни Шагаса. В настоящей работе найдены эффективные ингибиторы галактонолактоноксидазы – мембранного фермента семейства ваниллилалкоголь-оксидаз, который катализирует синтез витамина *c* в паразитическом микроорганизме *Trypanosoma cruzi*, вызывающем болезнь Шагаса. С применением биоинформатических методов выяснены механизмы связывания ингибиторов с галактонолактоноксидазой и обнаружены характерные участки, отвечающие за связывание ферментов семейства ваниллилалкоголь-оксидаз с поверхностью мембран.

Ключевые слова: ферменты-мишени, ингибиторы, лекарства, галактонолактоноксидаза, мембраны.

Флавин-зависимые оксидазы играют важную роль во многих процессах в организме, таких как окисление моноаминовых нейротрансмиттеров в мозге, биосинтез гема и др. Нарушения в функционировании этих ферментов (повышенная или пониженная активность) приводят к таким заболеваниям как сахарный диабет, шизофрения и многие другие [1].

Особое место занимают инфекционные заболевания, в случае которых одной из наиболее эффективных стратегий является ингибирование ферментов-мишеней, присутствующих в паразитическом микроорганизме, но отсутствующих в организме пациента. В настоящей работе исследуется галактонолактоноксидаза из *Trypanosoma cruzi* – потенциальная лекарственная мишень для лечения болезни Шагаса [2].

Обнаружены эффективные ингибиторы галактонолактоноксидазы, относящиеся к классу аллилполиалкоксибензолов, оказывающие действие на саму *T. Cruzi* в том же диапазоне концентраций (10-100 мкМ), что может говорить об ингибировании этого фермента как о ключевом механизме подавления *T. cruzi*. Учитывая наличие галактонолактоноксидазы в родственных микро-организмах, вызывающих малярию и лейшманию, найденные ингибиторы также являются потенциальной основой для лекарств против этих болезней.

Отдельного внимания заслуживают мембранные свойства галактонолактоноксидазы в частности и флавин-зависимых оксидаз и дегидрогеназ в целом (в том числе представителей VAO-семейства). Взаимодействие этих ферментов с мембраной играет важную роль для их функционирования: так, дегидрогеназы часто используют в качестве электроноакцептора убихинон (кофермент Q), пластохинон или менахинон, которые, имея изопреноидную цепь, постоянно локализованы внутри липидного бислоя мембраны. Поэтому соответствующие дегидрогеназы располагаются непосредственно на самой мембране. Кроме того, для некоторых ферментов, например, пируватоксидазы, ФАД-кофактор восстанавливается, только когда фермент связывается с мембраной, что вызывает конформационные изменения, активирующие активный центр. Наконец, многие мембранотропные ферменты, в том числе флавин-зависимые, способы правильно сворачиваться только будучи прикреплёнными к поверхности мембраны. Соответственно, используя биоинформатические методы (включая множественное выравнивание первичных последовательностей и 3D-структур) в настоящей работе обнаружены участки связывания с мембраной у ферментов семейства ваниллиллалкоголь-оксидаз, в том числе у галактонолактоноксидазы. Полученные данные могут лечь в основу регулирования активно-

сти (подавления или усиления) соответствующих мембранотропных ферментов, например, за счёт модификаций участков связывания.

Данная работа выполнена с использованием оборудования (ИК-спектрометра MICRAN-3, спектрометра кругового дихроизма Jasco J-815, атомно-силового микроскопа NTEGRA II) по программе развития МГУ.

Список литературы

1. Chudin A.A., Kudryashova E.V. Flavin-Dependent Dehydrogenases and Oxidases: Comparison of Structural Functional Properties (A Review) // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2023. – Vol. 49. – No. 6. – P. 1229–1242.

2. Chudin A.A., Kudryashova E.V. Impact of Lipid Matrix Composition on Activity of Membranotropic Enzymes Galactonolactone Oxidase from *Trypanosoma cruzi* and L-Galactono-1,4-Lactone Dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana* in the System of Reverse Micelles // Biochemistry (Moscow). – 2023. – Vol. 88. – Nos. 12-13 – P. 2073-2083.

УДК 577:15

АММОНИЕВЫЕ АЦИЛГИДРАЗОНЫ – ОБРАТИМЫЕ ИНГИБИТОРЫ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ЧЕЛОВЕКА: СВЯЗЬ СТРУКТУРА – АКТИВНОСТЬ

Шайхутдинова З.М.[1,2], Паширова Т.Н.[1,2], Тагашева Р.Г.[3], Бухаров С.В.[3], Миронов В.Ф.[2], Богданов А.В.[2], Массон П.[1]

[1] Институт фундаментальной медицины и биологии КФУ, г. Казань, РТ, РФ
[2] Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ Казанский научный центр РАН, г. Казань, РТ, РФ
[3] ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет», г. Казань, РТ, РФ
shajhutdinova.z@mail.ru

Аннотация. Исследовано влияние структуры аммониевых ацилгидразонов на способность ингибировать фермент бутирилхолинэстеразу человека. Показано, что с усложнением структуры соединений (увеличение длины алкильной цепи и введение стерически затрудненных гетероциклов) происходит изменение механизма ингибирования с быстрого на медленное.

Ключевые слова: бутирилхолинэстераза, ингибиторы медленного связывания, ферментативная кинетика

Применяемые в настоящее время ингибиторы холинэстераз (ХЭ) (донепезил, ривастигмин) для симптоматической терапии болезни Альцгеймера (БА) обладают ограниченной эффективностью, низкой селективностью и побочными эффектами [1]. Современной стратегией терапии БА является создание мультитаргетных лигандов (MTDL), среди которых наиболее перспективными считаются обратимые ингибиторы медленного связывания (ИМС), характеризующиеся длительным временем удержания (τ) на мишени и пролонгированной фармакокинетикой [2].

Целью работы являлся поиск новых ингибиторов ХЭ с механизмом медленного связывания и установление взаимосвязи между структурой, самоорганизацией и ингибирующей активностью в отношении БХЭ новых аммониевых ацилгидразонов.

Объекты исследования — аммониевые N-ацилгидразоны со стерически затрудненным пирокатехином **1-5** (рисунок 1). Установлено, что все исследуемые соединения являлись обратимыми ингибиторами БХЭ и снижали ее активность в диапазоне концентраций 4-308 мкМ. Ход кинетических зависимостей зависел от длины алкильной цепи, строения аммонийной группы и природы заместителей в фенольном кольце. Так, кинетические зависимости были линейны (быстрое обратимое ингибирование) для следующих соединений: **1a-d**, **2**, **3a,b** и **4a**. Напротив, для **1e-g**, **3c**, **4b** и **5** кинетические зависимости были нелинейны: предстационарная фаза задержки (lag-time) превышала 1 минуту, что указывало на ИМС. Все исследованные ИМС (**1e-g, 3c, 4b, 5**) в работе действовали по механизму А (медленная стадия связывания/диссоциации ингибитора с ферментом). τ увеличивалось в 2.7 раза для соединений **1e-g** с ростом длины алкильной цепи от **1e** (n = 14) к **1g** (n = 18) (τ = 3.1 < 4.7 < 7.8 мин) [4] и в 1.4 раза с усложнением строения аммонийного фрагмента в ряду **3c** < 4**b** < **5** (τ = 2.4 < 4.8 < 4.9 мин).

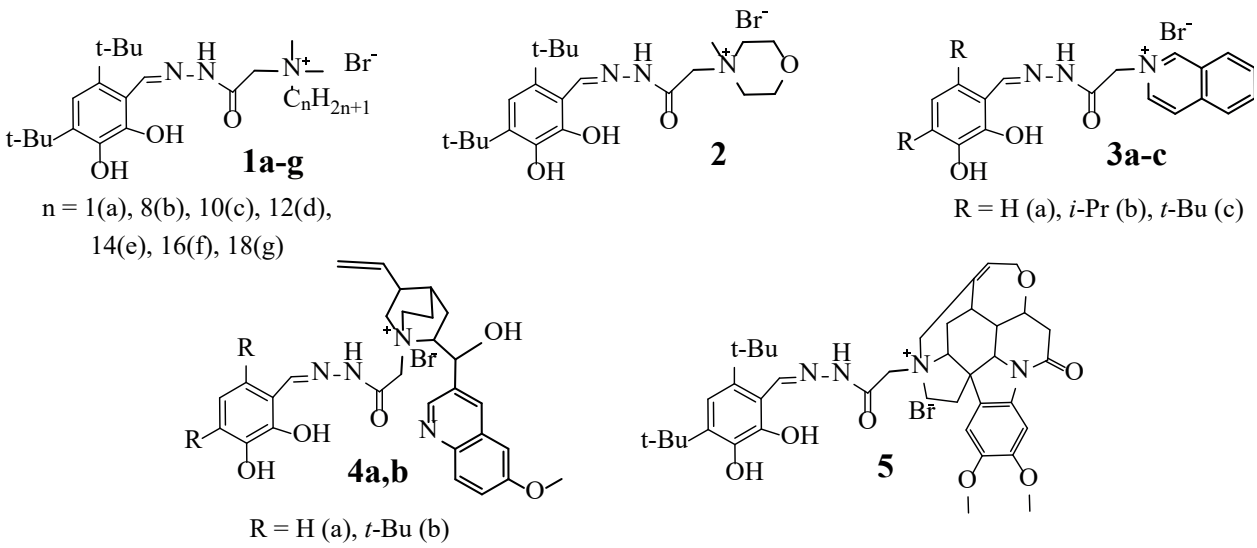


Рисунок 1. Структура аммониевых ацилгидразонов **1-5**.

Тип обратимого ингибирования и константы K_i и K'_i определяли графическим методом по графикам Диксона и Корниш-Боудена. **1a** (K_i = 36±8 мкМ, K'_i = 308±12 мкМ), **1b** (K_i = 18±5 мкМ, K'_i = 62±4 мкМ), **1f** (K_i = 13±1 мкМ, K'_i = 23±5 мкМ) являлись ингибиторами смешанного типа, **1c** (K'_i = 54±5 мкМ), **1g** (K'_i = 12±1 мкМ) – неконкурентными, а **1d** (K_i = 25±1 мкМ), **1e** (K_i = 12±2 мкМ) – конкурентными. Параметр α ($K'_i = \alpha K_i$) уменьшался с ростом длины алкильной цепи с n = 1 до n = 18, что характеризовало изменение типа ингибирования со смешанно-конкурентного (α > 1) на бесконкурентный (α = ∞). При этом K'_i уменьшалась в 26 раз, а K_i в 3.3 раза [3]. Все соединения **2-5** являлись ингибиторами смешанного типа. Для соединения **3c** по сравнению с **1a** наблюдалось улучшение ингибирующей активности: K_i снижалась в 6 раз (до 6±1 мкМ для **3c**), а K'_i — в 34 раза (до 9±1 мкМ для **3c**). Дальнейшее усложнение строения аммонийной группы приводило к возрастанию K_i в 5 раз (до 30±3 мкМ для **5**), а K'_i — в 7 раз (до 61±11 мкМ для **5**) по сравнению с **3c**. Замена трет-бутильной группы (**3c** и **4b**) на водород (**3a** и **4a**) снижала ингибирующую активность: K_i и K'_i увеличивались примерно в 3 раза.

Самоорганизацию соединений изучали комплексом физико-химических методов (тензиометрия, кондуктометрия, спектрофотометрия) в том же буфере, что и для кинетических экспериментов. **1a-g** образовывали ассоциаты при низких концентрациях (ККА1 = 7-75 мкМ), с увеличением концентрации происходила их структурная перестройка. Значения K_i и K'_i (12-62 мкМ) для **1g** близки к ККА1, т.е. к концентрации существования мономерных и олигомерных форм данного ингибитора, находящихся в динамическом равновесии, поэтому полученные значения K_i являлись кажущимися, а реальные K_i значительно ниже [3].

