



СБМ



НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
СИСТЕМНОЙ БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ
РОСПОТРЕБНАДЗОРА

Федеральное бюджетное учреждение науки
**НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
СИСТЕМНОЙ БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ**
Федеральной службы по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия человека

ИТОГОВАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

МОСКВА

17–18 декабря 2025

УДК 57:61
ББК 58:5я43
И93

Под редакцией В.М. Говоруна и Е.Н. Ильиной

И93 **Итоговая научная конференция НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора. Тезисы докладов (Москва, 17–18 декабря 2025).** – М.: Издательство «Перо», 2026. – 2,33 Мб [Электронное издание]

Содержание

	<i>стр.</i>
Тезисы докладов отдела системной и синтетической биологии	3
Тезисы докладов отдела молекулярной биологии и биоинформатики	38
Тезисы докладов отдела биофизики	47
Тезисы докладов гостей. Вне конкурса	58
Авторский указатель	64

Сборник тезисов научных докладов включает материалы устных и стендовых докладов, представленных на ежегодной Итоговой научной конференции НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора как сотрудниками учреждения, так и приглашенными гостями в декабре 2025 года. Тематика представленных докладов охватывает актуальные темы системной и синтетической биологии, структурной биологии, биотехнологии, молекулярной биологии, геномной инженерии, микробиологии и смежных дисциплин.

Книга рассчитана не только на специалистов, работающих в разных областях биомедицинских наук, но и на студентов, аспирантов, преподавателей и научных работников, интересующихся проблемами наук о жизни.

Издательство «Перо»
109052, Москва, Нижегородская ул., д. 29-33, стр. 27, ком. 105
Тел.: (495) 973-72-28, 665-34-36
Подписано к использованию 04.03.2026.
Объем 2,33 Мбайт. Электрон. текстовые данные. Заказ 206.

ISBN 978-5-00270-724-9



УДК 57:61
ББК 58:5я43

© НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, 2026
© Коллектив авторов, 2026

УДК 65.011.56; 66-5; 54-057

OLIGO-CRM: КОМПЛЕКСНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ АВТОМАТИЗАЦИИ СИНТЕЗА ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

О.В. Федоров, Т.В. Пустовалова, Д.Д. Байрамкулов

*Лаборатория дизайна искусственных ферментов, НИИ системной биологии и медицины
Роспотребнадзора*

Современные исследования в области молекулярной биологии и геномной инженерии предъявляют высокие требования к качеству и скорости синтеза олигонуклеотидов. Увеличение объемов заказов и усложнение проектов делают ручную обработку данных неэффективной и трудоемкой. Для решения этой проблемы мы разработали программный комплекс *oligo-crm*, предназначенный для полной автоматизации процесса синтеза олигонуклеотидов, – от приема заявки до подготовки *input*-файлов и скриптов для запуска лабораторного оборудования.

Система *oligo-crm* имеет модульную архитектуру, обеспечивающую гибкость и масштабируемость. Все компоненты системы интегрированы в единый пользовательский интерфейс (UI), что обеспечивает удобство управления и мониторинга на всех этапах. Ключевыми компонентами системы являются:

Сервис интеграции с Яндекс.Формами. Этот модуль автоматически получает заявки на синтез, извлекая из них всю необходимую информацию, и сохраняет ее в базе данных для дальнейшего отслеживания и управления.

Сервис разбивки генов на олигонуклеотиды. Для работы с заказами на синтез генов предусмотрен модуль, который обрабатывает FASTQ-файлы протяженных генетических последовательностей, разбивая их на олигонуклеотиды для сборки посредством двухстадийной ПЦР. В этот модуль интегрирован специализированный редактор, позволяющий визуализировать выравнивание полученных олигонуклеотидов на референсную последовательность. Полученные библиотеки олигонуклеотидов автоматически направляются в сервис приема заявок на синтез, интегрированный с Яндекс.Формами.

Процессор олигонуклеотидов. Это ядро системы, отвечающее за подготовку последовательностей к синтезу. Процессор выполняет нормализацию данных: удаляет лишние символы и пробелы, приводит последовательности к единому формату и добавляет стандартные наборы олигонуклеотидов, необходимых для контроля качества синтеза.

Сервис запуска и управления синтезом. Обработанные и верифицированные последовательности передаются в данный модуль, который формирует задания для синтезаторов олигонуклеотидов в виде *input*-файлов, загружаемых непосредственно на синтезаторы.

Сервис пулирования. Завершающий этап автоматизации, который генерирует специализированные скрипты для роботизированных станций (например, Tecan) непосредственно на основе лог-файлов синтезаторов. Эти скрипты управляют процессом пулирования — точного

смешивания синтезированных олигонуклеотидов в заданных пропорциях для создания пулов олигонуклеотидов.

Внедрение системы oligo-crm позволяет значительно сократить время на обработку заказов, минимизировать риск человеческих ошибок и стандартизировать весь цикл производства олигонуклеотидов. Данное решение обеспечивает полную прослеживаемость каждого заказа и является важным шагом на пути к созданию полностью автоматизированной цифровой лаборатории.

Ключевые слова: синтез олигонуклеотидов, молекулярная биология и генная инженерия, автоматизация, программный комплекс oligo-crm, цифровая лаборатория, пулирование.

1. Semashko TA, Fisunov GY, Shevelev GY, Govorun VM. BAC-browser: the tool for synthetic biology. *BMC Bioinformatics* 2025, 26: 27, doi: 10.1186/s12859-025-06049-9.
2. Molotkovsky RJ, Galimzyanov TR, Minkevich MM, Pinegin KV, Kuzmin PI, Bashkirov PV. Energy pathway of lipid monolayer fusion: From droplet contact to coalescence. *J. Phys. Chem. B* 2025, 129(27): 7010–7021, doi: 10.1021/acs.jpcc.5c02054.

УДК 575

ВЛИЯНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ЧЕЛОВЕКА НА ВОСПРИИМЧИВОСТЬ К ВИРУСУ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

Ж.П. Белокрылова

*Лаборатория мультиомиксных исследований, НИИ системной биологии и медицины
Роспотребнадзора*

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) относится к роду *Orthoflavivirus* семейства *Flaviviridae*. ВКЭ распространен в странах Восточной, Центральной, Северной и Западной Европы, а также в северном Китае, Монголии и России. Ежегодно на эндемичных территориях регистрируется порядка 12000 случаев заболевания в год.

Течение КЭ зависит от множества факторов. Группой риска являются люди пожилого возраста, мужского пола и лица со сниженным иммунным статусом. Также на клиническую картину может повлиять локализация укуса клеща, количество инфекционной дозы и генотип ВКЭ. По типу генетической структуры ВКЭ подразделяют на четыре основных: дальневосточный, сибирский, европейский и байкальский. Описаны также два других подтипа: гималайский и «178-79», но данные генотипы не выделены от пострадавших пациентов, а с помощью генетических и филогенетических исследований. Ранее считалось, что дальневосточный генотип вызывает наиболее тяжелое течение заболевания с вероятностью летальных исходов, сибирский подтип – течение средней степени тяжести и хроническое течение, а европейский – наиболее легкое течение. Но по мере накопления клинических данных было отмечено, что все генотипы ВКЭ могут вызывать различные формы течения заболевания и исходы.

Также установлено, что не каждый случай присасывания инфицированного клеща приводит к развитию заболевания в манифестной форме (лихорадочной, менингеальной или очаговой) и что около 90% случаев инфицирования ВКЭ протекает в инapparантной (субклинической) форме, т.е. без каких-либо клинических проявлений.

Подобные вариации течения КЭ могут быть обусловлены особенностью индивидуальной иммунной реакции человека. На сегодняшний день существует не мало работ, посвященных влиянию генетических факторов человека на восприимчивость к инфицированию КЭ, отмечено влияние полиморфизмов рецепторов: TLR3 (rs3775291); DDX58 (rs3739674); OAS2 (rs1293762); IFIT1 (rs304478); CD209 (rs2287886); CCR5 (CCR5Δ32); IL10 (rs1800872); ABCB9 (rs4148866); COL22A1 (rs4909444); MMP9 (rs17576). Необходимо особо отметить рецептор LRP8, так как долгое время исследователям не удавалось установить рецептор проникновения ВКЭ в клетку, но недавно было показано, что гликопротеин E ВКЭ напрямую связывается с LRP8, что опосредует прикрепление вируса к клеткам и его интернализацию, а уровни экспрессии LRP8 коррелируют с уровнем инфицирования КЭ.

В своей работе я установила корреляционную зависимость к восприимчивости КЭ от наличия SNP rs3775291 рецептора TLR3 и rs2285933 рецептора OAS3 у пациентов из Свердловской области. Биологический материал был получен от пациентов, обратившихся в медицинское

учреждение ООО «Новая больница» г. Екатеринбурга в 2015, 2017, 2021 и 2023 гг. с жалобами на присасывания клещей или лесной фактор. Всего было исследовано 245 пациентов. Из них 125 пациентов с диагнозом КЭ и 120 пациентов без диагноза КЭ, не вакцинированных против КЭ, но у которых были выявлены антитела к вирусу КЭ (IgG, IgM), а также антиген ВКЭ, и пациенты, при исследовании клеща которых была выявлена РНК ВКЭ. Геномную ДНК выделяли с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп», кровь предварительно обрабатывали раствором «Гемолитик» (Амплисенс). Анализ генотипирования SNP rs3775291 и rs2285933 осуществляли с помощью гибридизационно-флуоресцентной детекции ПЦР в с использованием специфических зондов и праймеров, меченных флуорофорами JOE и FAM.

Для SNP rs3775291 рецептора TLR3 были обнаружены значимые различия в частоте гомозигот Т/Т в группе пациентов с КЭ (14,3%) и контрольной группе (4,2%) ($p=0,01$), а также частота встречаемости гомозигот С/С для пациентов с КЭ (33,5%) и в контрольной группе (54,2%) ($p<0,001$). Для SNP rs2285933 рецептора OAS3 была установлена зависимость с тяжестью течения КЭ, в группе пациентов с диагнозом КЭ с поражением ЦНС распространен генотип GG ($p = 0,01$).

В результате были сделаны выводы, что не функциональный TLR3 является фактором риска заражения ВКЭ, а не функциональный OAS3 увеличивает степень вирусной нагрузки на организм. Исследования полиморфизмов генов, кодирующих синтез мембранных и внутриклеточных адаптерных молекул, а также рецепторов, направленных на распознавание вирусного агента, является ключом к пониманию механизмов инвазии ВКЭ в клетку мишень.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита, флавивирусные инфекции, однонуклеотидные полиморфизмы, экспрессия генов, внеклеточный матрикс.

УДК 543.51, 611.018.54

НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ В ПРОТЕОМЕ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА — ВОЗМОЖНЫЙ КЛЮЧ К ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ ОПУХОЛЕЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

И.О. Бутенко, Н.А. Кициловская, А.В. Вакарюк, В.Д. Гремячева, А.В. Коваленко

*Лаборатория мультиомиксных исследований, НИИ системной биологии и медицины
Роспотребнадзора*

Современные методы первичной диагностики основаны, в первую очередь, на ультразвуковом исследовании (УЗИ), а золотым стандартом скрининга доброкачественных и злокачественных узлов щитовидной железы (ЩЖ) является тонкоигольная аспирационная биопсия (ТАБ). Однако эти методы имеют ограничения и затруднения, связанные с локализацией новообразования, квалификацией медицинского персонала и сопутствующими заболеваниями. В такой ситуации возможность сравнительно легко измерять ряд белков в клинических условиях открывает новые перспективы для диагностики и дифференциации опухолей ЩЖ. Перечень известных опухолевых маркеров включает более 1000 белков [1], большинство из них не обладают достаточной чувствительностью и специфичностью для конкретного вида рака.

В данной работе был рассмотрен набор из нескольких десятков белков плазмы крови человека, изменение уровней которых связано с онкологическими заболеваниями разного типа, а также белки, свидетельствующие о наличии в организме воспалительного процесса, вызванного инфекциями, аутоиммунными заболеваниями или повреждениями тканей. Для мультиплексного количественного определения выбранных белков был разработан и применялся прицельный протеомный ВЭЖХ-МС-анализ в режиме мониторинга множественных реакций (MRM).

В ходе выполнения работы отобраны и синтезированы пептиды для 57 белков, проведена оценка частоты детекции в триптических препаратах плазмы крови человека и предложен количественный метод, включающий 31 белок и соответствующие им 62 пары пептидов: пептиды с естественным изотопным составом и стандартные пептиды, меченные стабильными изотопами. Разработанный метод был применен к коллекции образцов плазмы крови человека, собранной в ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова» у пациентов 8 групп – доброкачественные новообразования ЩЖ (доброкачественная опухоль), зоб, злокачественный папиллярный зоб, злокачественный фолликулярный рак, злокачественный папиллярный рак, злокачественный медуллярный рак, злокачественный онкоцитарный рак, новообразования неопределенного характера.

Пробоподготовка коллекции проводилась с помощью автоматизированной станции дозирования Tecan Freedom EVO 150/8 в батчах по 84 образца с индивидуальной калибровочной зависимостью для каждого батча. Каждая аналитическая партия распределялась случайно в рамках одного батча и анализировалась также в случайном порядке. Для оценки воспроизводимости и стабильности ВЭЖХ-МС-метода в рамках анализа каждого батча использовалась

стандартная проба, содержащая смесь синтетических пептидов, для большей части пептидов коэффициент вариации не превысил 20%.

Наибольшее отличие зафиксировано для С-реактивного белка (СРБ) для группы, выделенной как новообразование неизвестного характера, также он растет для других подгрупп группы злокачественных новообразований. Далее следует отметить увеличение представленности АРОА1, CD14 и GAL3 для группы фолликулярного рака. При этом несмотря на то, что в [2] GAL3 приводится как высоко представленный при раке ЩЖ, но не в нормальной ткани ЩЖ и редко при доброкачественных поражениях ЩЖ, наблюдается повышенная представленность только для фолликулярного рака, а для медуллярного рака и многоузлового папиллярного зоба наблюдается снижение представленности относительно группы доброкачественных новообразований. Для остальных белков представленность понижена в случае группы злокачественных новообразований.

Возможность сравнительно легко измерять ряд белков в клинических условиях открывает новые перспективы для диагностики и дифференциации опухолей ЩЖ. Использование панели мишеней, отражающей состояние организма в целом или свидетельствующей о воспалении разной локализации, может обеспечить более быстрое и менее инвазивное предварительное выделение пациентов с наивысшим риском злокачественного характера опухоли ЩЖ. Это позволит оптимизировать ресурсы и направить пациентов с подозрением на рак в первую очередь на ТАБ, что особенно важно в условиях ограниченного доступа к специалистам.

Ключевые слова: щитовидная железа, масс-спектрометрия, белки плазмы крови.

1. Polanski, Malu, and N. Leigh Anderson. A list of candidate cancer biomarkers for targeted proteomics. *Biomarker insights* 2006, doi: 10.1177/117727190600100001.
2. Chiu, Connie G., et al. Diagnostic utility of galectin-3 in thyroid cancer. *The American Journal of Pathology* 176.5 2010: 2067-2081, doi: 10.2353/ajpath.2010.090353

УДК 543.51, 577.152.344, 611.018.54

ПРЯМАЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПРОВЕРКА ПРОТЕОТИПИЧНОСТИ ПЕПТИДОВ ДЛЯ ПРИЦЕЛЬНОГО ПРОТЕОМНОГО АНАЛИЗА ПЛАЗМЫ КРОВИ

И.О. Бутенко, Н.А. Кициловская, А.В. Вакарюк, А.А. Лазарева, А.В. Коваленко, В.Д. Гремячева

Лаборатория мультиомиксных исследований, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

Концентрации белков, циркулирующих в плазме крови человека – клинически ценная информация, используемая для диагностики и контроля терапии широкого спектра заболеваний. Для клинического применения допущены преимущественно методы на основе иммуноанализов, большинство из которых нацелены на единственную мишень. В случае многих патологий, однако, достаточно специфичные маркеры не обнаружены, но возможна стратификация рисков на основе анализа ансамбля неспецифических белков. Мультиплексные методы иммуноанализов, позволяющие определять концентрации десятков белков, постепенно находят применение в клинической практике. Главной задачей при разработке такого метода становится определение состава мультиплексной панели маркерных белков. Для этого требуется высокопроизводительный мультиплексный количественный анализ, где ансамбль мишеней легко менять. Согласно «треугольной» стратегии поиска биомаркеров, такой анализ применяется для нескольких десятков или сотен белков и проводится на сотнях или тысячах проб. Подходящим по аналитическим свойствам методом анализа является прицельный восходящий протеомный анализ на ВЭЖХ-МС с детекцией в режиме мониторинга выбранных реакций (MRM) на масс-спектрометре типа «тройной квадруполь».

Для достижения мультиплексности и универсальности в восходящем протеомном анализе непосредственно инструментальному ВЭЖХ-МС анализу подвергается препарат пептидов – продукт ферментативного протеолиза белков пробы. В его направленном количественном варианте требуется получение для каждой мишени индивидуальных стандартов – синтетических препаратов пептидов с включением стабильной изотопной метки. Поэтому ключевым при разработке таких методов становится вопрос выбора пептида – суррогатной молекулы, концентрация которой будет служить мерой концентрации белка-мишени в исходной пробе. Достаточно рано в ходе развития восходящего протеомного анализа как технологии было сделано наблюдение, что регистрация в пробе всех пептидов, являющихся продуктами полного протеолиза какого-либо белка, является редким событием, наблюдающимся преимущественно для высокопредставленных белков в сравнительно бедных по ассортименту белков пробах. Для большинства белков, как правило, регистрируют один или несколько пептидов из десятков, предсказанных для белка на основании специфичности протеолиза. В связи с этим было введено определение протеотипического пептида, то есть такого, который часто определяется в пробе в ходе восходящего протеомного анализа при условии, что белок,

продуктом протеолиза которого он является, присутствовал в исходном материале. То есть, протеотипичность – эмпирически определяемое свойство пептида.

В данной работе мы исследовали протеотипичность пептидов для белков-мишеней в плазме крови при использовании методов подготовки и ВЭЖХ-МС анализа проб собственной разработки. Для определения протеотипичности был применен метод прицельной детекции, созданный при помощи масштабного пептидного синтеза. Для трех белков была предпринята попытка исчерпывающего синтеза всех теоретически возможных пептидов, для еще 350 белков – 827 пептидов. Для этих пептидов были созданы методы прицельной детекции, с помощью которых наличие пептидов проверили на 244 индивидуальных пробах плазмы крови пациентов и добровольцев. Для автоматизации определения детекции пептида был разработан алгоритм-классификатор. В результате для разрабатываемой в рамках госзадания 1022071500031-4 методической платформы было проведено прямое определение протеотипичности отобранных пептидов.

Ключевые слова: протеомика, протеотипические пептиды, плазма крови.

1. Craig R, Cortens JP, Beavis RC. The use of proteotypic peptide libraries for protein identification. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2005;19(13):1844-50. doi: 10.1002/rcm.1992. PMID: 15945033.
2. Kuster B, Schirle M, Mallick P, Aebersold R. Scoring proteomes with proteotypic peptide probes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Jul;6(7):577-83. doi: 10.1038/nrm1683. PMID: 15957003.

УДК 543.51, 611.018.54

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ПЛАЗМЫ КРОВИ ВНУТРИ ПРОТЕОМНОГО МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

А.В. Вакарюк, И.О. Бутенко, Н.А. Кициловская, А.В. Коваленко, В.Д. Гремячева

*Лаборатория мультиомиксных исследований, НИИ системной биологии и медицины
Роспотребнадзора*

Протеомика плазмы крови на основе масс-спектрометрического анализа позволяет проводить качественную и количественную оценку содержания белков в сложной смеси. В исследованиях по поиску и определению биомаркеров важно понимать, что найденный маркер не является артефактом преаналитического этапа подготовки плазмы. Наиболее частыми проблемами, возникающими на преаналитическом этапе, являются гемолиз и коагуляция.

В статье Geyer et al. [1] по профилированию плазмы были предложены панели белков, репрезентирующих три основные причины возникновения проблем с качеством образца – коагуляция, контаминация тромбоцитами и эритроцитами. В нашем исследовании мы повторили аналогичные эксперименты с панорамным и направленным протеомным анализом с целью ввести оценку гемолиза образцов плазмы и соответствующие критерии исключения образцов в стандартный протокол MRM-анализа.

В эксперименте по определению маркеров гемолиза плазма разводилась лизированными эритроцитами в соотношениях, соответствующих 0,1, 1, 10, 20 и 100% гемолиза. Наиболее стабильный и воспроизводимый отклик на гемолиз показали три пептида гемоглобина и один пептид карбоновой ангидразы-1. Их концентрации коррелировали с долей разрушенных эритроцитов во всех экспериментальных сериях. Метод воспроизводит результаты, ранее полученные в панорамных исследованиях (рис. 1).

В пробах с 1% гемолиза концентрация свободного гемоглобина $\sim 0,2$ г/л. При таком количестве свободного гемоглобина наблюдаются изменения у чувствительных к гемолизу белков – лактатдегидрогеназа и аспартат аминотрансфераза [2]. В образцах с 10% гемолиза $\sim 2,9$ г/л, в таких условиях мы наблюдаем снижение концентрации некоторых клинических маркеров почти в два раза.

Применимость маркеров была проверена на коллекции плазмы, полученной из больницы. Концентрации маркерных пептидов в образцах пациентов сравнивалась с концентрацией, соответствующей уровню гемолиза 1% по расчету в модельном эксперименте. Мы наблюдали сильную корреляцию между образцами у пептидов гемоглобина и слабо выраженную для карбоангидразы-1. Около 7% проб превышало значение для 1% гемолиза.

Таким образом, в исследовании подобраны пептиды, которые могут использоваться в качестве стандартов в таргетном MRM-анализе для контроля качества плазмы крови, позволяющие количественно оценивать уровень гемолиза и наличие коагуляции непосредственно в рамках протеомного анализа. Метод позволит быстро анализировать большие коллекции и исключать поврежденные пробы из анализа.

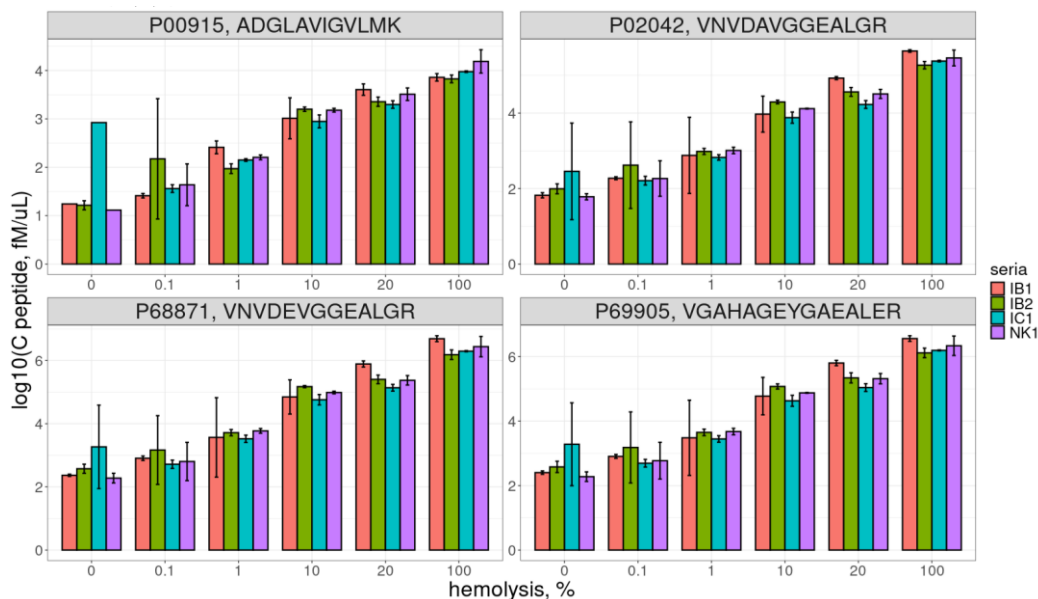


Рис. 1. Зависимость концентраций маркерных пептидов от степени гемолиза для каждого донора.

Ключевые слова: плазма, преаналитические ошибки, протеом, масс-спектрометрия.

1. Geyer PE, Voytik E, Treit PV, Doll S, Kleinhempel A, Niu L, Müller JB, Buchholtz ML, Bader JM, Teupser D, Holdt LM, Mann M. Plasma Proteome Profiling to detect and avoid sample-related biases in biomarker studies. *EMBO Mol Med*. 2019, 7;11(11):e10427, doi: 10.15252/emmm.201910427.
2. Koseoglu M, Hur A, Atay A, Cuhadar S. Effects of hemolysis interferences on routine biochemistry parameters. *Biochem Med (Zagreb)*. 2011;21(1):79-85. doi:10.11613/bm.2011.015

УДК 612.342.4, 543.51

ВЛИЯНИЕ ОБОГАЩЕНИЯ ПРЕПАРАТА ТРИПСИНА β -ФОРМОЙ НА ГЛУБИНУ ВОСХОДЯЩЕГО ПРОТЕОМНОГО АНАЛИЗА

В.Д. Гремячева, И.О. Бутенко, А.В. Вакарюк, А.В. Коваленко, Н.А. Кициловская

*Лаборатория мультиомиксных исследований, НИИ системной биологии и медицины
Роспотребнадзора*

Восходящая масс-спектрометрия является одним из методов определения количественного и качественного белкового состава (протеома) сложных проб (культура клеток, плазма крови, и т.д.). В процессе подготовки образцов для данного метода исследования используется ферментативный гидролиз, чаще всего, трипсином. Необработанный препарат трипсина нестабилен в растворе, так как подвержен аутопротеолизу. Из интактной β -формы в результате гидролиза пептидной связи при остатке Lys-131 и Ser-132 образуется α -, а при дальнейшем гидролизе связи при остатке Lys-176–Asp-177 ψ -форма трипсина [1]. Наличие в препарате фермента α - и ψ -форм ухудшает качество трипсинолиза. Поэтому для подготовки образцов применяют стабилизированные метилированием остатков лизина и аргинина препараты трипсина. Использование коммерческих препаратов трипсина для подготовки большого количества образцов может быть недоступно из-за их высокой стоимости. Целью исследования была разработка метода получения препарата трипсина, обогащенного β -формой из доступного в продаже сырья животного происхождения, с минимальными затратами средств и времени. Полученный препарат характеризовали по чистоте с помощью денатурирующего гель-электрофореза и испытывали на пробах плазмы крови. Применение обогащенного β -формой трипсина привело к снижению количества продуктов неполного протеолиза (missed cleavage) вдвое и росту ассортимента зарегистрированных пептидов – продуктов полного протеолиза.

Ключевые слова: протеомика, трипсин, протеоформы, обогащение.

1. Perutka Zdeněk, Šebela Marek. Pseudotrypsin: A Little-Known Trypsin Proteoform. *Molecules*, 2018, Oct 14;23(10):2637. doi: 10.3390/molecules23102637

УДК 577.22, 577.23, 577.322.23, 57.034

ВНЕШНИЕ УСЛОВИЯ РЕГУЛИРУЮТ СБОРКУ ОЛИГОФЕРМЕНТНОГО ГЛИКОЛИТИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА НА НАНОЧАСТИЦАХ

Ф.А. Завалко¹, А.М. Свистунов¹, А.С. Полякова¹, А.А. Лазарева¹, А.Н. Миков¹,
А.Б. Шикалов¹, И.О. Бутенко², Д.С. Матюшкина¹, О.В. Щербакова¹, В.М. Говорун¹

¹Лаборатория простых систем, ²Лаборатория мультиомиксных исследований,
НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

Гликолиз является одним из наиболее консервативных метаболических путей, он встречается во всех организмах, включая хемолитотрофы [1]. Гликолиз играет ключевую роль в поддержании устойчивого клеточного метаболизма, и, по-видимому, помимо энергетических функций производства АТФ и НАД⁺, он также может регулировать другие метаболические процессы [1]. Таким образом, регуляция гликолиза является важной частью механизма физиологической адаптации клеток. Механизмы регуляции гликолиза организмов с минимальным геномом, например, *Mycoplasma gallisepticum* (~700 генов, ~10⁶ пар оснований), представляют особый интерес, поскольку механизм их адаптации не затрагивает основную часть протеома или транскриптома [2]. Мы предполагаем, что *M. gallisepticum* приспосабливается к внешним условиям в значительной степени за счет пространственной реорганизации олигоферментного гликолитического комплекса, так как у некоторых организмов обнаружено образование комплексов гликолитических ферментов в стрессовых условиях [3, 4]. Более того, на примере других организмов установлено, что гликолитические ферменты способны формировать комплексы с участием ДНК [5], митохондрий [4, 6], хлоропластов [6], цитоскелета [7], рибосом [8, 9]. При попытках воссоздания олигоферментного гликолитического комплекса *in vivo* и *in vitro* были описаны многочисленные белок-белковые взаимодействия гликолитических ферментов, однако не было обнаружено формирование единого гликолитического комплекса [10].

В данной работе мы исследуем роль “третьего участника” – твердой фазы, в формировании олигоферментного гликолитического комплекса *in vitro*: иммобилизуем рекомбинантные ферменты гликолиза *M. gallisepticum* от глюкозофосфатизомеразы до пируваткиназы, на наночастицы размером 35, 250 нм, 5 μм, с дальнейшим анализом активности полученных комплексов. Для иммобилизации ферментов на Ni²⁺-модифицированных наночастицах мы используем высокоаффинное взаимодействие Ni²⁺ - 6×His tag, что позволяет быстро фиксировать взаимодействующие комплексы ферментов на поверхности наночастиц. Мы обнаружили, что в зависимости от внешних условий, конденсированный олигоферментный комплекс демонстрирует различный отклик, а именно изменение скоростей реакций и выходов продуктов. По-видимому, это обусловлено различиями в структуре формирующегося комплекса. Таким образом, нами предложен метод анализа, позволяющий обнаружить перестройку белковых комплексов, и исследовать их функциональную активность.

В настоящий момент нами описаны следующие эффекты:

1. порядок конденсации ферментов имеет значение: нанесение ферментов гликолиза на наночастицы **в разном порядке** приводит к различию в начальных скоростях наработки продуктов в 2,7 раз и более;
2. буфер для нанесения имеет значение: нанесение ферментов гликолиза на наночастицы **в разных буферах** приводит к различию в наработке продуктов за 20 часов реакции в 1,7 раз и более;
3. плотность посадки ферментов имеет значение: нанесение ферментов гликолиза **с разной плотностью** на наночастицы приводит к различию в начальных скоростях наработки продуктов в 2,5 раз и более.

Таким образом, мы описали новый механизм регуляции работы олигоферментных систем, основанный исключительно на перестройке белок-белковых взаимодействий при влиянии различных внешних условий.