С увеличением длины цепи **1a-g** липофильность и гидрофобный эффект усиливались, способствуя образованию мелких и компактных ассоциатов: размер частиц при ККА1 уменьшался с 64 нм **(1b)** до 12 нм (**1g)**. Влиянии длины цепи на размер ассоциатов при ККА2 носил противоположный характер: размер увеличивался с 132 нм (**1b)** до 498 нм (**1f)**, за исключением **1g**, который образовывал частицы размером менее 40 нм [3].

Методом молекулярного моделирования установлено, что **1g** взаимодействовал с периферическим анионным сайтом (ПАС) БХЭ (D70, Y332, W86) и занимал весь канал, ведущий к активному центру, однако специфических взаимодействий с каталитической триадой (S198 и H438) не обнаруживалось. Связывание с ПАС объясняло бесконкурентный тип ингибирования, что согласовалось с данными самоорганизации: скорее всего **1g** образовывал ассоциаты небольшого размера, способные блокировать вход в активный центр [3].

С целью повышения биодоступности исследуемых соединений были разработаны липосомальные системы на основе фосфатидилхолина в составе с самым перспективным **1g.** Липосомы были получены методом гидратации липидной пленки, концентрация **1g** варьировалась от 0.007 до 0.35% мас./мас.

Характеристики липосом составили D=100 нм и PDI ≤ 0.15, дзета-потенциал - возрастал с -7 до +38 мВ с увеличением концентрации **1g,** что подтвердило интеграцию соединения в липидную мембрану. С увеличением концентрации **1g** эффективность капсулирования снижалась с 54±5 до 5±2%, а емкость загрузки увеличивалась с 0.054±0.005 до 0.25±0.10%. Наблюдалось очень медленное высвобождение **1g** из липосом. Определение активности БХЭ в присутствии липосом с **1g**, показало прогрессирующее ингибирование фермента во время инкубации, вероятно, за счет выхода ингибитора из липосомальных систем. Кинетические параметры и тип ингибитора **1g** не изменялись после загрузки в липосомы (K'_i = 12±1 мкМ и K'_i = 19±4 мкМ) [3].

Таким образом, физико-химические исследования и изучение ингибирующих свойств аммониевых ацилгидразонов со стерически затрудненным пирокатехиновым фрагментом выявили взаимосвязь между структурой соединений и их обратимой антихолинэстеразной активностью. Высокое сродство к ферменту, кинетика медленного связывания и антиоксидантные свойства позволяют рассматривать эти соединения как перспективные для дальнейших фармакологических исследований.

Список литературы

1. Xing H., Yue S., Qin R., Du X., Wu Y., Zhangsun D., Luo S. Recent advances in drug development for Alzheimer’s disease: a comprehensive review // International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – Vol. 26. – No. 8. – P. 3905.

2. Шайхутдинова З.М., Паширова Т.Н., Массон П. Ингибиторы медленного связывания ферментов: кинетические характеристики и фармакологический интерес // Биомедицинская химия. – 2025. – Vol. 71. – No. 4. – P. 81-94.

3. Shaihutdinova Z.M., Vandyukov A.E., Lushchekina S.V., Mironov V.F., Bukharov S.V., Tagasheva R.G., Bogdanov A.V., Arsenyev M.V., Masson P., Pashirova T.N. Amphiphilic ammonium acylhydrazones on the base of sterically-hindered catechol: Synthesis, self-assembly, reversible inhibition of butyrylcholinesterase and structure-activity relationships // Journal of Molecular Liquids. – 2025. – Vol. 437 (Part A). – P. 128360.

УДК 577.151.63

НОВЫЕ ИЗОФОРМНО-СЕЛЕКТИВНЫЕ ИНГИБИТОРЫ КАРБОАНГИДРАЗЫ IX И XII И AKT1-КИНАЗЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ АГЕНТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Шаройко В.В.[1,2,3], Кожухов П.К.[1], Исакова В.А.[1,2,3], Петухова Н.В.[1,2], Моисеев И.С.[1], Семёнов К.Н.[1,2]

[1] Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, г. Санкт-Петербург, РФ
[2] Институт экспериментальной медицины, г. Санкт-Петербург, РФ
[3] Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург, РФ
sharoyko@gmail.com

Аннотация. В докладе представлены результаты молекулярного дизайна, синтеза и изучения биологической активности изоформно-селективных ингибиторов карбоангидразы IX и XII и AKT1-киназы. На моделях *in vitro* и *in vivo* показана эффективность полученных ингибиторов в подавлении роста ряда неоплазий.

Ключевые слова: ингибиторы, карбоангидраза, IX и XII AKT1- киназа, кинетика, неоплазии.

Гипоксия и внеклеточный ацидоз солидных опухолей создают микросреду, способствующую селекции агрессивного фенотипа, ускользанию от иммунного надзора, инвазии, метастазированию и лекарственной устойчивости. Ключевую роль в адаптации солидных опухолей играют опухолеассоциированные изоформы карбоангидразы человека КАЧ IX и XII. Гиперэкспрессия протоонкогенной серин/треониновой киназы AKT1 контролирует выживаемость, пролиферацию и метаболизм опухолевых клеток, а также модулирует экспрессию ингибиторов иммунных контрольных точек (PD-L1, TIM3 и др.), что особенно важно при миелоидных новообразованиях. Исследования показывают, что избыточная активация пути AKT/mTOR может нарушать нормальную функцию гемопоэтических стволовых клеток, что приводит к их истощению и формированию благоприятной среды для развития неоплазий.

Скрининг цитотоксичности *in vitro* библиотеки из 80 первичных сульфонамидов выявил соединение-лидер **1** (2-((2,4-дихлорбензил)амино)-*N*-(4-сульфамоилфенил)-2-тиоксоацетамид), демонстрирующее потенцирующий цитотоксический эффект на клеточной линии аденокарциномы легкого A549 в комбинации с гефитинибом (селективный ингибитор тирозинкиназного домена рецептора эпидермального фактора роста). Как видно из значений K_i, полученных методом остановленной струи, соединение **1** показало высокое ингибирующее действие в отношении опухолеспецифических рекомбинантных изоформ КАЧ IX и XII (K_i=3.8 нМ и K_i=0.95 нМ, соответственно) по сравнению с рекомбинантными изоформами КАЧ I и II (K_i=79.7 нМ и K_i=138.4 нМ, соответственно). Соединение **1** в *in vitro* экспериментах снижало миграцию клеток линии A549, а также вызывало апоптоз, опосредуемый активацией каспаз 3 и 7. Более того, уровень экспрессии КАЧ IX в условиях гипоксии в клетках линии A549 при 24 ч воздействии комбинации соединения **1** и гефитиниба был снижен в 2 раза по сравнению с контролем. Таким образом, можно предположить, что адъювантный противоопухолевый эффект соединения **1** и гефитиниба реализуется посредством механизма активации сигнальных путей апоптоза и подавления экспрессии КАЧ IX, которая играет ключевую роль в поддержания жизнеспособности клеток аденокарциномы легких A549 в условиях гипоксии. В экспериментах *in vivo* на модели, полученной путем трансплантации клеток аденокарциномы легких A549 иммунодефицитным мышам, показано, что соединение **1** в комбинации с гефитинибом усиливало противоопухолевое действие последнего [1].

С использованием компьютерного моделирования и скрининга виртуальных библиотек были отобраны 17 потенциальных ингибиторов AKT1-киназы класса пурин-пиперазинов. Скрининг цито-

токсичности и анализ подавления экспрессии ингибиторов иммунных контрольных точек PD-L1 и TIM3 клеточной линии Mono-Mac-1 позволил выявить соединение-лидер **2** (4-(9*H*-пурин-6-ил)пиперазин-1-ил)(бензофуран-2-ил)метанон. Также был разработан масштабируемый многостадийный синтез соединения **2** с высокими выходами, не требующий хроматографической очистки конечного продукта. В экспериментах *in vitro* соединение **2** проявляло умеренную цитотоксичность по отношению к клеточным линиям острого миелоидного лейкоза (THP-1, KG-1, Mono-Mac-1), индуцировало апоптоз, вызывало значительное снижение уровня экспрессии иммунных контрольных точек PD-L1 и TIM3 за счет ингибирования активности AKT1-киназы. Молекулярная динамика (500 нс) показала стабильное связывание соединения **2** в АТФ-связывающем сайте AKT1 (XPGScore –9,9 ккал/моль, ΔG_{bind} –52,9 ккал/моль). Ключевые аминокислотные остатки Lys158, Lys179, Glu228, Ala230, Asp292 принимают участие во взаимодействии с соединением **2**. При этом мутации Y176F и K179M, встречающиеся у пациентов, не нарушают связывание AKT1 с соединением **2** [2]. Полученные ингибиторы ферментов, участвующих в канцерогенезе, представляют собой прототипы новых лекарственных агентов: ингибиторы КАЧ IX и XII эффективны в комбинации с гефитинибом в отношении аденокарциномы легкого, а ингибитор AKT1 демонстрирует значительное подавление ключевых иммунных контрольных точек при миелоидных новообразованиях. Действие ингибиторов направлено на преодоление резистентности, обусловленной гипоксией, либо дисрегуляцией иммунного микроокружения.

Список литературы

1. Bunev A.S., Shetnev A.A., Shemchuk O.S., Kozhukhov P.K., Sharonova T.V., Tyuryaeva I.I., Khotin M.G., Ageev S.V., Kholmurodova D.K., Rizaev Ja.A., Semenov K.N., Sharoyko V.V. Combination of carbonic anhydrase isoform IX inhibitors and gefitinib suppresses on the invasive potential of non-small cell lung cancer cells. Biochemistry (Moscow). – 2024. – Vol. 89. – 12-13. – P. 2227-2237.

2. Semenov K.N., Pimenova E.V., Sokolov V.A., Senichkina D.A., Petukhova N.V., Gureev M.A., Platonova E.Y., Bug D.S., Pyatyisbyancev T.A., Zhuravlev A.S., Epifanovskaya O.S., Gaponenko I.N., Shakirova A.I., Lepik K.V., Porozov Yu.B., Isakova V.A., Moiseev I.S., Sharoyko V.V. The discovery of novel AKT inhibitor (4-(purin-6-yl)piperazin-1-yl)(benzofuran-2-yl)methanone for treatment of myeloid neoplasms: Computer modelling, synthesis and biological activity // Journal of Molecular Liquids. – 2026. – Vol. 449. – No.129382.

УДК 577.325.2

ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВ LUXF И BSA НА КИНЕТИКУ РЕАКЦИИ, КАТАЛИЗИРУЕМОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЛЮЦИФЕРАЗОЙ

Шахматов И.В.[1], **Лисица А.Е.**[1], **Немцева Е.В.**[1,2]

[1] *Институт фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета, г. Красноярск, Красноярский край, РФ*
[2] *Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук, г. Красноярск, Красноярский край, РФ*
shakhmatov-2016@mail.ru

Аннотация. В работе проанализирована нестационарная кинетика биолюминесцентной реакции, катализируемой люциферазами из *Photobacterium leiognathi* и *Vibrio harveyi*, в присутствии белков LuxF и бычьего сывороточного альбумина (BSA). Использованы методы остановленного потока и собственной флуоресценции белка. Установлено воздействие белков через связывание с субстратами люциферазы и белок-белковые взаимодействия. Определены различия между люциферазами.

Ключевые слова: бактериальная люцифераза, кинетика ферментативной реакции, биолюминесценция, белок-белковые взаимодействия.

В природных условиях ферменты работают в неидеальной среде (в условиях неоднородных характеристик, присутствия макромолекул и т.п.), и изучение влияния этих факторов на ферментативный катализ необходимо для понимания принципов функционирования живых клеток. В данной работе исследована кинетика реакции, катализируемой бактериальной люциферазой в присутствии белка lux-оперона светящихся бактерий – LuxF и в присутствии чужеродного для бактерий белка BSA.

Бактериальная люцифераза представляет собой флавинзависимую монооксигеназу, катализирующую реакцию с выделением кванта света в видимом диапазоне, с участием восстановленного флавинмононуклеотида ($FMNH_2$), длинноцепочечного альдегида и молекулярного кислорода [1]. Предполагается, что BSA может влияет на эту реакцию путём связывания альдегида, нивелируя субстратное ингибирование при его высоких концентрациях [2]. Функция белка LuxF остаётся не до конца ясной, хотя была выдвинута гипотеза, что он способствует свечению бактерий путем связывания побочного продукта (миристо-FMN) – ингибитора люциферазы [3].

В данной работе проведён сравнительный анализ влияния белков LuxF и BSA на кинетику реакции «быстрой» и «медленной» бактериальной люциферазы с двумя альдегидами: *н*-деканалем (C10) и *н*-тетрадеканалем (C14). В эксперименте использовали рекомбинантные бактериальные люциферазы *Photobacterium leiognathi* (Pl) и *Vibrio harveyi* (Vh), полученные в Институте биофизики СО РАН (Красноярск). Кинетику биолюминесценции и флуоресценции регистрировали методом остановленного потока на анализаторе SX-20 (Applied Photophysics, Великобритания) при 25 °C. Фотовосстановление FMN и смешивание реагентов выполняли согласно описанной ранее методике [4]. Кинетику флуоресценции белка измеряли при 330 нм, при возбуждении 280 нм. Концентрации BSA и LuxF в реакционной смести составляли 0,1-0,2 мг/мл, люцифераз – 0,5-1,1 μM. Концентрации C10 и C14 варьировали в диапазоне 0-80 μM. Все эксперименты были выполнены в 0,05 M Na-K-фосфатном буфере (pH 6,9). Для расчета констант скоростей проводили аппроксимацию участков кинетических кривых экспоненциальной функцией в пакете Origin (OriginLab, США).

В результате проведённых экспериментов установлено, что добавление LuxF не приводит к значимому изменению кинетических параметров биолюминесцентной реакции «быстрой» люциферазы Pl. Однако присутствие BSA приводит к увеличению максимальной интенсивности I_{max}, интегральной

интенсивности Q, константы спада k_{decay} при увеличении концентрации C10. В реакции с C14 наблюдаются сходные значения I_{max} как для BSA, так и для LuxF.

Для «медленной» люциферазы Vh было установлено влияние LuxF на кинетику реакции: снижение значений Q, k_{decay}, I_{max} по сравнению с контролем для обоих альдегидов. BSA проявлял схожий эффект при добавлении C14, однако в ходе аналогичной реакции наблюдался рост кинетических параметров при увеличении концентрации C10. Это указывает на специфичность взаимодействия LuxF именно с люциферазой Vh – снижение сигнала интенсивности с LuxF по отношению к контролю.

При исследовании собственной флуоресценции люцифераз анализировали константы скорости k_1 (быстрый спад, связывание субстратов) и k_2 (нарастание, восстановление активности фермента – реактивация) [5]. Наибольший эффект на реактивацию оказывал BSA для Pl. Для Vh значимых отклонений не обнаружено.

Таким образом, влияние LuxF и BSA на кинетику реакции бактериальной люциферазы зависит от её происхождения. Наибольший эффект BSA проявляется для деканаля и Pl, в то время как LuxF снижает сигнал люминесценции в системе с Vh.

Полученные данные могут быть полезны при использовании бактериальных люцифераз для дизайна биокаталитических систем с повышенной яркостью.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках проекта № 25-24-00617.

Список литературы

1. Tinikul R. et al. Bacterial luciferase: Molecular mechanisms and applications // The enzymes. – Academic Press, 2020. – Vol. 47. – P. 427–455.
2. Makemson J. C., Hastings J. W. Bovine serum albumin interacts with bacterial luciferase // Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence. – 1991. – Vol. 6. – No. 2. – P. 131–136.
3. Brodl E. et al. The impact of LuxF on light intensity in bacterial bioluminescence // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2020. – Vol. 207. – P. 111881.
4. Lisitsa A. E. et al. The role of cosolvent–water interactions in effects of the media on functionality of enzymes: A case study of Photobacterium leiognathi luciferase // Life. – 2023. – Vol. 13. – No. 6. – P. 1384.
5. Лисица А. Е., Гульнов Д. В., Шахматов И. В. и др. Кинетика собственной люминесценции бактериальной люциферазы в ходе катализа отражает связывание флавина и реактивацию фермента // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. — 2026. — В печати.

УДК 577.15

ТЕНДЕНЦИИ, ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИНЖЕНЕРНОЙ ЭНЗИМОЛОГИИ: СУБЪЕКТИВНЫЙ ВЗГЛЯД

Швядас В.К.

Факультет биоинженерии и биоинформатики и НИИ физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
vytas@belozersky.msu.ru

Аннотация. Рассмотрены тенденции и перспективы развития инженерной энзимологии, очерчены проблемы перехода от научных исследований функциональных свойств ферментов к практическому использованию биокатализа. В основе проведенного анализа концепция инженерии биокатализа (biocatalysis engineering), подразумевающая более широкое представление о промышленном использовании биокатализа, чем концепция инженерной энзимологии, концепция зеленой химии, учитывающая экологические проблемы используемых технологий, а также концепция оценки жизненного цикла создаваемых продуктов, которая только начинает применяться к биопромышленности. Приведены наиболее наглядные примеры, демонстрирующие достоинства и преимущества биокаталитических процессов, нашедших применение в промышленности, обсуждаются подходы по разработке новых технологий, созданию биокатализаторов с заданными свойствами, оптимизации и масштабированию биокаталитических процессов, обращается внимание на сложности и проблемы практического применения ферментов.

Ключевые слова: биокатализ, инженерная энзимология, проблемы и перспективы, методы инженерии биокатализа

Эффективность биокатализа можно увеличить при инженерии ферментов, субстратов, реакционной среды, формы биокатализатора, каскада превращений, а также реакторов (biocatalysis engineering)[1]. Учет образования побочных продуктов является одним из основных требований зеленой химии [2] и указывает на необходимость баланса между производительностью процесса и экологическими ограничениями. Следует ожидать, что при оценке перспектив и отдаленных последствий биокаталитических технологий будет возрастать роль анализа жизненного цикла продуктов «от рождения до могилы». В связи с этим необходим переход от качественных к количественным оценкам ферментов как катализаторов, учитывая производство и утилизацию биокатализатора, выделение и очистку целевого продукта, наличие в нем примеси фермента, расход и регенерацию компонентов реакционной среды (включая воду), затраты энергии, углеродный след и т.д. Отдельные примеры такого подхода свидетельствуют, что биокатализ не всегда автоматически экологичнее химического синтеза, а вода не обязательно является наилучшей средой для проведения реакции [3].

Выбор биокатализатора. Химические превращения в живых системах, катализируемые ферментами, сложно масштабировать, перспективы использования ферментов также трудно оценить, основываясь на их изучении в разбавленных растворах. При высоком содержании субстратов ферменты способны осуществлять превращения, отличные от таковых в живых системах. Гидролазы, действующие с промежуточным образованием ацилфермента, в высококонцентрированных водных системах способны переносить ацильную группу ацильных доноров на добавленный нуклеофил и катализировать синтез. Так осуществляется промышленное производство ряда бета-лактамных антибиотиков [4], при помощи галактозидазы получают галактоолигосахариды [5]. Для протекания многих ферментативных реакций нужны кофакторы и при масштабном производстве продуктов необходимо тратить эквимолярное количество кофакторов (NAD(P)H, ATP и др.). В живых системах это решается за счет

сопряженных реакций. В промышленности наряду с регенерацией кофакторов, например, с использованием формиатдегидрогеназы [6], исследуются возможности применения синтетических аналогов природных кофакторов, которые можно регенерировать химическими или физическими методами [7]. Важным является поиск новых ферментов. Тенденцией последнего времени является получение ферментов с улучшенными свойствами методами белковой инженерии, в будущем предполагается создание биокатализаторов с заданными свойствами, в том числе для осуществления ранее неизвестных химических превращений. Наряду с этим ведется исследование свойств ферментов из экстремофилов и других нетрадиционных источников: гигантских вирусов, эндосимбиотических бактерий и микроспоридий.

Выбор растворителя - важнейший этап создания биокаталитического процесса не только как среды проведения реакции, но и для выделения продукта, обслуживания и очистки биореактора. В фармацевтической промышленности органические растворители составляют большую часть отходов. Обсуждаются преимущества проведения ферментативных реакций в самых разных водных и органических средах [8]. Привлекательным является проведение процесса в среде исходных реагентов в отсутствие растворителя [9], высокопроизводительные твердофазные реакции [10]. Дополнительные возможности в этом связаны с применением механохимических методов, например, шаровых мельниц как «мешалок» порошковообразной смеси [11].

Синзимы (нанозимы): создание химических катализаторов, имитирующих каталитические свойства ферментов [12,13]. Синзимы низкоспецифичны к субстрату и не могут имитировать стерео-, регио- и хемоселективность ферментов; наличие множественных каталитических центров приводит к их кажущейся более высокой активности по сравнению с ферментами. Однако синзимы весьма доступны и могут создать конкуренцию некоторым ферментам.

Аппаратурное оформление. Использование микрофлюидных систем ускоряет разработку биокаталитических технологий. Применение капельной микрофлюидики позволяет проводить экспериментальный скрининг более 10 миллионов мутантов в день при направленной эволюции и дизайне ферментов [14], возможно дальнейшее увеличение производительности с разработкой автоматизированных систем [15]. Впечатляет применение микрофлюидных систем для оценки кинетических характеристик большого числа мутантов за несколько дней: 1036 мутантов, > 670000 реакций, > 5000 параметров, включая k_{cat} и K_m [16]. Микрофлюидные системы ускоряют и удешевляют поиск оптимальных условий биокаталитического процесса [17], представляют возможности интеграции биокатализа и химического катализа [18].

Методы предсказания. Следует отметить тенденцию использования методов молекулярного моделирования и биоинформатики для характеристики структурной организации и функциональных свойств неизученных ферментов [19,20], тем более, что известно более 200 миллионов неаннотированных белков (https://uniprot.org), для которых можно построить структурные модели (https://alphafoldserver.com), однако предсказание функциональных свойств представляет намного более сложную задачу. Доклад в основном касается фармацевтической химии и тонкого органического синтеза, где важна оптимальная интеграция биокатализа с химическими методами [21], чтобы эффективно использовать стерео- и региоселективность ферментов, исключить стадии введения и снятия защитных групп, образование генотоксических примесей в синтезируемых препаратах. Перспективы инженерной энзимологии как в этом, так и в других направлениях будут зависеть не только от успехов в изучении ферментов, но и от критического учета достоинств и ограничений биокаталитических технологий.

Работа выполнена по гостеме НИИ ФХБ им. А.Н.Белозерского МГУ 119042590056-2.

Список литературы

1. Sheldon R.A., Pereira P.C. //Chemical Society Reviews, 2017, 46(10), 2678-2691.
2. Sheldon R. A. //Green Chemistry, 2016, 18(11), 3180-3183.
3. Holtmann D., Hollmann F. //Molecular Catalysis. 2022, 517, 112035.
4. Панин Н.В. и др. Вестник МГУ. Серия 2. Химия. 2023, 64(4), 334-352.

5. Costa M.A. et al. //Food Chemistry, 2025, 147072.
6. Тишков В.И. и др. //Успехи биологической химии, 2026, 66, 53-70.
7. Lu Z. et al. //Trends in Biotechnology. 2026. DOI: 10.1016/j.tibtech.2026.03.010
8. Domínguez de María P., Kara S., Gallou F. //Molecules. 2023, 28(18), 6452.
9. Ansorge-Schumacher M.B., Thum O. //Chemical Society Reviews. 2013, 42(15), 6475.
10. Youshko M.I., Švedas V.K. //Advanced Synthesis & Catalysis. 2002, 344(8), 894-898.
11. Pérez-Venegas M., Juaristi E. //ACS Sustainable Chem. Eng. 2020, 8(24), 8881-8893.
12. Kuah E. et al. //Chemistry–A European Journal. 2016, 22(25), 8404-8430.
13. Карякин А.А. //Успехи химии. 2023, 92(8), 1-8.
14. Gantz M. et al. //Chemical Reviews. 2023, 123(9), 5571-5611.
15. Bozkurt E.U. et al. // Nat. Prod. Rep. 2026, 43, 313-334.
16. Markin C.J. et al. //Science. 2021, 373(6553), eabf8761.
17. Takle M.J., Cosgrove S.C., Clayton A.D. //Chemical Science. 2025, 16, 18783-18790.
18. Siasiaridis P., Damian M., Mutti F. G. // Angew. Chem. Int. Ed. 2026, e11930.
19. Boorla V.S., Maranas C.D. //Nature communications. 2025, 16(1), 2072.
20. Варфоломеев С.Д. и др. //Успехи химии. 2024, 93(12), RCR5144.
21. Gröger H., Gallou F., Lipshutz B. H. //Chemical Reviews. 2022, 123(9), 5262-5296.