Ключевые слова: наночастицы, ферменты, ферментативная активность, белок-белковые взаимодействия, гликолиз

1. Kierans SJ, Taylor CT. Glycolysis: A multifaceted metabolic pathway and signaling hub. *Journal of Biological Chemistry* 2024, 300(11), 107906, doi: 10.1016/j.jbc.2024.107906.
2. Butenko I, Vanyushkina A, Pobeguts O, Matyushkina D, Kovalchuk S, Gorbachev A, Anikanov N, Fisunov G, Govorun V. Response induced in *Mycoplasma gallisepticum* under heat shock might be relevant to infection process. *Scientific Reports* 2017, 7(1), 11330, doi: 10.1038/s41598-017-09237-7.
3. Kohnhorst CL, Kyoung M, Jeon M, Schmitt DL, Kennedy EL, Ramirez J, Bracey SM, Luu BT, Russell SJ, An S. Identification of a multienzyme complex for glucose metabolism in living cells. *Journal of Biological Chemistry* 2017, 292(22), 9191–9203, doi: 10.1074/jbc.M117.783050.
4. Graham JW, Williams TC, Morgan M, Fernie AR, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ. Glycolytic enzymes associate dynamically with mitochondria in response to respiratory demand and support substrate channeling. *The Plant Cell* 2007, 19(11), 3723–3738, doi: 10.1105/tpc.107.053371.
5. Fisunov GY, Zubov AI, Pobeguts OV, Varizhuk AM, Galyamina MA, Evsyutina DV, Semashko TA, Manuvera VA, Kovalchuk SI, Ziganshin RK, Barinov NA, Klinov DV, Govorun VM. The dynamics of *Mycoplasma gallisepticum* nucleoid structure at the exponential and stationary growth phases. *Frontiers in Microbiology* 2021, 12, 753760, doi: 10.3389/fmicb.2021.753760.
6. Zhang Y, Sampathkumar A, Kerber SM, Swart C, Hille C, Seerangan K, Graf A, Sweetlove L, Fernie AR. A moonlighting role for enzymes of glycolysis in the co-localization of mitochondria and chloroplasts. *Nature Communications* 2020, 11(1), 4509, doi: 10.1038/s41467-020-18234-w.
7. Knull HR, Walsh JL. Association of glycolytic enzymes with the cytoskeleton. *Current Topics in Cellular Regulation* 1992, 33, 15–30, doi: 10.1016/b978-0-12-152833-1.50007-1.
8. Wegener M, Dietz K. The mutual interaction of glycolytic enzymes and RNA in post-transcriptional regulation. *RNA* 2022, 28(11), 1446–1468, doi: 10.1261/rna.079210.122.
9. Kühner S et al. Proteome organization in a genome-reduced bacterium. *Science* 2009, 326(5957), 1235–1240, doi: 10.1126/science.1176343.
10. Menard L, Maughan D, Vigoreaux J. The structural and functional coordination of glycolytic enzymes in muscle: evidence of a metabolon? *Biology* 2014, 3(3), 623–644, doi: 10.3390/biology3030623.

УДК 577.213.7

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЙ СБОРКИ ДНК ИЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, СИНТЕЗИРОВАННЫХ НА МИКРОЧИПАХ, НА МОДЕЛИ ГЕНОМА *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM*

А.Э. Катичева, Т.А. Семашко

Лаборатория системного анализа микроорганизмов, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

Синтетическая геномика – раздел синтетической биологии, задачей которой является проектирование и конструирование целых геномов для решения фундаментальных вопросов функционирования генома и создания биологических систем *de novo*.

Современные методы синтеза ДНК уже позволяют воссоздавать вирусные и бактериальные геномы. Начальный этап синтеза ДНК-фрагментов – получение олигонуклеотидов – является наиболее дорогостоящим. Классический колonoчный фосфорамидитный синтез олигонуклеотидов является надежным и широко распространенным методом, однако именно он обуславливает дороговизну получения протяженных последовательностей ДНК.

Использование олигонуклеотидов, синтезированных на микрочипах, является возможным альтернативным подходом к синтезу протяженных последовательностей ДНК. Целью данной работы является разработка набора методов сборки фрагментов ДНК из олигонуклеотидов, синтезированных на микрочипах.

Целевая последовательность – фрагмент генома *Mycoplasma gallisepticum* длиной 86780 п. н. был разбита на блоки размером около 1000 п. н. Олигонуклеотиды для сборки блоков были сгенерированы в программе BAC-browser [1]. Олигонуклеотиды были синтезированы параллельным фосфорамидитным методом на микрочипе компанией Agilent, США. Для разделения олигонуклеотидов, необходимых для сборки отдельных фрагментов, и увеличения их концентрации была использована и оптимизирована методика селективной амплификации пулов олигонуклеотидов.

Для сборки фрагментов длиной в 1000 п. н. из амплифицированных пулов были получены олигонуклеотиды в двух вариантах: одноцепочечные и двухцепочечные. На них был опробован ряд стратегий сборки фрагментов ДНК: ПЦР, одностадийная, двухстадийная и трехстадийная ПЦР-сборка, одноэтапная и двухэтапная сборки по Гибсону с последующей амплификацией, вследствие чего удалось получить 10 фрагментов длиной в 1000 п. н. (табл. 1).

Количество ошибок во фрагментах, полученных из олигонуклеотидов, синтезированных на микрочипе, оказалось сопоставимым с числом ошибок в классическом синтезе из колonoчных олигонуклеотидов по нашим ранее опубликованным данным [2].

На следующем этапе работы была показана возможность объединения фрагментов ДНК длиной в 1000 п. н. в последовательности длиной в 5000 п. н. *in vitro*.

Таблица 1

Число и характер ошибок в синтезированных последовательностях на 1 тыс. п. н.
 Числовые значения представлены как среднее число ошибок
 в выборке \pm стандартное отклонение

Делеции	Вставки	Замены	Всего
1,6 \pm 1,4	0,3 \pm 0,4	0,8 \pm 0,8	2,7 \pm 1,2

Полученные результаты и наличие различных возможных подходов к разрешению трудностей, сопряженных с использованием синтезированных на микрочипах олигонуклеотидов, свидетельствуют о потенциале метода и целесообразности его дальнейшего совершенствования для эффективной сборки длинных ДНК-фрагментов.

Работа проводилась при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-29-08043) и Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (грант 122030900107-3).

Ключевые слова: синтетическая биология, синтез генов in vitro, Mycoplasma gallisepticum, искусственная клетка, высокопроизводительная сборка.

1. Semashko TA, Fisunov GY, Shevelev GY, Govorun VM. BAC-browser: the tool for synthetic biology. *BMC Bioinformatics* 2025, 26: 27, doi: 10.1186/s12859-025-06049-9.
2. Semashko TA, Fisunov GY, Tsoy EA, Kharrasov DR, Chudinov IK, Evsytina DV, Shevelev GY, Govorun VM. Modern Approaches to de novo Synthesis of Extended DNA Fragments: Assembly of a Wide Repertoire of Sequences. *Acta Naturae* 2024, 16(1): 77-85. doi: 10.32607/actanaturae.27362.

УДК 543.51

РАЗРАБОТКА И СРАВНЕНИЕ НАПРАВЛЕННЫХ МЕТОДОВ ВЭЖХ-МС АНАЛИЗА ДЛЯ ПОДТВЕРЖДЕНИЯ ГИПОТЕЗ О НАЛИЧИИ ПЕПТИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРОВ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ ORBITRAP

А.В. Коваленко, И.О. Бутенко, И.К. Чудинов, А.В. Вакарюк, Н.А. Кициловская, В.Д. Гремячева

Лаборатория мультиомиксных исследований, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

Построение ВЭЖХ-МСМС метода для протеомного анализа на современных орбитальных масс-спектрометрах зависит от поставленных задач. Наиболее популярные подходы к анализу — DDA/DIA shotgun-методы – являются поисковыми и ненаправленными. Они используются для общего описания белкового профиля образца, отлично подходят для детектирования пептидов высоко- и среднераспространенных белков и часто используются для относительной количественной оценки различных пептидов и белков в образце.

Однако из-за ограниченной емкости орбитальной ловушки зарегистрировать ион определенного компонента может быть невозможно из-за его коэлюции с другими высокопредставленными компонентами в заданном интервале значений m/z . [1] В связи с этим методика ненаправленного панорамного анализа характеризуется высокой степенью ложноотрицательных результатов.

Так, в исследовании, посвященном протеомному анализу изменений в белковом составе кишечных эпителиальных клеток человека в ответ на инфекцию энтеропатогенной *Escherichia coli*, было идентифицировано и количественно оценено почти 2100 белков, однако более 60% из них были охарактеризованы одним пептидом [2]. Более того, на этот единственный пептид может приходиться лишь 1 идентификация по единственному спектру. Несмотря на кажущуюся ненадежность, валидация полученных в статье результатов с помощью вестерн-блоттинга показала, что некоторые измеренные таким образом белки могут быть подтверждены.

Но подтверждение наличия в пробе белка (пусть и по 1 пептиду), для которого уже установлена возможность экспрессии, куда более вероятно, чем подтверждение наличия пептида с гипотетической экспрессией. Для корректной оценки доли ложноположительных идентификаций необходимо учитывать в расчете FDR потенциальную редкость таких событий.

Подтверждение таких идентификаций разделяется на две задачи: проверка повторяемости детекции и проверка соответствия ионов спектра фрагментации сиквенсу пептида. Последнюю проводят с помощью ВЭЖХ-МС/МС анализа синтетического препарата пептида с такой последовательностью.

В случае, когда требуется проверить сотни таких гипотез, например при решении задач протеогеномики, целесообразно вначале выделить наиболее вероятные гипотезы – те, идентификацию которых удастся повторить. Для того, чтобы делать это в короткие и

предсказуемые сроки, мы предлагаем использовать направленный ВЭЖХ-МС/МС анализ на масс-спектрометрах высокого разрешения. В данной работе мы исследовали пригодность разных вариантов такого анализа и искали оптимальные параметры.

В качестве модельного образца использовали препарат триптических пептидов *E. coli*. На основе идентификаций, полученных методом DDA, был сформирован список из 100 целевых пептидов (176 значений m/z). Сравнивались следующие методы: DDA с листом включения m/z целевых пептидов, мониторинг отдельных ионов с последующим зависимым от данных фрагментированием (SIM-ddMS2), параллельный мониторинг реакций (PRM), а также их комбинации, выполняемые в параллельно идущих экспериментах в рамках одного инструментального метода. Для отсеивания ложноположительных результатов был опробован расчет групповых FDR.

Результаты сравнения показали, что опробованные методы являются чувствительнее классических shotgun подходов и могут значимо поднять количество PSM для целевых пептидов. Однако методы отличались по количеству целевых пептидов, стабильно детектируемых за 1 закол.

SIM-ddMS2 значительно увеличивает количество PSM для некоторых целевых пептидов, но доля этих пептидов от всего запрашиваемого списка мала. Ключевым фактором для таргетных методов, сканирующих заданный список пептидов, оказалось временное планирование (time-scheduling). Этот подход позволяет разделить общее время хроматографического элюирования на сегменты, в течение которых масс-спектрометр мониторит только те пептиды, которые ожидаются в данном временном окне. Это позволяет значительно сократить время цикла и увеличить покрытие целевого списка.

Так, добавление временного графика к SIM-ddMS2 кардинально меняет картину: как процент покрытия пептидов из целевого списка, так и количество PSM примерно удваиваются. При разработке таких целевых методов выяснилась важность баланса между этими двумя метриками, и исследователь может изменить этот баланс, корректируя параметры динамического исключения. Это позволяет достичь равномерного количества PSM для целевых пептидов, одновременно увеличивая процент покрытия списка целевых пептидов еще на треть.

Методы PRM лидируют как по количеству PSM, так и по проценту покрытия списка целевых пептидов.

Эти методы не только увеличивают количество PSM практически для каждого пептида и обеспечивают более стабильное детектирование целевых пептидов по сравнению с DDA, но и позволяют детектировать пептиды, не видимые на DDA, что означает повышение чувствительности. Более того, охват списка в методах, где эксперименты DDA проводились параллельно с PRM, даже несколько выше, чем в методах PRM&SIM, что показывает сложности в предсказании/корректировке RT для каждого пептида в условиях нанохроматографии.

Ключевые слова: протеом, масс-спектрометрия, направленные методы

1. Veenstra T. D., Conrads T. P., Issaq H. J. What to do with “one-hit wonders”? // *Electrophoresis*. 2004. Vol. 25, no. 9. P. 1278–1279. DOI: 10.1002/elps.200490007.

2. Hardwidge P.R., Rodriguez-Escudero I., Goode D., Donohoe S., Eng J., Goodlett D.R., Aebersold R., Finlay B.B. Proteomic analysis of the intestinal epithelial cell response to enteropathogenic *Escherichia coli* // *Journal of Biological Chemistry*. 2004. Vol. 279, no. 25. P. 26685–26697. DOI: 10.1074/jbc.M401228200.

УДК: 579.25

ХАРАКТЕРИСТИКА БАЗОВОЙ ЭКСПРЕССИИ СИСТЕМ АНТИФАГОВОЙ ЗАЩИТЫ *VIBRIO CHOLERAЕ* КАК ЭТАП РАЦИОНАЛЬНОГО ДИЗАЙНА СИНТЕТИЧЕСКИХ БАКТЕРИОФАГОВ

А.И. Козырева¹, Д.А. Рыбальченко², Т.А. Полунина², Н.В.Котова², А.В. Коваленко¹,
Д.С. Матюшкина³, В.М. Говорун¹

¹Лаборатория мультиомиксных исследований, НИИ системной биологии и медицины

Роспотребнадзора; ²Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора;

³Лаборатория простых систем, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

Повсеместное распространение мультирезистентных бактериальных патогенов обуславливает актуальность применения альтернативных терапевтических стратегий, таких как «фаготерапия» – использование специфических к целевому возбудителю бактериофагов в медицинских целях [1]. Классическим источником подходящих для фаготерапии агентов являются природные резервуары, однако в настоящий период все активнее применяются бактериофаги, синтезированные искусственно [1, 2].

Синтетические и природные бактериофаги сталкиваются с общим ограничением — способностью патогенов приобретать устойчивость (резистентность). Важнейшую роль в формировании этой устойчивости играют специализированные бактериальные системы защиты — антифаговые системы (АФЗ) [3, 4]. Способность патогенных бактерий приобретать устойчивость к бактериофагам остро ставит вопрос дизайна синтетических агентов для фаготерапии. Ключевым для такого дизайна является понимание активных систем АФЗ, активных в фоновом режиме в отсутствие специфического раздражителя. Такие сведения позволят включать механизмы избегания (escape) постоянно функционирующих систем бактериального иммунитета в конструкцию потенциальных агентов для фаготерапии. Актуальность работы обусловлена продолжающейся 7-й пандемией холеры и манифестацией холерной инфекции, вызванной токсигенными штаммами *Vibrio cholerae* O1 El Tor, в эндемичных регионах [5] на фоне устойчивого роста количества сообщений о приобретении бактериями устойчивости к антибиотикам.

В работе представлен системный анализ геномов и протеомов пяти штаммов *Vibrio cholerae* O1 El Tor, выделенных из клинических и природных источников, с целью выявления репертуара АФЗ и их функциональной активности в отсутствие специфического раздражителя. Большинство штаммов обладают классической структурой генома с двумя хромосомами без плазмид, размером около 4 млн пар оснований [6]. Исключением является штамм M1526, в геноме которого обнаружена крупная плазида, не содержащая известных генов устойчивости или вирулентности, потенциально температурозависимая по данным литературы [7], несущая больше 80% CDS, продукты которых не были обнаружены в данном исследовании по результатам протеомного анализа.

В геномах по данным автоматической аннотации выявлено от 12 до 15 систем АФЗ. Максимальное количество систем (14) и компонентов (31) обнаружено в токсигенном штамме M3208. Минимальное количество систем (12) выявлено в нетоксигенном штамме M1504 из внешней среды. Количество систем защиты, для которых экспрессия всех компонентов подтверждена в настоящей работе, варьирует от 4 в токсигенном штамме M818 до 10 систем АФЗ в штамме M3208. В геномах всех штаммов были предсказаны системы антифаговой защиты типов: RM-I, DMS_other, dXTPase, PDC-S07, экспрессия их компонентов была обнаружена во всех исследованных штаммах.

Общий детектируемый с использованием выбранного метода исследования протеома уровень фоновой экспрессии АФЗ варьируется, но составляет более 50% от предсказанного по данным аннотации количества компонентов с антифаговыми свойствами. Профиль предсказанных и постоянно активных систем АФЗ был уникален в каждом исследованном штамме, что отражает их высокую адаптационную пластичность в условиях различной окружающей среды.

Полученные результаты расширяют понимание молекулярных механизмов защиты и эволюции *V. cholerae*, что имеет важное значение для эпидемиологии, диагностики и разработки новых стратегий профилактики и терапии холеры.

Ключевые слова: микробиология, *Vibrio cholerae*, холерная инфекция, бактериофаги, фаготерапия, протеогеномика, HPLC-MS/MS, геномика, ONT.