УДК 630.863

ВЛИЯНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ МОДИФИКАЦИИ НА КРИСТАЛЛИЧНОСТЬ ТЕХНИЧЕСКИХ ЦЕЛЛЮЛОЗ

Шевченко А.Р., Майорова К.А., Завьялова Л.В., Чухчин Д.Г., Шутский Н.А., Малков А.В., Аксенов А.С.

Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова, 163000, г. Архангельск, наб. Серверной Двины 17
a.shevchenko@narfu.ru

Аннотация. Развитие биоэкономики тесно связано с внедрением технологий комплексной переработки возобновляемых растительных ресурсов. Биокаталитическая обработка комплексов полисахаридов, получаемых при делигнификации древесины сульфитным и сульфатным методами, открывает перспективы не только для получения сбраживаемых сахаров, но и для производства модифицированных целлюлоз с заданными свойствами. В работе представлены результаты исследования кристалличности технических целлюлоз в зависимости от типа используемых ферментных препаратов и степени конверсии. Показано, что повышение кристалличности возможно как на начальных этапах конверсии, за счёт удаления аморфной части целлюлозы, так и при глубоком гидролизе, сопровождающемся удалением значительной части нелинейных гемицеллюлоз.

Ключевые слова: ферментативный гидролиз, технические целлюлозы, кристалличность, биоэкономика

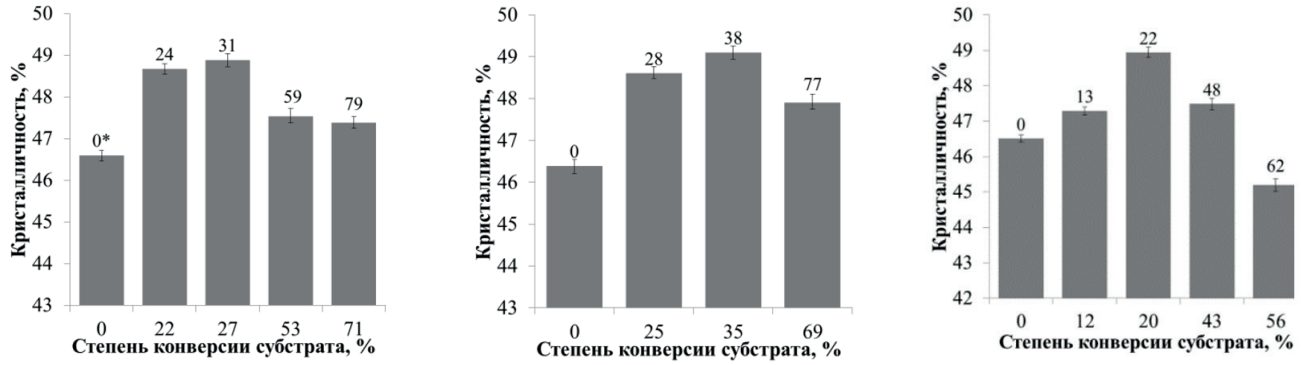
Поиск и разработка технологий комплексной переработки возобновляемого растительного сырья, основанных на процессе катализа полисахаридов карбогидразами с получением простых сахаров, является одним из ведущих направлений в современной биоэкономике. В качестве перспективного источника растительных полисахаридов исследователи выделяют древесные технические целлюлозы, получаемые сульфитным и сульфатным метод делигнификации [1]. При этом, в процессе биокатализа технических целлюлоз, образуются растворимые продукты гидролиза, а структура негидролизованной части подвергается модификации, что приводит к появлеию новых физико-химических характеристик [2]. Таким образом, исследования влияния ферментативной модификации на кристалличность технических целлюлоз, позволят глубже понять механизмы структурных преобразований и определить перспективы дальнейшего применения таких новых материалов [3].

Ферментативный гидролиз промышленных образцов лиственных (ЛСА - 72,3% целлюлоза, 25,1 гемицелллюлозы) и хвойных (ХСА - 80,3 целлюлоза; 19,4 гемицеллюлозы) сульфатных целлюлоз с ОАО «Архангельский Целлюлозно-Бумажный комбинат», входящим в состав Pulp Mill Holding, г. Новодвинск, (Архангельская область), и хвойной сульфитной (ХСИ – 78,5 целлюлоза, 15,8 гемицеллюлозы) целлюлозы с ОАО «Сясьский Целлюлозно-Бумажный комбинат», г. Сясьстрой, (Ленинградская область) с концентрацией от 5 до 10%, проводили коммерческими ферментными препаратами комплексными целло- и ксиланолитическими ферментными препаратами (ООО «Агрофермент», Москва), а также опытных препаратов гомогенных ксиланаз xylE и xylA *P. Canescens*, эндоглюканазы EGII *P. verruculosum*, полученных путем разделения и очистки высокоэффективной жидкостной хроматографией [4], и комплексного препарата β-маннаназы *P. verruculosum*. Конверсию проводили в течение 1-24 часов в зависимости от типа обработки, в лабораторном шейкере-инкубаторе Biosan es-20/60 (Biosan, Латвия) при температуре 50-65°C и постоянном перемешивании 150-300 об/мин.

В результате обработки ЛСА индивидуальными препаратами эндоксиланаз xylE (5 ед/г а.с.ц.) и xylA (5 ед/г а.с.ц.) и эндоглюканазы EGII (2,5 ед/г а.с.ц.) в течение 5 часов наблюдали повышение кристалличности на 3,25 отн%. В параллельном эксперименте изменили расходы индивидуальных ферментов, вдвое уменьшив расход эндоксиланаз и вдвое увеличив расход эндоглюканазы, а также произвели

дополнительную ксиланазную обработку биомодифицированной лиственной сульфатной целлюлозы препаратами xylE (5 ед/г а.с.ц.) и xylA (5 ед/г а.с.ц.), что обеспечило повышение кристалличности ЛСФаЦ на 1,86 отн%. Таким образом, в данных экспериментах, согласно растворимым продуктам деструкции, глюкозе, наибольшее влияние на увеличение кристалличности оказало удаление аморфной целлюлозы эндоглюканазой, что привело к увеличению доли кристаллической и конечным выходом модифицированной целлюлозы 96% и более.

Использование комплексных ферментных препаратов в дозировке 10 АФБ/г а.с.с приводит к глубокому гидролизу целлюлозного волокна, деполимеризации полисахаридов и существенному изменением компонентного состава. В процессе биоконверсии целлюлозы и активного гидролиза гемицеллюлоз, происходит постоянное увеличение активных сайтов связывания ферментов с субстратом, что в свою очередь обуславливает динамическое изменение соотношения кристаллической и аморфной части целлюлозы, а также снижения количества нелинейных полисахаридов в модифицированной целлюлозе. Так, при достижении конверсии ЛСА до 27%, из состава удаляется около трети всего ксилана, кристалличность возрастает на 4,9%, а степень полимеризации снизилась в 2 раза. В целом, изменения кристалличности в ходе гидролиза комплексов древесных полисахаридов ЛСА, ХСА и ХСИ коммерческими препаратами имели волнообразный вид (рис.1).



А Б В

* концентрация восстанавливающих сахаров в гидролизате, г/л

Рисунок 1. Изменение кристалличности полуфабрикатов в процессе ферментативного гидролиза: А - ЛСА; Б - ХСА; В - ХСИ

При уровне гидролиза 35% (38,4 г/л ВС) кристалличность модифицированной ХСА повысилась на 5,8%, что является максимальным значением для образцов при глубоком гидролизе. Лиственный полуфабрикат, несмотря на более сложный компонентный состав с большим количеством гемицеллюлоз, достиг уровня кристалличности хвойных модифицированных целлюлоз. Таким образом, в процессе биокатализа полуфабрикатов древесного происхождения коммерческими карбогидразами возможно не только регулировать уровень конверсии субстрата, степень полимеризации и углеводный состав гидролизата, но и целенаправленно влиять на параметры модифицированной целлюлозы, такие как кристалличность, а, следовательно, и существенно изменять свойства для создания новых функциональных продуктов.

Авторы выражают благодарность Федеральному исследовательскому центру «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН институту биохимии имени А.Н. Баха за предоставленные ферментные комплексы и хроматографический анализ углеводов и ЦКП НО «Арктика» Северного (Арктического) федерального университета имени М.В. Ломоносова.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 25-24-20063, https://rscf.ru/project/25-24-20063/).

Список литературы
1. Behera, S., Arora, R., Nandhagopal, N., Kumar, S. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass // Renewable and sustainable energy reviews. – 2014. – Vol. 36. – P. 91-106.
2. Shevchenko, A. R., Tyshkunova, I. V., Chukhchin, D. G., Malkov, A. V., Toptunov, E. A., Telitsin, V. D., Aksenov, A. S. Production of biomodified bleached kraft pulp by catalytic conversion using *Penicillium verruculosum* enzymes: composition, properties, structure, and application. Catalysts. – 2023. – Vol. 13. – №. 1. – P. 103.
3. Carrillo-Varela, I., Vidal, C., Vidaurre, S., Parra, C., Machuca, Á., Briones, R., Mendonça, R. T. Alkalization of kraft pulps from pine and eucalyptus and its effect on enzymatic saccharification and viscosity control of cellulose // Polymers. – 2022. – Vol. 14. - №. 15. – P. 3127.
4. Semenova, M. V., Gusakov, A. V., Telitsin, V. D., Rozhkova, A. M., Kondratyeva, E. G., Sinitsyn, A. P. Purification and characterization of two forms of the homologously expressed lytic polysaccharide monooxygenase (PvLPMO9A) from *Penicillium verruculosum* // BBA – Proteins and proteomics. – 2019. – P. 1-8

УДК 579.66

СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ФЕРМЕНТА АЦИЛАМИДАЗЫ ИЗ БАКТЕРИЙ *RHODOCOCCUS* - ПРОМЫШЛЕННЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ

Шемякина А.О.[1], **Серкина А.В.** [2], **Булушова Н.В.** [2], **Лавров К.В.** [1], **Яненко А.С.**[1]

[1] *КК НБИКС, НИЦ «Курчатовский институт», Лаборатория генетики и биотехнологии корине- и нокардиоподобных микроорганизмов, Москва, РФ*
[2] *КК НБИКС, НИЦ «Курчатовский институт», Лаборатория химии белка, Москва, РФ*
shemyakina_ao@nrcki.ru

Аннотация. Ациламидаза из *Rhodococcus erythropolis* TA37 перспективна для биокаталитического синтеза N-замещённых акриламидов. Анализ субстратной специфичности очищенной ациламидазы показал, что ненасыщенная связь в молекуле акриламида и его N-замещённых гомологов значительно снижает удельную активность фермента. Собраны данные для разработки рационального дизайна ациламидазы, для увеличения её активности и расширения субстратной специфичности.

Ключевые слова: ациламидаза, субстратная специфичность, N-замещенные акрилмиды.

Ациламидаза (КФ 3.5.1.4) из бактериального штамма *Rhodococcus erythropolis* TA37 способна синтезировать модифицированные (N-замещенные) акриламиды N-изопропилакриламид (N-ИПАА) и N,N-диметиламинопропилакриламид (N,N-ДМАПАА) [1]. Введение N-замещенных акриламидов в состав мономеров в акриловых полимерах позволяет управлять физико-химическими свойствами водорастворимых полимеров – степенью полимерности, растворимостью, способностью связывать различные вещества, и другими практически важными свойствами. Один из видов полимеров, содержащих N-замещённые акриламиды, т.н. «смарт-полимеры», способны скачкообразно и обратимо менять свои свойства в зависимости от внешних стимулов, таких как pH и температура [2]. Широкий спектр водорастворимых и водонабухающих акриловых полимеров находит применение в медицине и косметологии, сельском хозяйстве, очистке сточных вод, нефте- и газодобывающей промышленности [2].

На основе ациламидазы проводится разработка биокаталитической альтернативы химическому синтезу N-замещённых акриламидов, который требует жёстких условий и использования токсичных реагентов. Биокатализаторы для такого синтеза конструируются в форме цельноклеточных катализаторов, с использованием уникальной высокоэффективной системы экспрессии генов в бактериях *Rhodococcus* [3]. Цельноклеточные биокатализаторы на основе штамма *Rhodococcus rhodochrous* M33 показали свою эффективность в промышленном синтезе акриловых мономеров благодаря способности синтезировать большие количества целевого фермента, проницаемости клеточной стенки для субстратов и продуктов синтеза, и механической устойчивости клеток [4].

Исследования ациламидазы, перспективного фермента для промышленного синтеза N-замещённых акриламидов, направлены на повышение её каталитической активности, и расширение спектра субстратной специфичности в отношении N-замещенных акриламидов. Отличием ациламидазы от многих известных амидаз является способность гидролизовать именно N-замещенные амиды R_1-CONH-R_2. Это производные простых амидов R_1-$CONH_2$, в которых один из водородов при атоме азота замещён на какой-либо радикал. Конечной целью исследований является выявление структурных детерминант субстратной специфичности ациламидазы. Задачами настоящей работы было тестирование субстратной специфичности выделенной в чистом виде ациламидазы, с серией амидных субстратов, различающихся составом ацильного (R_1) и N-замещающего (R_2) радикалов.

Фермент выделяли из биомассы штамма *R. rhodochrous* M33 aam [5]. Штамм выращивали в условиях максимальной индукции экспрессии фермента. После обработки биомассы ультразвуком фермент очищали с помощью анионообменной хроматографии на колонке HiTrap Q FF, элюируя градиентом концентрации NaCl и затем гель-проникающей хроматографии на колонке Superdex™ 200 10/300 GL,

концентрируя раствор с помощью фронтальной ультрафильтрации в кювете Amicon. Был получен препарат фермента с концентрацией белка - 11 мг/мл, с долей ациламидазы не менее 95% по данным аналитической гель-фильтрации. Субстратную специфичность ациламидазы определяли по скорости гидролиза амидов. Ферментативные реакции с различными субстратами проводили в объеме 200-300 мкл при 37°C, pH 8 (10 мМ Tris/HCl буфер), варьируя концентрацию субстрата (0,15-135 мМ), фермента (0,0001-1 мкМ) и время реакции (5-30 мин) в зависимости от субстрата; останавливали реакцию добавлением HCl конц до 1% объема.

Среди лучших субстратов для ациламидазы (удельные активности в пределах 25-90 мкмоль·мин$^{-1}$·мг$^{-1}$ белка) оказались как замещённые амиды, так и незамещённые (по порядку убывания: пропионамид, *n*-нитропропионанилид (НПА), *n*-нитроацетанилид, ацетамид, N-изопропилпропионамид (N-ИППА), *n*-нитроакриланилид (НАкА), бутирамид). Удельная активность ациламидазы по этим субстратам оказалась сходна с удельной активностью амидаз из нитрилазного и GGSS-семейства [6]. В группу менее оптимальных субстратов (активности <10 мкмоль·мин$^{-1}$·мг$^{-1}$ белка) также попали замещённые и незамещённые амиды (N,N–диметиламинопропилпропионамид (N,N-ДМАППА), акриламид, N-ИПАА, N,N-ДМАПАА, N-изопропилметакриламид (N-ИПМАА), N-третбутилакриламид (N-тБАА)). Однако бросалось в глаза, что отличием второй группы от первой являлось наличие ненасыщенности в ацильном радикале. Единственным исключением оказался *n*-нитроакриланилид, амид с ненасыщенным ацильным радикалом, вошедший в первую группу лучших (см рис. 1).

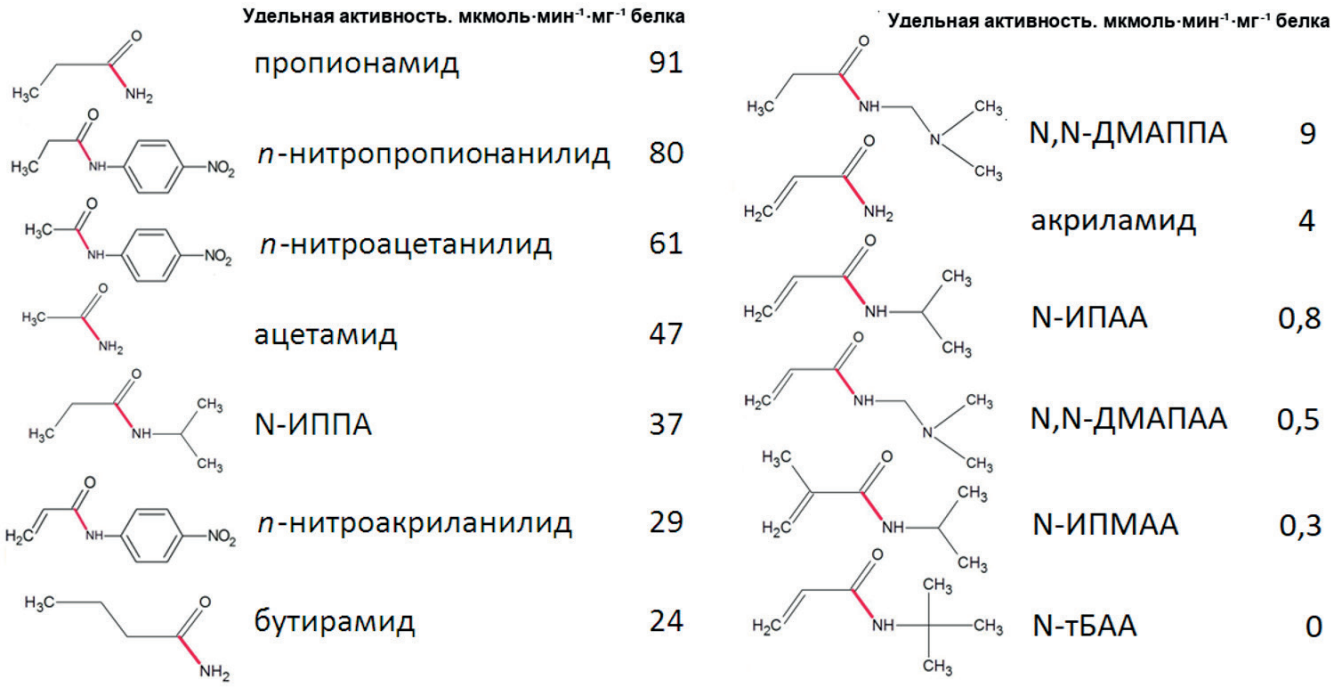


Рисунок 1. Удельная активность гидролиза незамещённых и N-замещённых амидов ациламидазой. Гидролизуемая связь выделена красным.

В настоящей работе мы рассматривали тестируемые амиды с точки зрения двух их структурных детерминант, расположенных по разные стороны от гидролизуемой связи – ацильного радикала («обязательная» часть молекулы), и заместителя при азоте (вводимая часть молекулы). Введение в амид заместителя при атоме азота меняло активность ациламидазы не очень значительно, в пределах одного порядка (снижало для алифатических заместителей, и повышало/не снижало для ароматического заместителя - *n*-нитроанилина). Исключением оказался N-тБАА, активность с которым измерить не удалось, что указывает на сильное влияние трет-бутилового заместителя. Отличия в эффекте алифатических и ароматического заместителя могут объясняться лучшим позиционированием *n*-нитроанилина в активном центре, благодаря предполагаемым для него стекинговым контактам с ароматическими аминокислотными остатками фермента [7].

Что касается ацильного радикала, то появление в нём ненасыщенной связи снижало активность более чем на порядок (пропионамид/акриламид, N-ИППА/N-ИПАА, N,N-ДМАППА/N,N-ДМАПАА и за исключением НПА/НАкА). Причиной такого существенного различия может быть изменённая молекулярная динамика ненасыщенной связи, и, как следствие, увеличенная по сравнению с насыщенной связью ригидность этой части молекулы. Также, наличие двойной связи может приводить к смещению электронной плотности в карбонильной группе, что может снизить её электрофильность и, как следствие, эффективность её стабилизации в оксианионной полости ациламидазы [7].

Наиболее вероятно, что активность ациламидазы по отношению к ненасыщенным амидам более ограничена тем из двух каталитических карманов ациламидазы, в котором связывается ацильная часть молекулы амида. В то же время, неспособность гидролизовать амид с терт-бутильным заместителем при азоте указывает на существующие ограничения и в другом каталитическом кармане. Полученные данные позволят сфокусировать усилия по рациональному дизайну ациламидазы с целью увеличения её активности и расширения субстратной специфичности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Соглашение о развитии геномных центров мирового уровня номер 075-15-2025-527).

Список литературы

1. Lavrov K.V., Larikova G.A., Yanenko A.S. Novel biocatalytic process of N-substituted acrylamide synthesis // Applied biochemistry and microbiology. – 2013. – Vol. 49. – No. 8. – P. 702–705.
2. Su X., Feng Y. Thermoviscosifying smart polymers for oil and gas production: state of the art // ChemPhysChem. – 2018. – Vol. 19. – No. 16. – P. 1941–1955.
3. Shemyakina A.O. et al. New Tools for Stable Highly Efficient Gene Expression in *Rhodococcus* spp //Applied Biochemistry and Microbiology. – 2024. – Vol. 60. – No. 9. – P. 1638–1647.
4. Lavrov K.V. et al. A new concept of biocatalytic synthesis of acrylic monomers for obtaining water-soluble acrylic heteropolymers //Metab. Eng. Commun. – 2024. – Vol. 18. – P. e00231.
5. Lavrov K.V. et al. New cblA gene participates in regulation of cobalt-dependent transcription of nitrile hydratase genes in *Rhodococcus rhodochrous* // Research in microbiology. – 2018. – Vol. 169. – No. 4-5. – P. 227–236.
6. Pertsovich, S.I., Guranda, D.T., Podchernyaev, D.A., Yanenko, A.S., Švedas, V.K.. Aliphatic amidase from *Rhodococcus rhodochrous* M8 is related to the nitrilase/cyanide hydratase family // Biochemistry (Moscow). – 2005. – Vol. 70. – No. 11. – P. 1280–1287.
7. Ko, H.J., Lee, E.W., Bang, W.G., Lee, C.K., Kim, K.H., Choi, I.G. Molecular characterization of a novel bacterial aryl acylamidase belonging to the amidase signature enzyme family // Molecules and cells. – 2010. – Vol. 29. – No. 5. – P. 485–492.

ИНТЕГРАЦИЯ ЭЛЕКТРОХИМИИ И БИОМЕДИЦИНЫ: ФЕРМЕНТНЫЕ, ДНК И КЛЕТОЧНЫЕ БИОСЕНСОРЫ

Шумянцева В.В., Агафонова Л.Е., Масамрех Р.А., Филиппова Т.А., Кострюкова Л.В., Жданов Д.Д., Кузиков А.В.