1. Skurnik, M., Alkalay-Oren, S., Boon, M. et al. Phage therapy. *Nat Rev Methods Primers* 5, 9 (2025). doi: 10.1038/s43586-024-00377-5.
2. Alessa O, Aiba Y, Arbaah M, et al. Synthetic and Functional Engineering of Bacteriophages: Approaches for Tailored Bactericidal, Diagnostic, and Delivery Platforms. *Molecules*. 2025;30(15):3132. Published 2025 Jul 25. doi:10.3390/molecules30153132
3. Zadnova S.P., Plekhanov N.A., Spirina A.Yu., Cheldyshova N.B. Analysis of Antiphage Systems in *Vibrio cholerae* O1 El Tor Biotype Strains. *Public Health and Life Environment – PH&LE*. 2023;31(11):94-100. (In Russ.) doi: 10.35627/2219-5238/2023-31-11-94-100
4. Hampton HG, Watson BNJ, Fineran PC. The arms race between bacteria and their phage foes. *Nature*. 2020;577(7790):327-336. doi:10.1038/s41586-019-1894-8
5. Multi-country outbreak of cholera, external situation report #31 -29 October 2025. World Health Organization. October 29, 2025. Accessed February 15, 2025. <https://www.who.int/publications/m/item/multi-country-outbreak-of-cholera--external-situation-report--31--29-october-2025>
6. Trucksis M, Michalski J, Deng YK, Kaper JB. The *Vibrio cholerae* genome contains two unique circular chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(24):14464-14469. doi:10.1073/pnas.95.24.14464
7. Okada K, Natakathung W, Na-Ubol M, et al. Characterization of 3 Megabase-Sized Circular Replicons from *Vibrio cholerae*. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(7):1262-1263. doi:10.3201/eid2107.141055

УДК 579

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ЗА ВСПЫШКОЙ ПНЕВМОНИИ, ВЫЗВАННОЙ *Mycoplasma pneumoniae*, НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В ПЕРИОД С ЯНВАРЯ 2024 ПО ИЮНЬ 2025

Е.В. Корнеев¹, И.С. Рог¹, И.К. Чудинов¹, Д.С. Санданова¹, А.В. Павленко², А.И. Козырева¹, Д.С. Матюшкина³, В.М. Говорун^{1,3}

¹Лаборатория мультиомиксных исследований,²Лаборатория математической биологии и биоинформатики,³Лаборатория простых систем, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

Mycoplasma pneumoniae (MP) относится к классу Mollicutes, представляет собой одну из самых маленьких известных клеточных форм жизни и способна вызывать у человека заболевания верхних и нижних дыхательных путей, в том числе внебольничную пневмонию (ВП), а также фарингит, трахеит, трахеобронхит. До пандемии COVID-19 распространение инфекции, вызванной MP, носило характер сезонных эпидемических вспышек с пиком, приходящимся на осенне-зимний период. После снятия ограничений, связанных с COVID-19, в 2023 году вспышка пневмонии, вызванной *M. pneumoniae*, началась в Китае, а затем распространилась по другим странам Азии, а также Европы, включая Россию. MP способна выступать не только в качестве основного возбудителя атипичной пневмонии, но и присоединяться к уже существующему заболеванию, вызванному возбудителями вирусной и бактериальной природы. В этиологической структуре вспышек внебольничных пневмоний (ВП) на территории РФ в 2024 году, как и при спорадической заболеваемости, *M. pneumoniae* преобладала (89,4%) как в качестве единственного возбудителя (64,2%), так и в ассоциации с другими микроорганизмами (25,2%). Препаратами первой линии для лечения MP являются макролиды, второй линии – фторхинолоны и тетрациклины, чрезмерное применение которых ведет к росту уровня устойчивости к ним. Таким образом, целью данного исследования стало проведение молекулярно-генетического мониторинга за вспышкой пневмонии, вызванной MP, в различных регионах Российской Федерации в период с января 2024 по июнь 2025 года.

В исследование включены 482 образца назофарингеальных мазка и 88 образцов сывороток крови от пациентов из 17 регионов РФ. Для всех мазков выполнено исследование на наличие бактериальных и вирусных ко-инфекций методом ПЦР в реальном времени с использованием наборов реагентов АмплиПрайм *M. pneumoniae* / *C. pneumoniae* / *S. pneumoniae* / *H. influenzae* (Некстбио, Россия), АмплиПрайм ОРВИ-комплекс (Некстбио, Россия), и АмплиПрайм SARS-CoV-2 / Flu (A/B/H1pdm09) (Некстбио, Россия). С целью обнаружения мутаций, ассоциированных с устойчивостью к макролидам и фторхинолонам, нами была разработана панель праймеров для амплификации полных последовательностей генов *23S rRNA*, *gyrA*, *gyrB*, *parE*, *parC* и *mgpA* (P1 адгезина) с последующим секвенированием на платформе Oxford Nanopore Technologies. Для образцов сывороток крови был проведен ИФА тест на

обнаружение антител классов IgM и IgG с использованием наборов «ИФА Мико-пневмо-IgM» и «ИФА-Мико-пневмо-IgG» (Эколаб, Россия).

МР была подтверждена в 392 (81,3%) образцах методом ПЦР в реальном времени и в 69,3% (52 из 75) методом ИФА. Бактериальные ко-инфекции были идентифицированы в 134 образцах (27,8%). Наиболее часто встречалась *H. influenzae* (95, 19,7%), также были обнаружены *S. pneumoniae* в 63 (13,1%) и *C. pneumoniae* в 4 (0,8%) образцах. Уровень резистентности к макролидам в различных регионах РФ варьировал в диапазоне от 0% до 50%. Мутация A2063G в гене *23S рРНК*, ассоциированная с устойчивостью к макролидам, была обнаружена в 22,8% случаев (78 из 342). Другая мутация, A2064G, была выявлена в 6 образцах (1,8%). Значимых мутаций, ассоциированных с устойчивостью к фторхинолонам, по данным секвенирования полных генов *parC*, *parE*, *gyrA* и *gyrB*, не обнаружено. Филогенетический анализ показал, что полные последовательности гена *mgpA* (P1 адгезина) формируют две клады, и, таким образом, последовательности разделялись на два типа, где 97,2% были классифицированы как тип P1 1, а 2,8% – как тип P1 2.

Данное исследование выявило изменения в эпидемиологии МР в постпандемический период. Циклический характер заболевания сменился круглогодичной эндемичной циркуляцией, согласно количеству поступивших образцов за указанный период. Имеющиеся результаты демонстрируют динамичный профиль вирусно-бактериальных коинфекций и гетерогенность относительно уровня устойчивости к макролидам (от 0% до 50%) в разных регионах РФ. Общий уровень резистентности составил 22,8%, что ниже показателей, описанных в период с января 2023 по февраль 2024 года [1]. Генотипирование по полному гену адгезина P1 показало наметившееся расхождение: большинство последовательностей кластеризовалось в кладу P1 тип 1, меньшая часть – в кладу P1 тип 2.

Ключевые слова: *Mycoplasma pneumoniae*, внебольничная пневмония, антибиотикорезистентность, бактериальные ко-инфекции, вирусные ко-инфекции.

- 1 Korneenko E, Rog I, Chudinov I, Lukina-Gronskaya A, Kozyreva, A., Belyaletdinova I, Kuzmina J, Evsyutina D, Matyushkina D, Govorun V, Speranskaya, A. Antibiotic resistance and viral co-infection in children diagnosed with pneumonia caused by *Mycoplasma pneumoniae* admitted to Russian hospitals during October 2023—February 2024. *BMC Infectious Diseases*, 2025, 25(1): 363.

УДК 577.22

ПРОТЕОМ МИКОПЛАЗМЫ: КОЛИЧЕСТВА И СВОЙСТВА

А.А. Лазарева¹, Д.С. Матюшкина¹, И.О. Бутенко², В.М. Говорун¹

¹Лаборатория простых систем, ²Лаборатория мультиомиксных исследований,
НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

Микоплазмы – уникальные свободноживущие бактерии, нашедшие компромисс между автономностью и минимальностью. Поэтому этот объект позволяет приблизиться не только к пониманию необходимого набора клеточных функций, но и к пониманию устройства живого. В 2010 году с выходом статьи о создании химически синтезированного генома одной микоплазмы и трансплантации в другой вид микоплазм казалось, что все вопросы об устройстве живого сейчас будут закрыты [1]. Однако дальнейшие исследования показали, что даже еще большая минимизация генома не раскрывает на уровне белковой машинерии всех необходимых для жизнеспособности свойств и функций [2, 3].

Для близкой к минимальной бактерии *Mycoplasma gallisepticum* были описаны как стабильность протеома клетки вне зависимости от внешних условий, так и фактически отсутствие корреляции между уровнем мРНК и белка [3, 4]. Это вызывает вопрос, достаточно ли знаний о геноме для расшифровки логики организации минимальной живой системы. Поэтому в нашей работе была поставлена следующая цель: охарактеризовать протеом *Mycoplasma gallisepticum* как отдельную систему, используя как численные данные о содержании отдельных белков, так и данные об их различных физико-химических свойствах.

В нашей лаборатории для исследования протеомного ответа *M. gallisepticum* на различные стрессы была собрана коллекция из 848 образцов как целых клеточных осадков, так и различных фракций. Объединив все образцы и профильтровав по качеству полученных данных, мы исследовали, что происходит с количествами белков как в среднем во всех условиях, так и в каждом стрессе по отдельности. Мы обнаружили, что примерно 300 белков занимают 95% всей массы протеома вне зависимости от условий. При этом значимых количественных изменений для отдельных белков, как и ожидалось, идентифицировано не было. Однако самые мажорные белки активно меняли свою очередность. В связи с этим мы решили перейти от количественной системе к ранговой, где самому мажорному белку был присвоен ранг 1, а по мере убывания количества белка в образце ранг увеличивался. Мы заметили, что в различных стрессах медианный ранг многих белков активно изменялся, при этом динамика изменения была связана с критичностью стресса для процессов жизнедеятельности микоплазмы. В числе же минорных белков была обнаружена группа, слабо подвергающаяся ранговым изменениям. Для исследования тонких взаимосвязей мы проанализировали корреляции по Пирсону между количественными представленностями белков и обнаружили, что функционально и биологически не связанные минорные белки активно образуют численные связи между собой.

В поисках объяснения обнаруженных закономерностей мы исследовали физико-химические свойства всех белков микоплазмы и заметили, что некоторые выделенные группы

качественно отличаются по некоторым свойствам от тотального протеома, что может быть связано с формированием спектра стабильных ответов клетки на различные условия внешней среды.

Исследование поддержано ГЗ Роспотребнадзора №1022040800170-3-1.6.23 «Создание искусственных клеточных систем».

Ключевые слова: микоплазма, минимальная клетка, системная биология, протеомика, белки.

- 1 Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, Noskov VN, Chuang RY, Algire MA, Benders GA, Montague MG, Ma L, Moodie MM, Merryman C, Vashee S, Krishnakumar R, Assad-Garcia N, Andrews-Pfannkoch C, Denisova EA, Young L, Qi ZQ, Segall-Shapiro TH, Calvey CH, Parmar PP, Hutchison CA 3rd, Smith HO, Venter JC. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* 2010, 329(5987): 52-6, doi: 10.1126/science.1190719.
- 2 Pelletier JF, Sun L, Wise KS, Assad-Garcia N, Karas BJ, Deerinck TJ, Ellisman MH, Mershin A, Gershenfeld N, Chuang RY, Glass JI, Strychalski EA. Genetic requirements for cell division in a genomically minimal cell. *Cell*. 2021, 184(9):2430-2440.e16, doi: 10.1016/j.cell.2021.03.008
- 3 Butenko I, Vanyushkina A, Pobeguts O, Matyushkina D, Kovalchuk S, Gorbachev A, Anikanov N, Fisunov G, Govorun V. Response induced in Mycoplasma gallisepticum under heat shock might be relevant to infection process. *Sci Rep*. 2017, 7(1):11330. doi: 10.1038/s41598-017-09237-7.
- 4 Matyushkina, D.S., Gorbunov, K.S., Fisunov, G.Y., Govorun V.M. Synthetic Biology. Morality and Reason. *Russ J Genet* 2025, 61, 1394–1401. doi:10.1134/S1022795425700942

УДК 543.544.5, 577.112.85

АВТОМАТИЗИРОВАННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИЙ ПЕПТИДНЫХ СТАНДАРТОВ

А.А. Лебедева¹, Г.Л. Кожемякин¹, Н.А. Кициловская², Н.М. Барабошкин¹, О.В. Федоров¹

¹Лаборатория дизайна искусственных ферментов, ²Лаборатория мультимиксных исследований, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

Определение точной концентрации пептидных стандартов является ключевым этапом в исследованиях, связанных с количественной оценкой белков в биологических матрицах, включая плазму крови [1]. Достоверность таких исследований во многом определяется точностью, воспроизводимостью и пропускной способностью методик аминокислотного анализа. Традиционные подходы, основанные на ручном проведении гидролиза и подготовке проб, характеризуются высокой трудоемкостью, значительным влиянием человеческого фактора и ограниченной возможностью масштабирования, что затрудняет их применение при анализе большого числа пептидных стандартов.

В настоящей работе реализован высокопроизводительный автоматизированный подход к аминокислотному анализу пептидных стандартов, направленный на повышение точности, воспроизводимости и стандартизации пробоподготовки. Аналитическая часть методики основана на кислотном гидролизе пептидов с последующим определением концентрации аминокислот, за исключением метионина и цистеина, нестабильных в данных условиях. На этапе отбора образцов и приготовления калибровочных серий использован автоматизированный жидкостный манипулятор (liquid handling robot, Freedom EVO, Tecan), что позволило стандартизировать добавление внутренних стандартов, обеспечить высокую точность дозирования пептидных растворов и строгое соблюдение серийных разведений. Гидролизованные образцы подвергались упариванию и восстановлению, а затем переносились в 96-луночный планшет для анализа. Количественное определение аминокислот проводилось методом ВЭЖХ–МС/МС с обращенно-фазовой хроматографией. Для повышения точности и компенсации матричных эффектов во все калибровочные растворы и исследуемые образцы автоматически добавлялись изотопно-меченые внутренние стандарты (L-лизин-¹³C₆, ¹⁵N₂ и L-аргинин-¹³C₆, ¹⁵N₄) [2].

Автоматизированное приготовление калибровочных растворов и внутренних стандартов в сочетании с 96-луночным планшетом существенно увеличило пропускную способность и позволило параллельно обрабатывать большое число образцов, исключив ошибки ручного пипетирования. В тандеме с высокочувствительным ВЭЖХ–МС/МС-анализом и контролем аминокислотного состава это сформировало точную, воспроизводимую и масштабируемую методику определения концентраций пептидных стандартов. Представленный подход обеспечивает надежную основу для последующих исследований белков в плазме крови, где критически важны точная концентрация и стабильность результатов.

Источник финансирования: ГЗ 1022071500031-4 «Создание платформы быстрой разработки диагностических и прогностических панелей на основе количественного анализа белков плазмы крови человека».

Ключевые слова: аминокислотный анализ, пептидные стандарты, автоматизированная пробоподготовка, универсальная дозирующая платформа, высокопроизводительный анализ, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия.

- 1 Qasrawi DO, Qasrawi DO, Borchers CH. Amino acid analysis for peptide quantitation using reversed-phase liquid chromatography combined with multiple reaction monitoring mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2023, 415(22): 5261–5267, doi: 10.1007/s00216-023-04840-2;
- 2 Carr SA, Kuhn E, Liu T, Massoni SA, Thomas SN, Townsend RR, Zimmerman LJ, Boja E, Chen J, Davies SR, Gao Y, Hiltke TR, Ketchum KA, Mesri M, Meyer MR, Qian WJ, Scott MG, Shi T, Wrobel JA, Wu C, Aebersold R, Bunk DM, Clarke N, Grant RP, Kushnir MM, Moritz RL, Neubert H, Rockwood AL, Rogers J, Wong SH, Zhang S, Chan DW, Chen X, Ellis MJ, Liebler DC, Rodland KD, Rodriguez H, Smith RD, Zhang Z, Zhang H, Hoofnagle AN. Recommendations for the generation, quantification, storage, and handling of peptides used for mass spectrometry-based assays. *Clin. Chem.* 2016, 62(1): 48–69, doi: 10.1373/clinchem.2015.250563.