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, 119121 Погодинская ул., д.10
viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

Электрохимические **цитохром Р450-системы** были исследованы как в режиме **биосенсоров** для регистрации субстрат-ингибиторного потенциала и поиска потенциальных лекарств среди новых химических соединений. Разработаны подходы для использования цитохром Р450-электродов в режиме электрохимических **нанобиореакторов** для электроферментативного синтеза биологически активных соединений. Исследованы электрокаталитические цитохром Р450 3А4 и Р450 2С9 системы как наиболее функционально-значимые изоформы в режиме перехода от 2Д к 3Д сенсору за счет включения фермента в **нанопоры** на рабочем электроде, образованные регулярными нанопоровыми мембранами анодного оксида алюминия (Anodisc 13) или порообразующего белка стрептолизина О, а также биоконъюгаты ферментов с флавиновыми нуклеотидами как модели электрон-транспортной цепи переноса электронов. Исследованы биосенсоры на основе бактосом как эффективных моделей систем микросомального окисления, содержащие цитохромы Р450 3А4 и 2С9. Исследовано влияние молекулярного краудинга на электрокаталитические цитохром Р450-системы. Разработанные подходы позволили увеличить эффективность электрокаталитических цитохром Р450-систем на 20-200 %. Разработана двухэлектродная система, работающая в двух диапазонах потенциалов, для оценки каталитической активности цитохромов Р450 3А4, 2С9, 2С19, 19А1, 2Е1.Разработан **ферментный сенсор** для анализа каталитической активности аспарагиназы *Erwinia carotovora* в системах с иммобилизованным ферментом. В присутствии субстрата аспарагина регистрируется концентрационно-зависимое снижение интенсивности сигналов электроокисления белка, что позволило рассчитать значение электрохимической константы Михаэлиса, которая была сравнима с этим параметром для реакции в растворе. Рассчитаны константы связывания лекарств с ДНК по отдельным гетероциклическим основаниям (гуанин, аденин, тимин). Анализ кинетических, термодинамических и электрохимических параметров позволяет классифицировать механизмы взаимодействия в системе ДНК – лиганд. Определены ДНК-опосредованные коэффициенты токсического влияния препаратов на ДНК. Разработаны биосенсоры для исследования токсического эффекта лекарственных препаратов на **клеточные линии** Wi38, MCF-7, HepG2, MDA-MB-231.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период, 2021–2030 годы (№ 122030100168-2).

УДК 57.083.3:543.55:602.13

МИКРОФЛЮИДНАЯ БИОАНАЛИТИЧЕСКАЯ ПЛАТФОРМА ЗАКРЫТОГО ТИПА НА МАГНИТНЫХ МИКРОЧАСТИЦАХ С ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ СИГНАЛА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВЫХ МАРКЕРОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Юрина Л.В.[1], Прусаков К.А.[2], Сорокина О.Н.[1], Воробьёва А.К.[1], Константинова Т.С.[1], Ерёменко А.В.[1], Басманов Д.В.[2], Курочкин И.Н.[1,3]

[1] Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия
[2] ФНКЦ Физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА, Москва, Россия
[3] Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
lyu.yurina@gmail.com

Аннотация. Описан метод определения белкового маркера в сыворотке крови с помощью ИФА на магнитных микрочастицах с электрохимической детекцией. Разработана микрофлюидная платформа для автоматизации анализа в картридже. Разработанная микрофлюидная установка успешно апробирована на примере определения NT-proBNP. Результаты показали хорошую корреляцию с ручным методом анализа, подтверждая перспективность автоматизированной биоаналитической системы.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ, магнитные микрочастицы, электрохимическая детекция, микрофлюидный картридж, серодиагностика.

Разработан метод иммуноферментного анализа на магнитных микрочастицах с электрохимическим детектированием сигнала для определения кардиомаркеров в сыворотке крови человека. Этот метод включает пять ключевых этапов (рис. 1):

1 - инкубация целевого антигена (АГ) с магнитными частицами, модифированными антителами, специфичными к антигену (МЧ-АТ) и Антителами, меченными ферментом (АТ-Ф);

2 - формирование на поверхности магнитных микрочастиц иммунокомплексов (МЧ-АТ-(АГ)-АТ-Ф);

3 - удаление несвязавшихся компонентов с помощью магнитной сепарации или фильтрации;

4 - ферментативное образование электрохимически активного продукта в результате конверсии субстрата;

5 - измерение электрохимического сигнала.

Подход сочетает специфичность иммуноаффинного захвата с чувствительностью электрохимической детекции, что позволяет точно количественно определять АГ в образце.

Апробация метода проводилась на образцах сыворотки крови человека в которых определямым антигеном являлся N-концевой фрагмент мозгового натрийуретического пептида (NT-proBNP). Магнитные микрочастицы и ферментная метка (щелочная фосфатаза) были функционализированы антителами, специфичными к целевому АГ. Сборка иммунологического комплекса проводилась в одну стадию в сыворотке крови человека. В качестве ферментативного субстрата использовали щелочной раствор (pH 9,6-9,8) мононатриевой соли 1-нафтилфосфата. Получаемый продукт ферментативной реакции (1-нафтол) регистрировали методом дифференциально-импульсной вольтамперометрии на одноразовых электродах, изготавливаемых методом трафаретной печати, с золотым рабочим электродом (vs. Ag/AgCl) (рис. 1). Этот анализ был реализован в ручном режиме в пробирке [1] и в автоматизированном режиме с использованием микрофлюидного картриджа [2].

Для реализации автоматизированного ИФА на магнитных частицах с электрохимической детекцией сигнала была разработана закрытая микрожидкостная система на основе многослойного картриджа (рис. 2*а*). Платформа объединяет аналитические и инженерные решения, позволяя выполнять полный анализ без ручного вмешательства. Управление током жидкости в картридже осуществляется с помощью контроллера микрожидкостного потока OB1 MK3+ (Elveflow, Франция) путем создания разрежения. Система поворотных клапанов (рис. 2*а*, элемент 2) используется для переключения между резервуарами и потоками (рис. 2*а*, элементы 1, 4 и 5), предотвращая перекрестную контаминацию и гарантируя стабильную подачу реагентов. В качестве резервуара для проведения реакций анализа используется специальная реакционная камера с фильтрующим дном (рис. 2*а*, элемент 3) из гидрофильной мембраны с размером пор 0,45 мкм.



Рисунок 1. Общий принцип проведения иммуноферментного анализа на магнитных частицах с электрохимическим детектированием сигнала в пробирке (вверху) и в картридже (внизу)

На рисунке 3 представлена корреляционная зависимость интенсивности ЭХ сигнала для измерений NT-proBNP проводимых в пробирке и микрофлюидном картридже в образцах сыворотки крови. Корреляционная зависимость описывается уравнением линейной регрессии $y = 0.54x+0.1$.

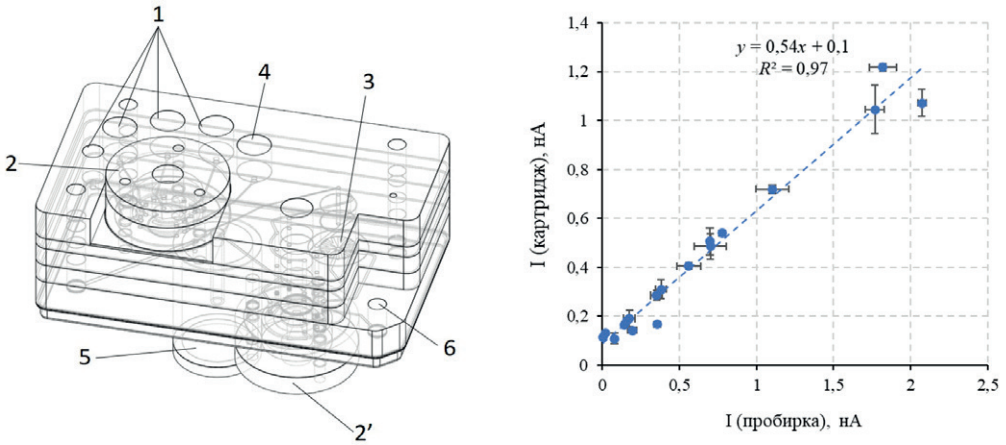


Рисунок 2. *а* – Схема микрофлюидного картриджа для проведения иммуноферментного анализа на микрочастицах с электрохимическим детектированием сигнала; *б* – Корреляционная зависимость ЭХ сигнала между измерениями NT-proBNP в сыворотке крови человека, проводимыми в пробирке и микрофлюидном кардридже в автоматическом режиме

Результаты проведения анализа по детектированию NT-proBNP в сыворотке крови человека в микрофлюидном картридже в автоматическом режиме хорошо коррелируют с данными, полученными в пробирке (R^2 = 0.97). Таким образом, предложенное устройство лаборатории на чипе для проведения ИФА на микрочастицах с ЭХ детектированием представляется перспективным для клинической диагностики белковых маркеров в биологических образцах.

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (за счет средств гос. задания по теме 122041400080-0).

Список литературы

1. Сорокина О.Н., Константинова Т.С., Воробьева А.К. и др. Иммуноферментный анализ на магнитных микрочастицах с электрохимическим детектированием сигнала для определения NT-proBNP в сыворотке крови человека // Журнал аналитической химии. – 2025. – Т. 80. – № 11. – С. 1224-1233.
2. Prusakov K.A., Aldarov K.G., Sorokina O.N., et al. Automatic disposable microfluidic cartridge system for ELISA on microbeads with electrochemical detection // Talanta. – 2026. – Vol. 15. – No. 302. – P. 129427.

УДК 615.014.6

СВОЙСТВА КОМПЛЕКСНЫХ МИКРОЧАСТИЦ ВАТЕРИТА С ФУКОИДАНОМ, ЛАКТОФЕРРИНОМ И КАТАЛАЗОЙ

Мосиевич Д.В.[1], Балабушевич Н.Г.[1], Мишин П.И.[1], Филатова Л.Ю.[1], Вахрушева Т.В.[2], Образцова Е.А.[2], Панасенко О.М.[2], Михальчик Е.В.[2]

[1]Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, РФ
[2]Научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина, Москва, РФ
dankir98@gmail.com

Аннотация. В работе исследованы комплексные гибридные микрочастицы ватерита с соосажденными фукоиданом и лактоферрином и адсорбированной каталазой. Микрочастицы продемонстрировали pH-чувствительность, пролонгированное высвобождение компонентов в средах, моделирующих желудочно-кишечный тракт человека, защитные свойства в отношении активности каталазы при воздействии низких pH и протеаз, антиоксидантное и противовоспалительное действие. Комплексные микрочастицы перспективны при лечении воспалительных заболеваний кишечника.

Ключевые слова: карбонат кальция, микрокапсулирование, пролонгированное высвобождение, протеазы, защитное действие

При воспалениях слизистой оболочки кишечника наблюдается местное повышение уровня пероксида водорода, что обуславливает необходимость доставки в участки воспаления каталазы [1, 2]. Перспективным средством доставки фермента являются многокомпонентные и многофункциональные микрочастицы на основе дешевого, легкого в получении и pH чувствительного карбоната кальция в форме ватерита [3]. Особый интерес представляют микрочастицы с включением фукоидана и лактоферрина благодаря их противовоспалительной активности [4].

Цель работы – получение комплексных гибридных микрочастиц ватерита с фукоиданом, лактоферрином и каталазой, исследование их защитных свойств от воздействия агрессивных сред желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и противовоспалительных эффектов.

При получении гибридных микрочастиц ватерита (далее ССФЛ) с сульфополисахаридом фукоиданом из бурых водорослей (Ф, pKa сульфогрупп 1 - 2,5) и рекомбинантным человеческим лактоферрином из молока трансгенных коз (Л, 80 кДа, pI 8,0-8,5) предварительно был сформирован их полиэлектролитный комплекс (ФЛ) и далее соосажден при сливании растворов солей, содержащих ионы кальция и карбоната (рис. 1), как описано в [4].

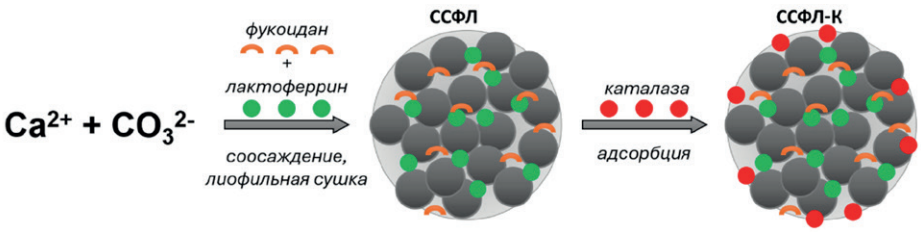


Рис. 1. Схема получения комплексных микрочастиц ватерита с фукоиданом, лактоферрином и каталазой.

Для включения каталазы использовали адсорбцию на гибридных частицах (далее ССФЛ-К). Частицы ССФЛ и ССФЛ-К имели сферическую форму с диаметром 2 - 4 мкм, что соответствовало полиморфной модификации ватерита, содержали около 3 % лактоферрина и 8 - 10 % фукоидана и имели

отрицательный ζ-потенциал. Содержание адсорбированной каталазы в ССФЛ-К составляло 10 мг/г частиц, а сохранение ее активности - 97 % по сравнению с нативным ферментом.

Исследовали влияние pH среды и времени инкубации на свойства микрочастиц ССФЛ-К в условиях, моделирующих прохождение ЖКТ человека, при последовательной инкубации 1 ч при pH 3, 1 ч в 0,1 М фосфатном буфере с pH 6 и 4 ч в 0,1 М фосфатном буфере с pH 7 (рис. 2 А).

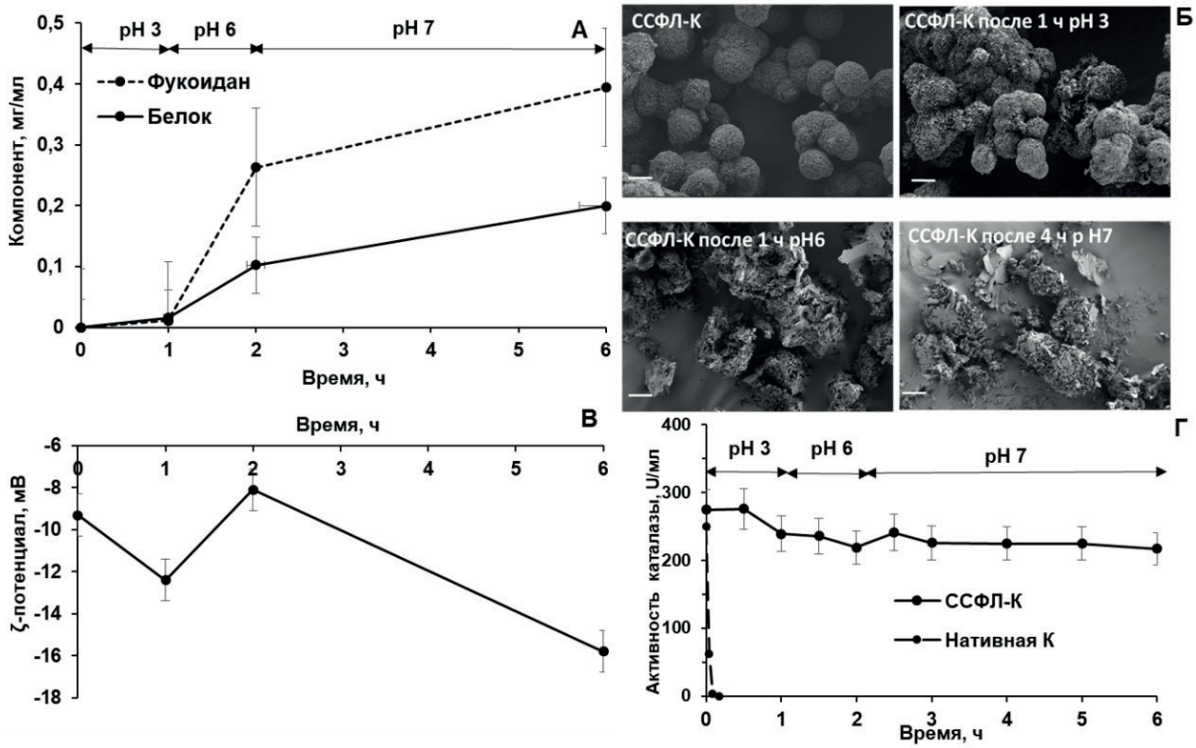


Рис. 2. Влияние времени и pH сред, моделирующих прохождение ЖКТ, на свойства микрочастиц ССФЛ-К: накопительное высвобождение компонентов (А), морфологию частиц по данным СЭМ (Б), изменение ζ-потенциала частиц (В) и активность каталазы в суспензии по разложению пероксида водорода (Г). Масштабная линейка 2 мкм.

По данным сканирующей электронной микроскопии (СЭМ, рис. 2 Б) при последовательной инкубации при различных pH наблюдалось изменение морфологии микрочастиц, что связано с частичным растворением карбоната кальция и образованием фосфатов кальция, что подтверждалось существенным увеличением фосфора в элементном составе поверхности частиц по данным энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии. Высвобождение фукоидана, проанализированное фенол-серным методом, и белка, определенное по методу Лоури, во время инкубации при pH 3 было незначительным, усиливалось при pH 6 и снижалось при pH 7 (рис. 2 А). При инкубации при pH 3 активность нативной каталазы полностью терялась, а для адсорбированной каталазы уменьшалась только на 13 % (рис. 2 Г) и при последующем инкубировании частиц в средах с pH 6 и 7 практически не изменялась. ζ-потенциал микрочастиц ССФЛ-К (рис. 2 В) даже после воздействия модельных сред оставался отрицательным, что важно для их адсорбции в зонах воспаления слизистой оболочки, характеризующихся повышенной концентрацией положительно заряженных белков [2].

Далее анализировали изменение активности адсорбированной каталазы при инкубации в течение 2 ч в среде, моделирующей среду сока желудка с pH 1,2 и содержащей 0,1 мг/мл пепсина, и в нейтральной среде, соответствующей соку тонкого кишечника и содержащей 0,023 мг/мл трипсина. Под действием пепсина в кислой среде нативная каталаза полностью инактивировалась в течение 5 мин, в то время как адсорбированная через 2 ч сохранялось 30 % активности. Под действием трипсина адсорбированная каталаза через 2 ч сохранила соответственно на 15 % больше активности по сравнению с нативным ферментом. Защитные свойства гибридных частиц связаны как с локальным повышением pH в кислой

среде в результате частичного растворения карбоната кальция, так и с наличием на их поверхности фукоидана, создающего стерические затруднения для воздействия протеаз на адсорбированную каталазу.

В опытах in vitro было продемонстрировано, что адсорбированная каталаза оказывала антиоксидантное действие при взаимодействии микрочастиц ССФЛ-К с нейтрофилами. В эксперименте in vivo было показано, что частицы с ССФЛ и ССФЛ-К обладают антиоксидантными свойствами при интраперитонеальном введении крысам.

Таким образом, в работе в водных растворах получены комплексные гибридные микрочастицы ватерита, содержащих фукоидан, лактоферрин и каталазу. Микрочастицы имели отрицательный ζ-потенциал, что важно для доставки в области воспаления кишечника, обогащенных положительно заряженными белками, и характеризовались высоким сохранением активности адсорбированной каталазы. Микрочастицы на основе ватерита показали pH-чувствительные свойства, пролонгированно высвобождали фукоидан и лактоферрин в условиях, моделирующих прохождение ЖКТ человека, защищали иммобилизованную каталазу от действия низких pH, пепсина желудка и трипсина кишечника. По мере продвижения по модельным средам ЖКТ наблюдалось частичное растворение микрочастиц и их преобразование в фосфаты кальция. Показано проявление микрочастицами антиоксидантного и противовоспалительного действия. Разработанные комплексные гибридные микрочастицы могут быть перспективными для пероральной доставки и защиты от образования пероксида водорода при воспалительных заболеваниях кишечника.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке регистрационной темы 121041500039-8 МГУ имени М.В. Ломоносова и оборудования, приобретенного на средства Программы развития (установка Zetasizer Nano ZS) МГУ имени М.В. Ломоносова.

Список литературы

1. Zhang X., Zhu Y., Xiong Z., et al. Broad-Spectrum ROS/RNS Scavenging Catalase-Loaded Microreactors for Effective Oral Treatment of Inflammatory Bowel Diseases // Small. – 2025. – Vol. 21. – No. 23. – Art. e2501341.

2. Yu Y., Zhao X., Xu X., et al. Rational Design of Orally Administered Cascade Nanozyme for Inflammatory Bowel Disease Therapy // Adv. Mater. – 2023. – Vol. 35. – No 44. – e2304967.

3. Trushina D.B., Borodina T.N., Belyakov S., Antipina M.N. Calcium carbonate vaterite particles for drug delivery: Advances and challenges // Mater Today Adv. – 2022. – Vol. 14. – Art. 100214.

4. Mosievich D.V., Balabushevich N.G., Mishin P.I., et al. Vaterite/Fucoidan Hybrid Microparticles: Fabrication, Loading of Lactoferrin, Structural Characteristics and Functional Properties // Mar. Drugs. 2025. – Vol. 23. – No. 11. – Art. 428.

УДК: УДК 616-006-074-08:577.15

МАТРИКСНЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ В ОНКОЛОГИИ: БИОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ И МИШЕНИ МОЛЕКУЛЯРНО-НАПРАВЛЕННОЙ ТЕРАПИИ

Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, РФ
kne3108@gmail.com

Аннотация. Представлены результаты исследования диагностического и прогностического значения матриксных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов при различных злокачественных новообразованиях, а также перспективы использования этих молекул в качестве мишеней и/или компонентов специфической молекулярно-направленной противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: матриксные металлопротеиназы, опухоли человека, диагностика, прогноз, таргетная терапия.

Матриксные металлопротеиназы (ММП) – семейство, состоящее из более 20 секретируемых или связанных с поверхностью клетки цинк-зависимых эндопептидаз, способствующих деградации практически всех компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ), вовлечены во все этапы опухолевого процесса, в особенности, в инвазию и метастазирование [1]. В зависимости от структурно-функциональных особенностей и субстратной специфичности ММП делят на несколько подсемейств. Основными из них являются коллагеназы широкого спектра действия (ММП-1, ММП-8, ММП-13), желатиназы/специфические коллагеназы коллагена IV типа (ММП-2 и ММП-9), стромелизины (ММП-3 и ММП-10), матрилизины (ММП-7 и ММП-26) и ММП мембранного типа. Активация ММП в межклеточном пространстве специфически подавляется эндогенными тканевыми ингибиторами (ТИМП), которые соединяются с цинк-связывающими участками ММП в эквимолярном соотношении [2]. ТИМП образуют комплексы как с активными формами ММП, так и с их секретируемыми проферментами, регулируя таким образом их активность. Семейство ТИМП состоит из четырех структурно родственных белков, три из которых (ТИМП-1, ТИМП-2, ТИМП-4) секретируются в растворимой форме, а один (ТИМП-3) связан с ВКМ. По своей структуре ТИМП высоко специфичны к активному связывающему участку ММП (по принципу ключ-замок) и ингибируют весь спектр ММП.

Нами проведено иммуноферментное исследование содержания ММП и ТИМП в опухолях, окружающей гистологически неизмененной ткани и плазме/сыворотке крови 447 больных в возрасте от 15 до 75 лет в различных стадиях онкологического заболеваниями в зависимости от их клинико-морфологических особенностей для выявления наиболее перспективных прогностических и диагностических биологических маркеров [3-5]. Обследовали 102 больных опухолями яичников, 99 – колоректальным раком (КРР), 102 – раком желудка (РЖ), 99 – почечно-клеточным раком (ПКР), 45 – раком молочной железы (РМЖ). У больных КРР, РМЖ и РЖ параллельно с опухолью исследовали участки гистологически неизмененной гомологичной ткани. Контрольную группу составили 150 здоровых добровольцев соответствующего возраста и пола. Содержание маркеров определяли стандартными наборами для прямого ИФА («R&D Systems», «Invitrogen», США).