УДК 577.29

МИНИМАЛЬНАЯ КЛЕТКА: РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА ЗА СЧЕТ ИЗМЕНЕНИЯ РАЗМЕРОВ

Д.С. Матюшкина¹, А.А. Лазарева¹, Е.А. Васильева¹, А.С. Полякова¹, О.В. Щербакова¹,
А.Б. Шикалов¹, Ф.А. Завалко¹, А.М. Свистунов¹, И.О. Бутенко², А.В. Коваленко²,
М.В. Сумарокова³, В.М. Говорун¹

¹Лаборатория простых систем, ²Лаборатория мультиомиксных исследований,

³Лаборатория биоэлектрохимии, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

Наше понимание клеточной организации и жизни во многом основано на геноцентрической центральной догме молекулярной биологии, предложенной Уотсоном и Криком в 1958 году. Эта концепция стала прорывом, стимулировав развитие молекулярной биологии и позволив открыть фундаментальные принципы регуляции как у модельных организмов, таких как *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*, так и у более сложных эукариот. Однако, как ни странно, в более простых клетках, таких как микоплазмы, которые считаются классической моделью минимальной клетки, механизмы адаптации и регуляции не могут быть полностью объяснены этим геноцентрическим подходом.

В таких редуцированных бактериях как микоплазмы метаболизм представлен примерно 280 метаболическими реакциями, а количество транскрипционных регуляторов на порядок меньше, чем в *E. coli*, но несмотря на это, данные бактерии способны выживать в большом диапазоне стрессовых воздействий, что дает повод предположить существование в этих простых клетках более универсального механизма быстрой подстройки метаболизма для реакции на окружающие условия.

В ходе исследования *Mycoplasma gallisepticum* S6 было обнаружено, что универсальной реакцией на различные стрессовые воздействия (тепловой и осмотические шоки, взаимодействие с клеткой-хозяином, длительное голодание) является уменьшение клеточного объема, клетки становятся в два-три раза меньше. Измерение размеров осуществлялось методами сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), динамического рассеяния света (ДРС) (Brookhaven Instrument 90Plus Particle Size Analyzer). Бактериальная клетка независимо от характера стрессовых воздействий уменьшает свои размеры за счет отщепления «tip» органеллы путем образования везикул, при этом изменяя свою морфологию с грушевидной на сферическую. Проведенный протеомный анализ показал, что стрессовые везикулы обогащены основными адгезинами, Vlh-антигенами, протеазами, пептидазами и НАДН-оксидазой. Они секретируют перекись водорода и обладают трипсино-подобной активностью. Мы предполагаем, что эти везикулы могут впоследствии связываться с клетками хозяина, оказывая местное патогенное воздействие и способствуя бактериальной инвазии.

За счет уменьшения объема в клетках происходит подстройка метаболизма к измененным внешним условиям. Это происходит не на геномно-транскриптомном уровне, а за счет изменения локальной концентрации метаболитов и стехиометрии гликолитических белков. Мы

показали, что в клетках после стресса накапливается АТФ. А проведенная реконструкция гликолиза *in vitro* показала, что различные стехиометрические соотношения гликолитических белков сильно влияют на скорость протекания реакции, что в условиях уменьшенного объема *M. gallisepticum* может кардинально влиять на метаболизм клетки.

Данная работа выполнена при поддержке службы Роспотребнадзора ГЗ № 1022040800170-3-1.6.23 «Создание искусственных клеточных систем».

Ключевые слова: минимальная клетка, микоплазма, клеточные размеры, гликолиз, адаптация к стрессу.

УДК 004.42; 004.622; 004.891.2; 004.89

РАЗРАБОТКА ЛОКАЛИЗОВАННОЙ АГЕНТНОЙ ИИ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ПОДДЕРЖКИ ИССЛЕДОВАНИЙ В СИНТЕТИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ НА ОСНОВЕ ВНУТРЕННЕЙ БАЗЫ ЗНАНИЙ

О.В. Федоров¹, П.С. Филиппенко², Д.Д. Байрамкулов¹, Т.В. Пустовалова¹

¹Лаборатория дизайна искусственных ферментов, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора; ²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

В научных лабораториях быстрое (налету) извлечение и анализ данных из отчетов, регламентов и архивов экспериментов имеет критическое значение. Для решения этой задачи нами разработан интеллектуальный агент на базе нескольких крупных языковых моделей с интегрированным доступом к внутренней базе знаний института, реализованной в Obsidian (поддерживаемые форматы: PDF, Excel, Markdown).

Агент функционирует как система deep-research и включает четыре компонента: планировщик, исполнительный модуль, эксперт и ревьюер.

- Планировщик формирует стратегию достижения поставленной цели.
- Исполнительный модуль пошагово реализует план, используя инструменты mcp-сервера, включая поисковый механизм на основе RAG (retrieval-augmented generation).
- Эксперт оценивает полноту и корректность решения по нескольким метрикам.
- Ревьюер агрегирует ключевую информацию, полученную на всех этапах, и формирует итоговый релевантный ответ пользователю.

Такой многоуровневый подход позволяет значительно повысить качество результатов по сравнению с изолированным RAG-модулем и эффективно применять многошаговые стратегии, добиваясь более полного извлечения информации. Агент реализован на фреймворке LlangChain и использует графовую архитектуру. Ядро поисковой подсистемы RAG построено на библиотеке LlamaIndex. Решение поддерживает как использование внешних API-моделей, так и полностью локальный инференс, что обеспечивает защиту чувствительных данных.

Для повышения качества работы RAG-системы была проведена байесовская оптимизация параметров. Она включала выбор стратегии и переменных гибридного поиска (векторное соответствие + ключевые слова по BM25), методов построения индекса векторного хранилища и оптимального способа хранения проиндексированных данных на диске.

Работа выполнена с привлечением финансирования из государственного задания «Энзиматический синтезатор» № 125041005130-8.

Ключевые слова: LLM, ai-agent, RAG, информационные системы, ИИ-ассистент, большие данные, LIMS, электронный лабораторный журнал.

1. ZillizTech. deep-searcher [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://github.com/zilliztech/deep-searcher> (дата обращения: 08.12.2025).

2. LangChain-AI. open_deep_research [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://github.com/langchain-ai/open_deep_research (дата обращения: 08.12.2025).
3. Introduction to Agents Whitepaper [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.kaggle.com/whitepaper-introduction-to-agents> (дата обращения: 08.12.2025).

УДК 577.2

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОМА *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* В СФЕРОПЛАСТАХ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Г.Ю. Фисунов¹, Д.Р. Харрасов¹, Д.С. Матюшкина², Е.А. Цой¹, Е.А. Семенова¹, Р.Р. Кутуков¹,
И.С. Рог³, Д.А. Сандалова³, М.М. Бородина³

¹Лаборатория системного анализа микроорганизмов, ²Лаборатория простых систем,
³Лаборатория мультиомиксных исследований, НИИ системной биологии и медицины
Роспотребнадзора

Развитие синтетической биологии сделало возможным синтез целых бактериальных геномов и эукариотических хромосом. Одним из ключевых этапов этого процесса является клонирование крупных фрагментов ДНК, в том числе полных геномов, в организмах, способных их реплицировать. К таким организмам относятся дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. К настоящему времени в *S. cerevisiae* уже был клонирован ряд геномов микоплазм, в частности *M. genitalium*, *M. pneumoniae*, *M. mycoides*, *A. laidlawii*. В настоящей работе мы провели клонирование генома *Mycoplasma gallisepticum* S6 размером 1 млн п.о. в клетках *S. cerevisiae*. Для этого был разработан транспозонный вектор для *M. gallisepticum*, содержащий репликон и селективный маркер для *S. cerevisiae*. С помощью этого вектора дрожжевой репликон, включающий дрожжевые центромеру и ориджин репликации, был внедрен в геном *M. gallisepticum*, превратив его в дрожжевую центромерную плазмиду. Для дальнейшего клонирования генома был получен пул клонов трансформантов *M. gallisepticum* (культивируемых в одном объеме). Далее клонирование генома микоплазмы (из пула клонов) в сферопластах дрожжей проводилось двумя методами: клетка-сферопласт и геном-сферопласт. В первом методе сферопласты дрожжей сливались с клетками-трансформантами *M. gallisepticum* с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ). Во втором методе интактная геномная ДНК выделялась из клеток трансформантов *M. gallisepticum* и трансформировалась в сферопласты *S. cerevisiae* с помощью ПЭГ. Оба метода привели к получению клонов *S. cerevisiae*, содержащих геном *M. gallisepticum*. Клонированные геномы были верифицированы с помощью нанопорового секвенирования и не содержали потерь или ошибок. Идентифицированные позиции вставки транспозона позволяют использовать эти координаты для модификации синтетического генома *M. gallisepticum* целевыми последовательностями.

Ключевые слова: микоплазма, клонирование генома, сферопласты, центромерная плазида, *Mycoplasma gallisepticum*, *Saccharomyces cerevisiae*.

УДК 615.371

ПРОВЕРКА ГЕНЕТИЧЕСКИ ДЕТОКСИФИЦИРОВАННОЙ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ КОКЛЮШНОГО ТОКСИНА В КАЧЕСТВЕ НОВОГО ВАКЦИННОГО ПРОТОТИПА

В.А. Шокина¹, А.В. Малеева¹, О.В. Щербакова², З.К. Найденышева¹, В.А. Мацевич¹,
Е.В. Киселева³, А.А. Ахметзянова⁴, А.С. Ивкина⁴, Н.Е. Постика¹, А.В. Мелихова⁵,
В.М. Говорун²

¹Лаборатория инфекционной иммунологии, ²Лаборатория простых систем,

³Лаборатория биоэлектрохимии, ⁴Лаборатория преодоления микробной резистентности,

⁵Лаборатория экспериментальных моделей,

НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

В настоящее время для профилактики коклюша применяются два типа вакцин: цельноклеточные и бесклеточные [1]. Цельноклеточные вакцины (ЦВК) представляют собой инактивированные клетки бактерии *Bordetella pertussis*, характеризуются высокой иммуногенностью, однако обладают повышенной реактогенностью. Бесклеточные вакцины содержат от одного до пяти очищенных белковых антигенов *B. pertussis*, характеризуются высокой безопасностью, но в меньшей степени предотвращают бактериальное носительство, передачу инфекции и более короткий иммунитет по сравнению с ЦВК [2]. Оба типа вакцин выпускаются только в составе комбинированных вакцин с дифтерийным и столбнячным анатоксинами и вводятся внутримышечно. Монокомпонентные варианты не применяются.

Предлагаемая нами стратегия разработки вакцинных прототипов основана на использовании рекомбинантных белков *B. pertussis*, экспрессируемых в бактерии *Escherichia coli*. Целью является получение безопасного препарата, сопоставимого по эффективности с цельноклеточными вакцинами, но лишенного их высокой реактогенности как в бесклеточных вакцинах. В рамках работы получена конструкция генетически детоксифицированной каталитической субъединицы коклюшного токсина PtxA, нативный коклюшный токсин (КТ) и филаментозный гемагглютинин (ФГА) из *B. pertussis*. По результатам иммуноферментного анализа полученная субъединица PtxA продемонстрировала иммуногенность ниже, чем инактивированный токсин в эксперименте на мышах. Антитела сыворотки иммунизированных мышей не нейтрализовали нативный КТ *B. pertussis* в тесте кластеризации клеток линии СНО. Группа мышей, иммунизированная инактивированным КТ, показала статистически значимую корреляцию между количеством IgG-антител к КТ и титром нейтрализации нативного токсина.

Дальнейшие исследования включают оценку улучшенных модификаций PtxA с помощью *in silico* дизайна, а также изучение рекомбинантных фрагментов ФГА для выбора оптимального набора антигенов и конструирования фьюжн-белковых прототипов.

Ключевые слова: коклюш, гуморальный иммунный ответ, коклюшный токсин, вакцина, рекомбинантные антигены.

1. Sheng Y, Ma S, Zhou Q, Xu J, et al. Pertussis resurgence: epidemiological trends, pathogenic mechanisms, and preventive strategies. *Frontiers in Immunology* 2025, 16:1618883, doi: 10.3389/fimmu.2025.1618883.
2. Domenech de Cellès M., Rohani P. Pertussis vaccines, epidemiology and evolution. *Nature Reviews Microbiology* 2024, 22: 722–735, doi: 10.1038/s41579-024-01064-8.

УДК_577.1; 577.22; 579.2

L-ФОРМЫ *ESCHERICHIA COLI* – НОВАЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ В СИНТЕТИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ

О.В. Щербакова¹, Д.С. Матюшкина¹, А.А. Лазарева¹, Е.А. Васильева¹, И.О. Бутенко²,
В.М. Говорун^{1,2}

¹Лаборатория простых систем, ²Лаборатория мультиомиксных исследований,
НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

Концентрация макромолекул в цитоплазме клеток очень высока, в *Escherichia coli* (*E. coli*) она составляет порядка 300–400 мг/мл [1]. Такое конденсированное состояние цитоплазмы приводит к образованию немембранных компартментов за счет разделения фаз, определяет характер взаимодействия и состав макромолекулярных комплексов, влияет на активность ферментов, скорость и диффузию протекаемых химических реакций. Большинство современных публикаций, посвященных биологическим конденсатам, выполнены на моделях *in vitro* с применением искусственных или природных полимеров. Однако такие подходы не дают понимания того, является ли такое конденсированное состояние неотъемлемым для живой клетки и в каких рамках возможны изменения степени конденсации. Чтобы ответить на эти вопросы, мы провели «деконденсацию» живой клетки.

Клеточная стенка бактерии, состоящая из пептидогликана, создает внешний каркас и таким образом ограничивает размер клетки. Кроме того, она задействована в синхронизации репликации и деления клетки [2]. Лишив клетку *E. coli* внешнего ограничения и нарушив процесс синхронизации, мы получили клетки различных объемов, превышающих изначальный в сотни раз, но содержащих некротное количество компонентов. Мы применили два подхода: 1) выращивали *E. coli* в присутствии пенициллина, который ингибирует синтез клеточной стенки; 2) обработали *E. coli* цефалексином, ингибитором транспептидазы межклеточной перегородки FstI, и получили филаменты, а затем лизоцимом разрушили клеточную стенку, что привело к образованию гигантских протопластов. L-формы разного размера и контрольные клетки, а также филаменты были подвергнуты сравнительному анализу белкового состава (ВЭЖХ/МС), количества геномов на клетку (ПЦР-РВ), размеров с помощью микроскопии (дифференциальный интерференционный контраст), выживаемости (КОЕ) и метаболической активности.

Оказалось, что концентрация белка в клетке уменьшается при увеличении ее объема, а соотношение белков в клеточных фракциях практически не изменяется. Выявлены закономерности между объемом клетки, степенью деконденсации материи и выживаемостью. С помощью голографической микроскопии было проведено прижизненное наблюдение способности к реверсии L-форм различной плотности в состояние палочки и показано, что распределение плотности цитоплазмы является одним из ключевых факторов жизнеспособности клетки.

Ключевые слова: кишечная палочка, L-формы бактерий, генная инженерия, протеомика, синтетическая биология, клеточная стенка.

1. Phillips R., Kondev, J., Theriot, J. Physical Biology of the Cell. Garland Science, New York. 2008.
2. Thanbichler M. Synchronization of chromosome dynamics and cell division in bacteria. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010 Jan;2(1):a000331. doi: 10.1101

УДК 2788

РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ МОНОВИДОВОЙ БИОПЛЕНКИ ДЛЯ ОЦЕНКИ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ

А.С. Ивкина

Лаборатория преодоления микробной резистентности, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

Цель исследования – разработка и валидация моделей статического и динамического культивирования моновидовых биопленок (БП) для оценки эффективности действия дезинфицирующих средств (ДС).

Материалы и методы. Для формирования моделей БП использовали референсные штаммы *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, которые культивировали статическими и динамическими методами. В качестве тестируемых поверхностей использовали объекты из металла, стекла, кафеля и медицинские силиконовые трубки. Для оценки антимикробной активности использовали несколько видов ДС – надуксусную кислоту (НУК), перекись водорода (ПВ), АДБАХ, натриевую соль ДХЦК.

Для создания статической БП суточную культуру микроорганизма в концентрации 10^6 КОЕ/мл, приготовленной с добавлением ГРМ бульона, наносили на тестируемые поверхности и инкубировали 24 часа при 37°C. Для создания динамической модели микроорганизмы культивировали 4–5 часов в медицинских трубках, затем запускали насос с подачей питательного бульона и инкубировали 24 часа при 37°C. Рост бактериальной БП оценивали по оптической плотности и микроскопически при окрашивании кристаллическим фиолетовым. Жизнеспособность клеток подтверждали подсчетом КОЕ/мл и методом флуоресцентного окрашивания.

Результаты. Оработаны методики статического и динамического культивирования моновидовых БП. Самую плотную БП образовывал штамм синегнойной палочки. При воздействии на микроорганизмы в статической БП концентрацию ДС по сравнению с планктонной культурой необходимо было увеличить в 2–4 раза. Обеззараживание силиконовых трубок после воздействия ДС (ПВ 10%, НУК 0,3%) не достигалось, но имелось уменьшение КОЕ после их воздействия на 3 порядка.

Выводы и заключение. Разработанный протокол культивирования БП позволяет получать БП, пригодные для дальнейшего тестирования ДС. Проведенная оценка антимикробной активности показала повышенную устойчивость микроорганизмов в составе БП к ДС. Разработанные методики внесены в МУ 3.5.1.4130-25, утвержденные Роспотребнадзором.

Ключевые слова: биопленки, дезинфекция, культивирование, микроскопия, устойчивость.

- 1 O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. *J Vis Exp*. 2011 Jan 30;(47):2437. doi: 10.3791/2437. PMID: 21307833; PMCID: PMC3182663.

- 2 Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, Ruzicka F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 2007 Aug;115(8):891-9. doi: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x. PMID: 17696944
- 3 Vatansever C, Turetgen I. Investigation of the effects of various stress factors on biofilms and planktonic bacteria in cooling tower model system. *Arch Microbiol*. 2021 May;203(4):1411-1425. doi: 10.1007/s00203-020-02116-2. Epub 2021 Jan 3. PMID: 33388788.
- 4 Yushina Yu. K., Nasyrov N.A., Zaiko E.V., Grudistova M.A., Reshchikov M.D. Evaluating the effect of various types of disinfectants on bacterial biofilms // *Теория и практика переработки мяса*. 2023. №2. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/evaluating-the-effect-of-various-types-of-disinfectants-on-bacterial-biofilms> (дата обращения: 24.11.2025).

УДК 57.088.1

АНАЛИЗ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК ПРОКАРИОТ НА ОСНОВЕ ПРОЧТЕНИЙ OXFORD NANOPORE

Д.Н. Конанов

Лаборатория математической биологии и биоинформатики, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

Одним из преимуществ технологии секвенирования Oxford Nanopore является возможность анализа эпигенетических модификаций ДНК. В прокариотах наиболее распространенными формами модифицированных оснований являются 6N-метиладенин (6NmA), 5-метилцитозин (5mC) и 4N-метилцитозин (4NmC). Ранее, с использованием ячеек Oxford Nanopore версии r9.4, для корректной идентификации таких оснований было необходимо секвенировать как неамплифицированный (нативный) геномный материал, так и контрольный (после WGA). С выходом новой версии химии r10.4 качество моделей для определения 6NmA, 5mC и 4NmC было значительно улучшено и теперь стал возможным анализ без использования WGA образца.

Важно отметить, что, в отличие от эукариот, прокариотические ДНК-метилтрансферазы имеют строгую специфичность к конкретным геномным мотивам, и определение последовательности этих мотивов представляет отдельную задачу. Классические алгоритмы мотивного обогащения, такие как MEME или STREME, не способны выделять редко либо неравномерно представленные в геноме мотивы метилирования и зачастую склонны к коллизиям структурно-сходных мотивов.

Нами был разработан Snarry – новый алгоритм для идентификации мотивов метилирования с помощью данных ONT r10.4. Snarry можно рассматривать как переосмысление ранее опубликованного алгоритма Snapper, разработанного для работы с данными ONT r9.4. В отличие от Snapper, Snarry не требует использования контрольного образца и заметно превосходит по скорости работы любые аналогичные инструменты. Более того, Snarry не имеет никаких гиперпараметров запуска и оптимизирует все необходимые пороги, исходя из входных данных. Алгоритм был валидирован на данных секвенирования *Helicobacter pylori* J99. Бактерии вида *H. pylori* могут иметь до 30 различных ДНК-метилтрансфераз в геноме, из-за чего являются идеальным объектом для валидации. С помощью Snarry удалось корректно идентифицировать все 20 мотивов, присутствующих в *H. pylori* J99 при глубине покрытия генома 38X. Дополнительно для валидации были использованы внешние данные для еще четырех видов бактерий. Во всех случаях Snarry превзошел наиболее активно применяемый алгоритм идентификации мотивов STREME как по времени работы, так и по качеству мотивного обогащения.

Snarry был применен для анализа метилома ряда бактерий, включая рода *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Yersinia* и *Escherichia*. Наиболее интересными оказались результаты анализа видов *A. baumannii* и *P. aeruginosa*. В *A. baumannii* был идентифицирован

необычный мотив метилирования TTTRAATTYAAA, а также гиперметилирование промотора гена литической муреин-трансгликозилазы *mltB*, чья экспрессия сильно ассоциирована с фитнесом *A. baumannii* при сепсисе.

В *P. aeruginosa* была обнаружена фазовая вариация в гене R-M системы I типа, приводящая к смене специфичности метилтрансферазного комплекса (так называемый фазоварион). Были идентифицированы 17 генов, чья регуляция потенциально может контролироваться данным фазоварионом. Интересно, что среди этих 17 генов оказался ген, кодирующий собственную парную рестриктазу, а также ген *fimW*, чья экспрессия ассоциирована с эффективностью биопленкообразования. Ранее на модельных штаммах *P. syringae* было экспериментально показано, что нокаут схожей метилазы I типа приводит к значимому усилению биоопленкообразования. В дальнейшем планируется экспериментально проверить роль выявленного фазовариона в биоопленкообразовании.

Смежное направление исследований – попытка разрешать эпигенетические сигнатуры не собранных геномов или даже контигов, а индивидуальных прочтений ONT. Были созданы алгоритмы, позволяющие эффективно разделять прочтения с разными эпигенетическими профилями, что было показано как на синтетических примерах, так и на реальных образцах, где присутствовало несколько различных бактерий. Предполагается, что такие подходы помогут производить эпигенетический биннинг метагеномов, улавливать эпигенетическую гетерогенность бактериальных популяций и динамически отслеживать изменения эпигенома во времени.

Ключевые слова: эпигенетика, алгоритмы, метилирование ДНК

- 1 Dmitry N Konanov, Vladislav V Babenko, Aleksandra M Belova, Arina G Madan, Daria I Boldyreva, Oksana E Glushenko, Ivan O Butenko, Dmitry E Fedorov, Alexander I Manolov, Danil V Krivonos, Vassilii N Lazarev, Vadim M Govorun, Elena N Ilina, Snapper: high-sensitive detection of methylation motifs based on Oxford Nanopore reads, *Bioinformatics*, 39:11, November 2023, btad702, doi: 10.1093/bioinformatics/btad702
- 2 Dmitry N Konanov, Danil V Krivonos, Vladislav V Babenko, Elena N Ilina, Snappy: fast identification of DNA methylation motifs based on Oxford Nanopore reads, *Bioinformatics Advances*, 5:1, 2025, vba296, doi: 10.1093/bioadv/vba296
- 3 Jiadai Huang, Fang Chen, Beifang Lu, Yue Sun, Youyue Li, Canfeng Hua, Xin Deng, DNA Methylome Regulates Virulence and Metabolism in *Pseudomonas syringae*, *eLife*, 2024, 13:RP96290, doi: 10.7554/eLife.96290.2
- 4 Crépin S, Ottosen EN, Peters K, Smith SN, Himpl SD, Vollmer W, Mobley HLT. The lytic transglycosylase MltB connects membrane homeostasis and in vivo fitness of *Acinetobacter baumannii*. *Mol Microbiol.* 2018 Sep;109(6):745-762. doi: 10.1111/mmi.14000

УДК 575.112

АНАЛИЗ ВОЗРАСТНЫХ ЗАВИСИМОСТЕЙ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ НА ОСНОВЕ БОЛЬШИХ ДАННЫХ

А.И. Манолов¹, А.А. Шатохин¹, А.В. Павленко², Д.Е. Федоров¹, П.М. Лихачева⁵,
К.А. Клочков^{1,5}, М.А. Верещагин¹, Р.И. Верещагин¹, Е.Г. Гукин¹, Ю.А. Ларина¹,
П.К. Парамоненко¹, Н.Д. Ротай¹, К.С. Горбунов³, В.М. Говорун⁴

¹Лаборатория цифрового мониторинга здоровья человека, ²Лаборатория математической биологии и биоинформатики, ³Лаборатория эпидемиологии человека, ⁴Лаборатория простых систем, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора; ⁵Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Ранее проведенные исследования показали высокую ценность анализа рутинно сдаваемых показателей крови для изучения фундаментальных физиологических механизмов человека, а также продемонстрировали, что изменения показателей внутри референсных интервалов являются информативными и отражают риски ухудшения состояния здоровья [1].

В настоящей работе мы проанализировали более миллиарда отдельных измерений 80 наиболее часто анализируемых показателей крови. Данные за период с 2016 года по настоящее время были получены из четырех крупнейших коммерческих лабораторий Российской Федерации.

Нами были реконструированы непрерывные возрастные траектории физиологических параметров с годовым разрешением. Показано, что большинство параметров изменяются с возрастом нелинейно, причем выраженность нелинейности систематически выше у женщин, чем у мужчин. Наибольшие скорости возрастных изменений наблюдаются в пубертатный период (11 лет у девочек и 14 лет у мальчиков), а у женщин дополнительный выраженный пик приходится на возраст около 50 лет, соответствующий менопаузальному переходу. Для обоих полов выявлен общий пик нелинейности в диапазоне 35–41 года (максимум около 37 лет), после чего после примерно 65 лет наблюдается выраженное замедление темпов физиологических изменений.

Показатели печени (АЛТ, АСТ) демонстрируют двухфазную динамику с ростом до среднего возраста и последующим снижением, что хорошо согласуется с независимыми данными по возрастной динамике массы печени. Параметры эритропоэза (эритроциты, гемоглобин, RDW) характеризуются выраженным половым диморфизмом, пубертатным и менопаузальным пиками. Среди параметров с преимущественно монотонными возрастными трендами доминируют маркеры воспаления (СРБ, СОЭ, Д-димер, фибриноген, нейтрофилы), что отражает процессы роста фонового воспаления с возрастом (inflammaging). Напротив, уровни Т3, тестостерона и DHEA-S демонстрируют устойчивое возрастное снижение.

Для большинства параметров выявлен почти линейный рост вариабельности с возрастом. У женщин этот рост продолжается вплоть до 85 лет, тогда как у мужчин наблюдается плато

после 65–70 лет. Для ряда показателей показано расхождение динамики средних значений и вариабельности, что указывает на частичную независимость механизмов регуляции уровня параметра и его устойчивости. В целом работа демонстрирует, что анализ первых и вторых производных возрастных траекторий позволяет выявлять ключевые биологические переходы существенно точнее, чем анализ средних уровней. Сложная форма наблюдаемых изменений говорит в пользу запрограммированной программы изменений физиологического состояния организма вплоть до возраста примерно в 65 лет.

Ключевые слова: возрастные изменения, показатели крови, большие данные, физиология старения, нелинейная динамика, пубертат, менопауза, эритропоэз, воспаление, inflamtaging, вариабельность параметров, производные временных рядов, биологические переходы.

- 1 Cohen NM, Schwartzman O, Jaschek R, Lifshitz A, Hoichman M, Balicer R, Shlush LI, Barbash G & Tanay A. Personalized lab test models to quantify disease potentials in healthy individuals. *Nature Medicine* 2021, 27(9): 1582–1591, doi: 10.1038/s41591-021-01468-6.

УДК 575.112

РЕФЕРЕНС-НЕЗАВИСИМЫЙ ПОИСК РАСПРОСТРАНЯЮЩИХСЯ ОРГАНИЗМОВ В ДАННЫХ МЕТАГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Н.С. Попов^{1,2}, В.В. Панова¹, С.А. Гуров³, М.В. Молчанова³, А.Н. Лукашев², А.И. Манолов¹,
Е.Н. Ильина⁴, В.М. Говорун⁵

¹Лаборатория цифрового мониторинга здоровья человека, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора; ²Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского, ПМГМУ им. И.М. Сеченова;
³Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет); ⁴Лаборатория математической биологии и биоинформатики и ⁵Лаборатория простых систем, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

В мире существует постоянный риск возникновения новых вирусных инфекций; так, за последние 20 лет подтверждено появление более 14 новых зоонозных инфекций. Это обуславливает необходимость постоянного мониторинга микроорганизмов, циркулирующих в биосфере. Не все микроорганизмы вызывают острые симптомы у носителей, и, что особенно критично, последовательности нового распространяющегося потенциального агента могут не иметь гомологии, определяемой классическими методами биоинформатики. Для отслеживания таких случаев мы предлагаем использовать анализ распространения последовательностей во временных сериях метагеномных данных.

Мы используем три подхода для поиска новых распространяющихся микроорганизмов. Первый из них основан на использовании последовательностей фиксированной длины (k-меров). По изменению представленности и распространенности определенных k-меров, не принадлежащих уже известным организмам, можно детектировать наличие новых вирусов. Второй подход основан на способности больших языковых моделей создавать эффективные низкоразмерные представления генетических последовательностей. По заполненности ячеек латентного пространства предполагается определить наличие нового вируса. Третий подход предполагает анализ ширины покрытия контигов. Из сырых прочтений собираются контиги. Затем на каждый контиг, собранный из образцов, взятых после появления инфекции, картируется каждое прочтение. Далее проводится анализ ширины покрытия контигов в образцах и определяется наличие тенденции к росту встречаемости соответствующей последовательности.

Эти подходы были протестированы на массиве данных тотальной РНК из верхних дыхательных путей, собранных до и после начала пандемии COVID-19 (2020 год) из 367 образцов. Массив данных был собран из NCBI SRA по ключевым словам nasopharyngeal swab, nasopharynx, respiratory OR nasal OR oral NOT gut, Homo Sapiens, Human, RNA-Seq [Strategy], ампликонные данные исключались из рассмотрения вручную. Общие объемы данных в выборках до и после начала пандемии сопоставимы.

Применение всех трех методов к описанному датасету подтвердило их способность выявить присутствие SARS-CoV-2 с различными значениями чувствительности: 1,00, 0,85, 0,47 соответственно для метода сборки и картирования, метода k-меров и LLM-метода.

Для тестирования чувствительности этих трех методов при различном количестве возникающего агента мы создали полусинтетический набор данных: к коротким прочтениям из реальных образцов добавляются симулированные короткие прочтения вируса новооткрытого порядка *Egovirales*.

Эксперименты на полусинтетическом наборе данных показали, что методы на основе картирования и на основе k-меров сохраняют чувствительность, близкую к единице при доле нового агента в $4.35e-04$ от всех коротких прочтений. Однако при меньшей концентрации агента эти методы теряют в чувствительности, в то же время, метод на основе LMM показывает меньшие значения точности, но сохраняет чувствительность при низких концентрациях агента.

Финансирование: Исследование поддержано государственным заданием «Разработка алгоритмов выявления новых уникальных последовательностей ДНК или РНК в метагеномах и их фенотипических характеристик in vitro», номер 122030900069-4.

Ключевые слова: болезнь X; метагеномика; LLM; мониторинг.