При исследовании тканевого содержания ММП наиболее часто отмечалось увеличение уровней ММП-7: ее уровень повышен в опухолях по сравнению с окружающей гистологически неизмененной тканью у 88% больных КРР, 70% РЖ и 76% РМЖ. При сравнении опухолей и неизмененных тканей при всех исследованных локализациях выявлено также увеличение экспрессии ММП-2. У больных КРР и РЖ достоверно повышена также концентрация ММП-9 в опухолевой ткани. Однозначной взаимос-

вязи внутриопухолевых концентраций ММП и ТИМП с клинико-морфологическими особенностями исследованных онкологических заболеваний, являющимися значимыми факторами прогноза, выявить не удалось. Таким образом, увеличение экспрессии ММП-7, которая помимо разрушения компонентов ВКМ, участвует также в процессинге некоторых биологически важных молекул клеточной поверхности и, в отличие от других ММП, синтезируется преимущественно опухолевыми клетками, следует признать наиболее универсальным изменением в системе ММП-зависимого протеолиза, характерным для опухолей различного гистогенеза.

ММП-7 оказалась также перспективным серологическим маркером исследованных опухолей. Ее уровень в сыворотке или плазме крови достоверно повышен по сравнению с контрольной группой здоровых добровольцев у больных РЯ, КРР, РЖ, ПКР, саркомами и пограничной гигантоклеточной опухолью кости. В наибольшей степени значение ММП-7 как серологического маркера проявилось при РЯ: чувствительность относительно контроля при 95%-ной специфичности составила 78%. Уровень ММП-7 в сыворотке крови достоверно положительно коррелировал с ключевыми показателями распространенности РЯ, а также с уровнем классического сывороточного маркера для РЯ СА-125. При КРР оптимальное соотношение специфичности (70%) и чувствительности (71%) отмечено при использовании порогового уровня 1,8 нг/мл. Уровни других ММП и ТИМП в сыворотке/плазме крови обследованных пациентов были либо недостоверно увеличены, либо понижены по сравнению с показателями группы контроля. Значимых ассоциаций с клинико-морфологическими критериями распространенности процесса и прогноза заболеваний для большинства из них также не обнаружено.

Одной из важных задач было выяснение вопроса о том, в какой мере изменение продукции ММП и ТИМП в опухоли отражается на их концентрации в периферической крови. В общей группе больных новообразованиями яичников мы выявили не сильные, но значимые положительные корреляции уровней всех трех ММП в сыворотке крови и ткани опухоли, усиливавшиеся для ММП-7 и ММП-9 в группе больных РЯ и не проявлявшиеся у больных доброкачественными и пограничными новообразованиями яичников. У больных КРР положительная корреляция циркулирующих и внутриопухолевых концентраций обнаружена только для ММП-9, а у больных РЖ – только для ММП-7.

У больных КРР и РМЖ кровь исследовали дважды – до начала лечения и через 5-27 дней после хирургического удаления опухоли. После удаления опухоли происходили разнонаправленные изменения уровней маркеров у отдельных больных. В целом, характер изменений содержания ММП и ТИМП в периферической крови онкологических больных после удаления первичной опухоли свидетельствует о неопухолевом происхождении, по крайней мере, части циркулирующих белков.

Отсутствие четкой взаимосвязи уровней исследованных ММП и ТИМП в опухолях с ключевыми клинико-морфологическими характеристиками не исключало их потенциальной роли в качестве независимых факторов прогноза выживаемости больных. Перспективными маркерами могли стать и уровни этих маркеров в периферической крови. Анализ выживаемости обследованных пациентов в зависимости от уровней различных ММП в сыворотке или плазме крови показал, что факторами, влияющими на прогноз КРР, РЖ, ПКР, РЯ, являются ММП-7, ММП-2, ТИМП-1. При многофакторном анализе уровни ММП-7 и ТИМП-1 в плазме крови оказались независимыми факторами прогноза общей выживаемости больных КРР наряду с показателем отдаленного метастазирования критерием М системы TNM.

В связи с той ролью, которую ММП играют в ключевых процессах распространения опухолей – местной инвазии и отдаленном метастазировании, их рассматривают как потенциальные мишени для таргетной терапии. На экспериментальных моделях разработано несколько подходов к использованию ММП в качестве мишеней: 1) блокирование синтеза ММП; 2) подавление взаимодействия ММП с молекулами, направляющими их к клеточной поверхности и межклеточному пространству; 3) ингибирование ферментативной активности ММП.

Прямое подавление синтеза ММП осуществляется, в частности, с помощью трансфекции в клетки антисмысловых (ас) мРНК или олигонуклеотидов. Однако вопрос о возможности использования подобных технологий в клинической практике остается пока открытым. Кроме того, на уровень экспрессии ММП могут опосредованно повлиять препараты, направленные на передачу сигналов различных тирозинкиназных рецепторов (факторов роста, цитокинов).

Подавление взаимодействия ММП с белками клеточной поверхности также может заблокировать важные для инвазии проявления их активности в межклеточном пространстве. Перспективной мишенью в этом плане является взаимодействие с интегринами и кадгеринами, способствующее, в частности, слущиванию клеток рака яичников с поверхности опухоли, их диссеминации по брюшине и образованию асцита.

Ингибирование ферментативной активности ММП – самый прямой путь влияния на их проинвазивную и прометастатическую активность. Сначала самым очевидным подходом представлялось использование их природных тканевых ингибиторов. В экспериментальных исследованиях был даже продемонстрирован противоопухолевый эффект ТИМП-2 и ТИМП-4, но возможности системного введения ТИМП ограничены потому, что они обладают независимой от ММП проканцерогенной и проангиогенной активностью. В связи с этим были предложены высокоспецифичные синтетические ингибиторы ММП (большинство из них – производные гидроксамовой кислоты), которые могли бы достигать эффективных концентраций в крови и вызывать регрессию опухоли. Клинические испытания проходили 5 ингибиторов ММП: маримастат – при ранних стадиях рака поджелудочной железы; BMS-275291 – при прогрессирующем немелкоклеточном раке легкого; приномастат – при ранних стадиях различных солидных опухолей; метастат – при саркоме Капоши; неовастат – при неоперабельном раке почки. Но при использовании этих препаратов возникли различные проблемы.

В настоящее время разрабатываются ингибиторы ММП следующего поколения, обладающие высокой специфичностью к ММП одного типа. Изучение спектра, уровня и соотношения экспрессии различных видов ММП и их тканевых ингибиторов, их биологического и прогностического значения может оказаться полезным для разработки и эффективного применения новых ингибиторов ММП, специфичных для опухолей определенной локализации и/или для конкретного больного.

Список литературы

1. Deryugina E.I., Quigley J.P. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis // Cancer Metastasis Rev. – 2006. – Vol. 25. – No 1. – P. 9-34.

2. Ramnath N., Creaven P.J. Matrix metalloproteinase inhibitors // Curr. Oncol. Rep. – 2004. – Vol. 6. – No 2. – P. 96-102.

3. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Клинические перспективы исследования ассоциированных с опухолью протеаз и их тканевых ингибиторов у онкологических больных // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2014. – № 5. – С. 16-27.

4. Герштейн Е.С., Короткова Е.А., Петросян А.П., Сулейманов Э.А., Стилиди И.С., Кушлинский Н.Е. Прогностическое значение компонентов сигнальной системы VEGF и матриксных металлопротеиназ в сыворотке крови больных раком желудка // Клиническая лабораторная диагностика. – 2021. – Том 66. – № 11. – С. 650-654.

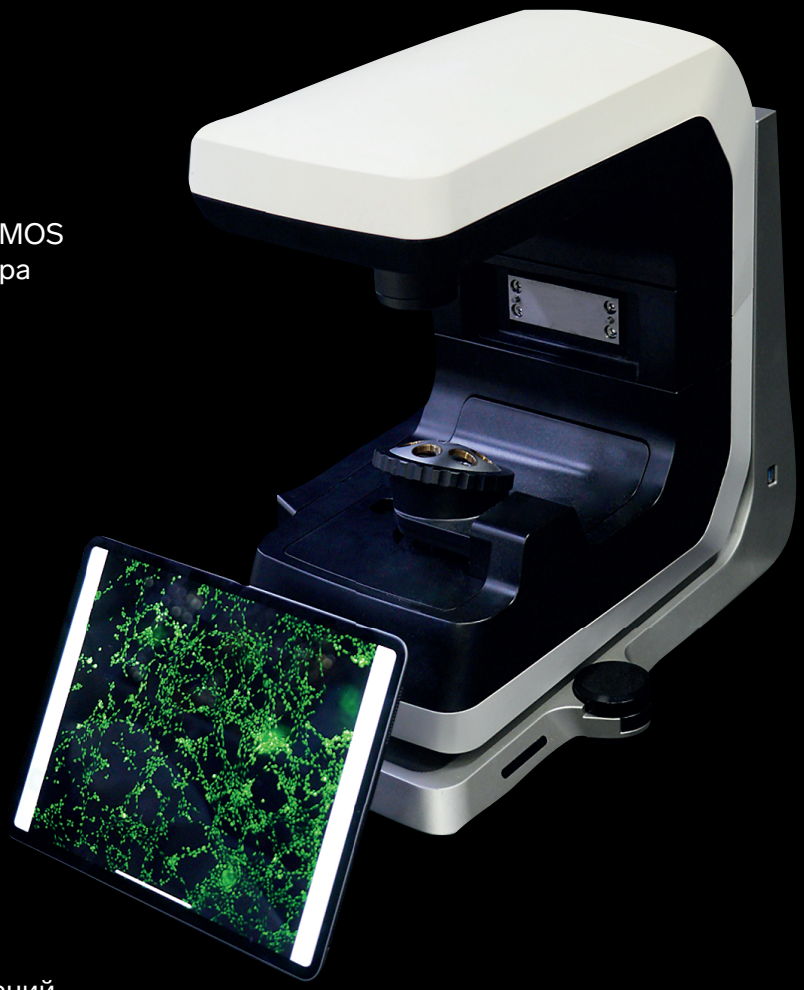
5. Kushlinskii N.E., Gershtein E.S., Alferov A.A., Bezhanova S.D., Mushtenko V.V., Pushkar D.Y., Matveev V.B., Stilidi I.S. Prognostic Role of Matrix Metalloproteinases 2, 7, 8, 9 and Their Type 1 Tissue Inhibitor in Blood Serum of Patients with Kidney Cancer // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2020. – Vol. 168. – No 5. – P. 673-676.

МЫ ПЕРЕВЕРНУЛИ МИКРОСКОПИЮ

Универсальный гибридный флуоресцентный микроскоп REVOLVE

ХАРАКТЕРИСТИКИ REVOLVE

- **Четыре микроскопа в одном:**
  прямой, инвертированный,
  светлопольный и флуоресцентный
- **Две камеры:**
  BF: 12-мегапиксельная цветная камера CMOS
  FL: 5-мегапиксельная монохромная камера sCMOS
- **Флуоресценция:**
  5 каналов — источник света на основе светодиодов высокой энергии
- **Дисплей:**
  12,9-дюймовый сенсорный дисплей Liquid Retina®
- **Управление данными:**
  USB | Ethernet | Облачный (Dropbox)
- **Оптика:**
  1,25x-100x Plan Achromat,
  Plan Apochromat,
  Plan fluorite 6-позиционный барабан
- **Конденсор:**
  Конденсор с большим рабочим расстоянием
  Конденсор высокого разрешения
- **Программное обеспечение:**
  Сенсорный интерфейс, аннотации измерений, длина, площадь, подсчёт клеток, линейка масштаба
- **Фирменная функция цифровой обработки изображений** в реальном времени Digtal Haze Reduction (DHR) подавляет шум, уменьшает размытость, улучшает четкость изображения
- **Функция Z-Stacking** улучшает качество изображения для толстых или неровных образцов



Наведи камеру и посмотри
на REVOLVE в своей лаборатории

BCM
Традиции. Опыт.
Инновации

АО «БиоХимМак»
119192, Москва, Ломоносовский пр., д. 29, к. 1;
- **+7 (495) 647-27-40**;
- **pcr@biochemmack.ru**
- **www.biochemmack.ru**