УДК 575.112

ИССЛЕДОВАНИЕ ПАТТЕРНОВ МУТАЦИЙ СУПЕР-РАСПРОСТРАНТЕЛЕЙ COVID-19

А.Е. Самойлов¹, А.Н. Лукашев²

¹Лаборатория математической биологии и биоинформатики, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, ²НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

Большие геномные данные SARS-CoV-2 являются источником информации о самой масштабной пандемии в истории человечества. Одной из особенностей COVID-19 стал феномен супер-распространительства, когда один инфицированный индивид мог инфицировать десятки или даже сотни контактировавших с ним. Реорганизация геномных данных в виде графа, где в вершинах расположены уникальные генетические последовательности, а направление ребер соответствует направлению эволюции и увеличению количества мутаций, показывает, что из подавляющего большинства вершин выходит от одного до десяти ребер, но у относительно небольшого количества вершин количество выходящих ребер составляет десятки и даже сотни. Было выдвинуто предположение, что супер-распространительство также связано с распространением потомков с повышенным генетическим разнообразием, вызванным особенностями биологии хозяина (например, измененной активностью деаминаз APOBEC, ADAR). Для проверки этой гипотезы были построены частичные графы мутаций – получены пары последовательностей, отличающихся на единственную однонуклеотидную замену. Для выявления эффекта изменения паттерна возникновения мутаций проводился тест хи-квадрат, где сравнивалась в потомках на расстоянии одной замены частоты определенного класса замен (например, C->T) и количества иных замен между двумя группами: геномы с количеством уникальных потомков, не превышающей 10, и группа геномов с более чем 50 уникальными потомками. Первоначальные тесты показали статистически значимые отличия между этими группами (p -value $\ll 1e-100$), однако после фильтрации, включавшей удаление мутаций в сайтах посадки праймеров, известных позиций с высоким уровнем гомоплазии, фильтрации псевдореверсий, уровень различий между сравниваемыми группами снизился, а в большинстве случаев просто исчез. Кроме того, анализ частот встречаемости геномов с высоким и низким числом потомков показал, что наблюдаемое разнообразие потомков для отдельных вершин на графе наиболее просто объясняется распространенностью генотипа предка. Таким образом, гипотеза о том, что суперспредеры имеют иной паттерн частот мутаций, не нашла подтверждения в анализируемых данных.

Работа поддержана субсидией Роспотребнадзора № 141-02-2023-208.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, супер-распространитель, COVID-19, эволюция вирусов.

УДК 577.352

СТАБИЛЬНОСТЬ И МОРФОГЕНЕЗ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ МЕМБРАН: РОЛЬ ЛИПИД-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

Е.О. Василенко^{1,2,3}, П.И. Кузьмин⁴, П.В. Башкиров¹

¹Лаборатория биоэлектрохимии, НИИ системной биологии и медицины

Роспотребнадзора; ²Сколковский институт науки и технологий,

³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,

⁴Институт физической химии и электрохимии РАН им. А.Н. Фрумкина

Липидные мембраны — крайне переменчивые структуры. Геометрия и топология постоянно меняются при образовании транспортных везикул, росте нанотрубок, делении органелл и клеток. Место, кинетику и геометрию этих перестроек тонко регулируют белки. До сих пор спорят о молекулярных механизмах, которые создают локальную кривизну. Периферические белки часто выгибают мембраны и порождают положительную спонтанную кривизну. Плоская мембрана теряет устойчивость при уменьшении латерального натяжения и увеличении поверхностной концентрации белка, спонтанно образуются сильно искривленные структуры [1, 2]. До последнего времени теория описывала эту потерю устойчивости и предсказывала спинодаль, зависимость критического натяжения от заполнения поверхности белком [3, 4], только для однокомпонентных мембран. В этих моделях не учитывалась роль липидного состава, хотя измерения показали, что добавление конического липида ДОФЭ смещает спинодаль в сторону снижения устойчивости и облегчает белок-индуцированную потерю устойчивости мембраны [1].

Для развития модели использовались теории упругости мембран [5, 6] и регулярных растворов. Мы построили обобщенную модель, которая предсказывает условия геометрической устойчивости многокомпонентных липидных мембран при взаимодействии с белками и пептидами. Наша теория учитывает бислойную структуру мембраны и различное сродство белков к липидам, которое часто определяется зарядами. Мы показали, что предпочтительное связывание периферических белков и амфифильных пептидов с цилиндрическим липидом ДОФС объясняет снижение устойчивости при увеличении доли конического липида ДОФЭ в составе мембраны. Сопоставление теоретических предсказаний с измерениями позволило количественно оценить энергию избирательного липид-белкового взаимодействия. Таким образом, модель позволяет предсказывать влияние белков на устойчивость и морфогенез мембран. Мы предполагаем использовать разработанный алгоритм для рационального дизайна синтетических липид-белковых систем с управляемой геометрией.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-00265-П.

Ключевые слова: мембраны, липиды, кривизна, устойчивость, адсорбция, биофизика.

- 1 Shi Z, Baumgart T. Membrane tension and peripheral protein density mediate membrane shape transitions. *Nature Communications* 2015, 6(1): 5974, doi: 10.1038/ncomms6974.
- 2 Stachowiak JC, et al. Membrane bending by protein–protein crowding. *Nature Cell Biology* 2012, 14(9): 944-949, doi: 10.1038/ncb2561.
- 3 Cahn JW. On spinodal decomposition. *Acta Metallurgica* 1961, 9(9): 795-801, doi:10.1016/0001-6160(61)90182-1.
- 4 Shi Z, Baumgart T. Dynamics and instabilities of lipid bilayer membrane shapes. *Advances in Colloid and Interface Science* 2014, 208: 76-88, doi: 10.1016/j.cis.2014.01.004.
- 5 Helfrich W, Servuss RM. Undulations, steric interaction and cohesion of fluid membranes. *Il Nuovo Cimento D* 1984, 3(1): 137-151, doi: 10.1007/BF02452208.
- 6 Leibler S. Curvature instability in membranes. *Journal de Physique* 1986, 47(3): 507-516, doi: 10.1051/jphys:01986004703050700.

УДК 575.174.015.3; 573.22

РЕФЕРЕНСНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАК ПРОБЛЕМА СИСТЕМНОЙ БИОЛОГИИ

К.С. Горбунов¹, О.В. Курилова¹, А.Н. Свешникова¹, А.И. Манолов²

¹Лаборатория эпидемиологии человека, ²Лаборатория цифрового мониторинга здоровья человека, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

Референсные значения биологических показателей чаще всего рассматриваются как тривиальное следствие их распределения в популяции, пригодное исключительно для практических нужд. Такая трактовка отбрасывает значительную часть биологической информации, заключенной в имеющихся данных, включая их природу и взаимосвязь с эволюционными процессами в человеческих популяциях. Вместе с тем отсутствие должной теоретической интерпретации тормозит и практическое использование референсных значений.

Классическое представление о “норме реакции”, введенное Ричардом Волтереком в 1909 году, как набор возможностей для данного генотипа, формируемого внешней средой, определило геноцентрическую парадигму анализа вариабельности биологических параметров, что в свою очередь ограничивает наши подходы к возможному анализу популяционных данных [1]. В частности, отдельного внимания требует “физиологическая и поведенческая подсистемы” рассматриваемых организмов [2].

В нашем случае мы сталкиваемся с практически обратной задачей анализа больших массивов популяционных данных с неизвестными генотипами, а также с определением и интерпретацией территориальных и временных различий в этих данных.

На конференциях или обсуждениях с коллегами (которые находят отражение и в литературе) многие специалисты склоняются либо к формально-статистическому истолкованию нормы и исключению вопроса о “нормальности” из сферы науки, либо к релятивизму, сводящемуся к максиме “сколько людей, столько и норм”. В нашей работе мы последовательно придерживаемся биологической интерпретации вопроса о “норме и нормальности”, усматривая в ней прямую связь с адаптивными, популяционными и эволюционными явлениями, характерными для всех живых организмов, включая человека.

Ни одна биологическая адаптация не является 100% эффективной. Вместе с тем природа использует вполне конкретные приспособления для обеспечения своих “целей”.

Эти принципы определяют условия существования нормы и нормальности как общебиологического явления. С одной стороны, наличие четких, физиологически оправданных механизмов, с другой – некоторой диапазон их “допустимой нейтральности” с точки зрения вероятной эффективности достижения адаптивного эффекта. Этот разброс и обуславливает нормальный диапазон признака и его распределение в популяции. Некоторые механизмы требуют точного контроля и потому имеют узкие нормальные диапазоны (например, рН крови и электролиты), другие меняются в гораздо более широком диапазоне (титр антител, С-реактивный белок, рост и вес человека). Широкий диапазон признака связан с невозможностью

однозначной гарантии требуемой адаптации, либо с его большей нейтральностью с точки зрения естественного отбора, не приведшей к выработке точных или энергоемких механизмов его регуляции.

Для интерпретации наблюдаемых у индивидов и в популяции значений гематологических и биохимических параметров мы применяем моделирование.

В частности, были определены референсные интервалы для количества тромбоцитов, специфичных для возраста, пола и региона проживания для жителей Российской Федерации, а также получена минимальная математическая модель, позволяющая объяснить наблюдаемые различия.

Доклад посвящен факторам, влияющим на различие референсных интервалов, преимущественно на примере населения Российской Федерации.

Ключевые слова: “норма”, референсные значения, референсные интервалы, лабораторная диагностика, биология популяций, микроэволюция.

- 1 Santos Mira, M. A., & Pen, I. (2022). Modelling reaction norms with few assumptions. Poster session presented at Netherlands Society for Evolutionary Biology Meeting 2022, Ede, Netherlands. https://www.nlseb.nl/_files/ugd/0c83b3_56eba9f51b5e468d907416b36d3f6f1e.pdf
- 2 Voelkl, B., Würbel, H. A reaction norm perspective on reproducibility. *Theory Biosci.* 140, 169–176 (2021). <https://doi.org/10.1007/s12064-021-00340-y>

УДК 541.18.03

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРО И НАНОПОРИСТОСТИ pH-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ПОЛИМЕРОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АППРОКСИМАЦИИ МАКСВЕЛЛА–ГАРНЕТТА

С.П. Дудик¹, Р.И. Шакуров¹, С.В. Сизова,¹ П.В. Башкиров^{1,2}

¹Лаборатория микро- и нанофлюидики, ²Лаборатория биоэлектрохимии, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора

В последние десятилетия стимул-чувствительные полимеры привлекают большое внимание. Их способность изменять конформацию в ответ на определенный внешний стимул открывает широкие возможности для создания новых сенсоров, носителей лекарственных препаратов и модификации покрытий. Среди стимул-чувствительных полимерных покрытий наиболее распространены pH-чувствительные. Один из управляемых параметров таких покрытий — их микро- и нанопористость, которая определяет селективность покрытия по отношению к молекулам разного размера. Однако прямое измерение характерного размера пор в водном окружении является затруднительным.

В данном исследовании мы изучаем изменение конформации двух полимеров под воздействием pH: разветвленного полиэтиленimina и сополимера полилизина с гексаглицином. Для оценки пористости мы разработали подход, который объединяет два метода исследования поверхностей: атомно-силовую микроскопию в жидкой фазе (АСМ) и биосенсор на основе поверхностных волн в фотонном кристалле (ПВФК) [1]. В качестве материала подложки в обоих методах (АСМ и ПВФК) использовался оксид кремния (SiO₂). Образцы исследовались в жидкой среде с помощью зондов с золотым покрытием (CSG10) полуконтактным методом без высушивания. Для измерения толщины слоя на поверхности формировалась царапина с соблюдением условия: твердость лезвия по Моосу должна быть ниже твердости SiO₂. Это необходимо для того, чтобы не повредить фотонный кристалл и создать четкий перепад высот между полимером и SiO₂.

Установив изменение толщины полимерного слоя в результате изменения pH с помощью АСМ, мы сопоставили эти данные с результатами измерений на ПВФК-биосенсоре и, используя аппроксимацию Максвелла–Гарнетта, рассчитали значение пористости покрытия. Данная модель описывает связь между эффективной диэлектрической проницаемостью слоя на поверхности фотонного кристалла и эффективным показателем преломления многокомпонентной системы, что позволяет рассчитать долю включений, заполненных водой [2]. В качестве контроля – покрытия без включения водной фазы (нулевой радиус пор) – использовался липидный бислой, сформированный липидом ДОФХ. Мы выяснили, что снижение pH приводит к увеличению толщины и пористости полимерного слоя примерно в два раза для исследуемых полимеров. Этот результат мы связываем с конформационными изменениями полимера при его протонировании. Полученные данные согласуются с литературными источниками [3].

Ключевые слова: биосенсор, фотонный кристалл, адсорбция, атомно-силовая микроскопия, пористость.

- 1 Shakurov R.I., Sizova S.V., Dudik S.P., et al. Dendrimer-Based Coatings on a Photonic Crystal Surface for Ultra-Sensitive Small Molecule Detection // *Polymers*. 2023. Vol.15. P.2607
- 2 M. Losurdo and K. Hingel. Ellipsometry at the Nanoscale. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. ISBN: 978-3-642-33955-4
- 3 Jiaying Li, Ameya Krishna B, Gerard van Ewijk, Derk Jan van Dijken, Wiebe M. de Vos, Jasper van der Gucht, A comparison of complexation induced brittleness in PEI/PSS and PEI/NaPSS single-step coatings, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Volume 648, 2022, 129143, ISSN 0927-7757

УДК 616-092.12

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ «ИНДЕКСОВ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЙ» В ОТДЕЛЕНИИ ИНТЕНСИВНОЙ ТЕРАПИИ

Е.Ю. Берсенев¹, О.В. Курилова¹, Е.О. Селло¹, К.С. Горбунов¹, А.Н. Свешникова¹,
Л.А. Давыдова², Т.А. Лапина²

¹Лаборатория эпидемиологии человека, НИИ системной биологии и медицины
Роспотребнадзора; ²НМРЦ «Лечебно-реабилитационный центр» Минздрава РФ

Современная парадигма прогнозирования исходов в интенсивной терапии основана на динамической и интегративной оценке данных, где ключевую роль играют относительно простые в расчете, но высокоинформативные шкалы, индексы и биомаркеры. Прогностическая ценность таких показателей, в отличие от разовых измерений, принципиально возрастает при анализе их тренда во времени. В частности, диастолический шоковый индекс (ДШИ, отношение ЧСС к диастолическому АД) с порогом $>2,2$ является валидированным предиктором 28-дневной летальности при септическом шоке, а его комбинация с уровнем лактата >2 ммоль/л усиливает прогностическую точность [1, 2]. Важно отметить, что значимым метаболическим маркером выступает не абсолютный уровень лактата, а его клиренс: отсутствие снижения на 10% и более в первые 6 часов независимо ассоциировано с неблагоприятным исходом [3]. Простым индикатором дисфункции вегетативной регуляции служит соотношение ЧСС к температуре тела: значение $>20,5$ уд/мин/°C предсказывает летальность при сепсисе, а феномен относительной брадикардии (прирост ЧСС <10 уд/мин на 1°C) связан с лучшим прогнозом при COVID-19 [4, 5].

Перспективными для изучения также оказываются основные показатели гомеостаза и регуляторных функций организма человека, традиционно используемые при оценке и количественном измерении уровня здоровья (адаптационных резервов), а также характера вегетативной регуляции кровообращения (симпатикотония, нормотония или парасимпатикотония). Таковыми являются Индекс Функциональных Изменений (ИФИ) и модифицированный вегетативный Индекс Кердо (ВИК, формула без умножения на 100%), а также их соотношения, показатели регрессии или векторные значения. Основным преимуществом является то, что индексы могут быть рассчитаны на основе мгновенных значений показателей прикроватных мониторов, антропометрии и возраста. Некоторыми «весовыми» факторами могут являться исходные данные о сопутствующей патологии, которые, однако, уже учитываются при поступлении в отделение реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) при индивидуальной оценке тяжести состояния пациента и прогнозе исхода (срочном и отдаленном), а также выборе стратегии терапии, например APACHE, SAPS, MPM, SOFA, NUTRICS и их модификации.

Нами были собраны и изучены данные из электронных медицинских карт и выписных эпикризов, карт наблюдения пациентов «Лечебно-реабилитационного центра», находившихся в ОРИТ в период с июня 2023 года по май 2024 года. Проведение совместных исследований и предоставление данных, было согласовано в рамках выполнения научно-

исследовательских работ по тематике государственного задания и одобрено независимым этическим комитетом учреждения (номер разрешения: ЕС/052 от 12.04.2023).

Объем выборки составил 22 пациента, при этом критериям включения в исследование соответствовали пациенты в возрасте от 25 до 80 лет, находившиеся в ОРИТ менее 7 дней, поступившие после обширных нейрохирургических вмешательств, с осложнениями предшествующих заболеваний или с острым инсультом. Учитывали клинические показатели прикроватного мониторинга гемодинамики, сатурации и температуры, биохимические и бактериальные анализы, инфузионную терапию и вазопрессорную поддержку, параметры вентиляции легких, длительность пребывания в стационаре, сопутствующие заболевания и др.

В итоговую группу вошли 10 пациентов, с полноценным набором комплексных данных, которые были разделены на 2 подгруппы для углубленного анализа последних 72 часов пребывания в ОРИТ (без учета гендерного фактора): Группа А: переведенные в профильное отделение стационара – 5 пациентов, возраст (ВЗ) 60 лет (46–77), индекс массы тела (ИМТ) 26,8 (18,1–41) и Группа Б: умершие – 5 пациентов, ВЗ 67,3 лет (61–76), ИМТ 29,1 (21,7– 44,9). В качестве Группы сравнения В использованы данные исследования 22 здоровых добровольцев, ВЗ 33,1 года (18–55), ИМТ 22,2 (17,3–29,4), проведенные в ноябре 2023 года, когда в течение трех последовательных дней многократно регистрировали показатели психофизиологического статуса, данные гемодинамики и показатели крови.

Среднесуточные индексы ИФИ и ВИК в Группе А выявили тренды изменений ИФИ (ср.зн.±СКО): в 1-е сутки $2,91\pm 0,2$, во 2-е сутки $2,88\pm 0,27$, в 3-е сутки $2,97\pm 0,32$, при этом «уровень адаптации организма» по критериям (диапазону) ИФИ соответствовал зоне «напряжения механизмов адаптации». Отмечалось снижение ВИК (ср.зн.±СКО): $0,20\pm 0,1$, $0,10\pm 0,2$ и $0,12\pm 0,14$ соответственно, переход от симпатикотонии к нормотонии. В Группе Б наблюдалось снижения индекса ИФИ от критически высоких показателей: $3,20\pm 0,6$, $2,99\pm 0,5$ и $2,57\pm 0,86$, что можно охарактеризовать как снижение адаптационных резервов для данной группы, на фоне резкого роста ВИК (симпатикотонии) в последние сутки: $0,39\pm 0,1$, $0,26\pm 0,2$ и $0,44\pm 0,11$. В Группе В колебания ИФИ и ВИК варьировались в пределах нормальных диапазонов значений, удовлетворительной адаптации – для ИФИ: $2,19\pm 0,4$, $2,17\pm 0,4$ и $2,15\pm 0,4$ и нормотонии для ВИК: $-0,05\pm 0,2$, $-0,02\pm 0,2$ и $0,01\pm 0,2$.

Предварительный анализ данных демонстрирует выраженные различия динамики и векторного направления (по данным линейной регрессии) индексов ИФИ и ВИК между группами Б и А пациентов ОРИТ в среднесуточном 72-часовом «окне наблюдения» и характерные отличия с группой В – здоровыми людьми в условиях обычной «рабочей» недели при последовательном 3-дневном исследовании.

В перспективе дальнейшего развития тематики актуальным направлением является интеграция динамических индексов функциональных состояний с данными протеомного профилирования крови исследованных когорт, а их последующий анализ открывает путь к созданию прецизионных, многоуровневых систем прогнозирования, позволяющих выявить новые биомаркеры и патогенетические механизмы критических состояний.

Данное исследование выполнено в рамках государственного задания № 122030900062-5.

Ключевые слова: индекс функциональных изменений (ИФИ), индекс Кердо (ВИК, интенсивная терапия, функциональное состояние, вегетативная регуляция.

- 1 Ospina-Tascón GA, Teboul JL, Hernandez G, et al. Diastolic shock index and clinical outcomes in patients with septic shock. *Ann Intensive Care*. 2020;10:41.
- 2 Kim DS, Park JE, Hwang SY, et al. Prediction of vasopressor requirement among hypotensive patients with suspected infection: usefulness of diastolic shock index and lactate. *Clin Exp Emerg Med*. 2022;9(3):176-186.
- 3 Bruno RR, Wernly B, Binneboessel S, et al. Failure of Lactate Clearance Predicts the Outcome of Critically Ill Septic Patients. *Diagnostics (Basel)*. 2020;10(12):1105.
- 4 Lin Z, Lin S. Heart rate/temperature ratio: A practical prognostic indicator for critically ill patients with sepsis. *Heliyon*. 2024;10(2):e24422.
- 5 Bistrovic P, Besic D, Cikara T, et al. Relative Bradycardia and Tachycardia and Their Associations with Adverse Outcomes in Hospitalized COVID-19 Patients. *Rev Cardiovasc Med*. 2023;24(8):238.

УДК 577.352

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВАЦИОННОГО БАРЬЕРА ДЛЯ СЛИЯНИЯ ФОСФОЛИПИДНЫХ МОНОСЛОЕВ В ПРОЦЕССЕ КОАЛЕСЦЕНЦИИ ЛИПИДНЫХ КАПЕЛЬ

Р.Ю. Молотковский¹, Р.В. Павлов², З.Г. Дениева³, П.В. Башкиров^{1,2}

¹Лаборатория биоэлектрохимии, ²Лаборатория микро- и нанофлюидики, НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора;

³Лаборатория биоэлектрохимии, Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук

Липидные капли (ЛК) – это органеллы, отвечающие за накопление и расщепление нейтральных жиров в клетках организма. Оболочка, ограничивающая ЛК, представляет собой фосфолипидный монослой, состоящий преимущественно из диолеоилфосфатидилхолина (ДОФХ). В нормальных условиях она предохраняет ЛК от спонтанного слияния. Поэтому в клетках размер ЛК регулируется специализированными белками, обеспечивающими эффективное слияние липидных оболочек. Однако при нарушении клеточного метаболизма или липидного обмена состав оболочек ЛК изменяется [1], что может привести к их неконтролируемому росту, активируя безбелковое слияние. Эффективность слияния (коалесценции) ЛК определяется энергией, затраченной на их сближение и последующую топологическую перестройку их липидных оболочек (монослойное слияние). Эта энергия зависит от состава липидного состава оболочек. Известно, что при некоторых патологических состояниях, сопряженных с увеличением размера ЛК, в составе их оболочек увеличивается мольная доля такого липида как диолеоилфосфатидилэтаноламина (ДОФЭ) [1].

В данной работе мы исследуем, как этот липид влияет на высоту активационного барьера слияния модельных адипосом, используя метод динамического светорассеяния для наблюдения за кинетикой их спонтанного роста [2]. Кроме того, нами предложена теоретическая модель, описывающая это явление [3]. Нами показано, что энергетическая траектория монослойного слияния сильно зависит от липидного состава сливающихся оболочек и от размеров липидных капель. Изменение радиуса кривизны липидных капель влияет на характер энергетической траектории слияния, и при уменьшении радиуса слияние становится однопольным процессом. Высота этого барьера в наибольшей степени определяется липидным составом сливающихся монослоев; увеличение доли ДОФЭ приводит к уменьшению высоты барьера и облегчению слияния, что регистрируется как увеличение размеров липидных капель. Наши результаты устанавливают зависящие от состава правила для управления динамикой липидных капель в условиях клеточного метаболизма и для разработки липидных средств доставки.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Ключевые слова: липидная мембрана, эмульсия жир/вода, коалесценция, теория упругости, слияние мембран, липидная капля, спонтанная кривизна

- 1 Gluchowski N.L., Becuwe M., Walther T.C., Farese R.V. Lipid Droplets and Liver Disease: From Basic Biology to Clinical Implications. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2017, 14, 343–355. doi: 10.1038/nrgastro.2017.32
- 2 Molotkovsky R.J., Denieva Z.G., Senchikhin I.N., Urodkova E.K., Konarev P.V., Peters G.S., Galimzyanov T.R., Pavlov R.V., Bashkirov P.V. Quantifying the Activation Barrier for Phospholipid Monolayer Fusion Governing Lipid Droplet Coalescence. *Int. J. Mol. Sci.* 2025, 26(23): 11664, doi: 10.3390/ijms262311664.
- 3 Molotkovsky RJ, Galimzyanov TR, Minkevich MM, Pinegin KV, Kuzmin PI, Bashkirov PV. Energy pathway of lipid monolayer fusion: From droplet contact to coalescence. *J. Phys. Chem. B* 2025, 129(27): 7010–7021, doi: 10.1021/acs.jpcc.5c02054.

УДК 577.352.4

УНИВЕРСАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МЕМБРАННОЙ АКТИВНОСТИ АМФИПАТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ

О.В. Кондрашов, М.В. Воловик, З.Г. Дениева, О.В. Батищев, С.А. Акимов

*Лаборатория биоэлектрохимии, Институт физической химии и электрохимии
им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук*

Биологические мембраны являются чрезвычайно слабопроницаемыми оболочками. Они выполняют в клетках различные функции, важнейшая из которых — барьерная. Мембраны позволяют клетке поддерживать состав цитоплазмы, отличный от состава окружающей среды, и состав органелл, отличный от состава цитоплазмы. Образование в мембране сквозной поры, даже на короткое время, обычно приводит к гибели клетки. На этом основано действие некоторых потенциальных антимикробных мембраноактивных препаратов, а также амфипатических пептидов — компонентов некоторых природных ядов. Для амфипатических пептидов практически не удается соотнести их химическое строение и мембранную активность: она может быть сильно различной у схожих по строению пептидов, или, напротив, активность может быть схожей у пептидов с существенно отличающейся химической структурой. Мы теоретически и экспериментально установили универсальные механизмы мембранной активности амфипатических соединений, прежде всего, пептидов.

Амфипатические молекулы частично встраиваются в липидный монослой и деформируют его. За счет этого повышается вероятность образования сквозного проводящего дефекта в мембране непосредственно вблизи встроенных молекул. Кроме того, амфипатический пептид и липиды могут переходить на противоположный монослой мембраны через стенку сквозного дефекта. Этот механизм мембранной активности, называемый локальным, эффективно работает при низких концентрациях пептидов. Экспериментально сквозные дефекты малого размера регистрируются по утечке протонов через мембрану; при этом большие молекулы флуоресцентного красителя и гидратированные ионы через такие дефекты не проходят. При повышении концентрации амфипатических пептидов при их симметричной добавке к мембране за время жизни сквозной дефект может столкнуться с молекулой пептида и захватить ее. Это приводит к стабилизации дефекта и увеличению его размера.

При высоких концентрациях односторонняя адсорбция пептидов на одном монослое замкнутой мембраны приводит к латеральному давлению в этом монослое и латеральному натяжению в противоположном монослое. Такое асимметричное давление/натяжение значительно облегчает образование больших метастабильных пор в любой точке мембраны, независимо от расстояния до ближайшей молекулы пептида. Поэтому этот механизм образования пор называется нелокальным. Через кромку большой метастабильной поры липиды и пептиды могут перетекать из монослоя с латеральным давлением в монослой с латеральным натяжением, что будет приводить к релаксации асимметрии натяжения/давления и закрытию

пор. Последующая адсорбция пептидов из раствора на один монослой мембраны снова приведет к генерации латерального давления в этом монослое и латерального натяжения в противоположном монослое; снова образуются большие метастабильные поры; через их кромку релаксирует натяжение/давление; поры закроются и т.д. Появление пор должно полностью прекратиться, когда установится равновесие между обоими монослоями мембраны и омывающим водным раствором. Экспериментально большие метастабильные поры наблюдаются по утечке водорастворимого флуоресцентного красителя или по ионному току сквозь мембрану. В согласии с теоретическим предсказанием, и утечка, и ионный ток полностью прекращаются приблизительно через 15 минут после односторонней добавки амфипатических пептидов.

Если после добавки пептидов в низкой концентрации добавить пептиды в высокой концентрации, то, согласно локальному механизму, в мембране образуется множество небольших сквозных дефектов. Эти дефекты предотвращают возникновение большой разницы латерального давления/натяжения в монослоях мембраны, и, таким образом, защищают мембрану от образования больших метастабильных пор по нелокальному механизму. Защитный эффект низких концентраций амфипатических пептидов также наблюдался экспериментально.

В несимметричных условиях образование пор/дефектов по локальному и нелокальному механизмам происходит одновременно. Относительная интенсивность порообразования по этим механизмам зависит от концентрации пептидов, а также их простых геометрических параметров: длины цепи, ее диаметра и глубины встраивания в липидный монослой. При этом механизмы практически нечувствительны к конкретной химической структуре амфипатических пептидов. Более того, образование пор по нелокальному механизму наблюдалось для амфипатических соединений не-пептидной природы. Выявление этих механизмов позволило с единых механистических позиций объяснить большое количество разнообразных и иногда противоречивых экспериментальных данных, полученных за последние несколько десятилетий, о мембранной активности амфипатических соединений.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Ключевые слова: антимикробный пептид, теория упругости, пора, липидная мембрана.

УДК 577.352.4, 57.037

ДРОЖЖИ, ЯД И ДИФФУРЫ: ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕХИОМЕТРИИ АМФОТЕРИЦИНОВОГО КАНАЛА С ПОМОЩЬЮ ИЗМЕРЕНИЯ КИНЕТИКИ РОСТА КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ

О.В. Кондрашов¹, С.С. Соколов², Ф.Ф. Северин², С.А. Акимов¹

¹Лаборатория биоэлектрохимии, Институт физической химии и электрохимии
им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук;

²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный
университет им. М.В. Ломоносова

В настоящее время проводятся многочисленные исследования, посвященные механизмам действия различных веществ, способных селективно убивать патогены. Такие исследования можно условно разделить на теоретические исследования (включая компьютерное моделирование) молекулярных механизмов действия этих веществ, эксперименты на модельных системах, например, на липидных бислоях, и эксперименты на живых системах: от культур микроорганизмов до человека. К сожалению, результаты, полученные на одном уровне исследования, лишь качественно (в лучшем случае) используются на других. В этой работе мы связываем воедино механизм действия яда, представляющего собой симметричный ионный канал, собирающийся на мембране из $2p$ субъединиц, с кинетикой роста микроорганизмов. Для этого мы используем результаты разработанных нами ранее детальных моделей статистической физики [1, 2], связывающих среднее время формирования такого канала с концентрацией мономеров. Для описания кинетики популяции микроорганизмов была разработана модель, включающая в себя рост (деление) микроорганизмов с учетом действия яда, наличие и расход питательного субстрата, равномерное распределение яда по мембранам микроорганизмов и его дальнейшее перераспределение при делении микроорганизмов. Математически модель сводится к четырем нелинейным дифференциальным уравнениям, при этом они были решены точно в важном предельном случае неограниченного питательного субстрата; решение выражается в терминах специальных функций.

Распространена экспериментальная практика изучения кинетики популяции микроорганизмов посредством измерения оптической плотности. Считая, что оптическая плотность пропорциональна полному количеству микроорганизмов (живых и мертвых), был получен основной результат работы: кривые оптической плотности при разумных и выполняющихся на практике предположениях просто сдвигаются в сторону больших времен при наличии яда, притом этот сдвиг напрямую связан с концентрацией яда и величиной p .

Построенная теория была применена для дрожжей и добавленному к ним в разных концентрациях амфотерицин Б, который образует на мембране неселективный ионный канал, при этом стехиометрия канала достоверно неизвестна (от 4 до 12 субъединиц по разным источникам); была измерена зависимость оптической плотности от времени. Полученные

зависимости были проанализированы, результатом анализа стало определение величины $p=2$. Таким образом, было показано, что убивающий дрожжи канал состоит из четырех субъединиц.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 125012000470-0, О.В.К., С.А.А.) и Российского научного фонда (грант № 23-14-00172, С.С.С., Ф.Ф.С.).

Ключевые слова: ионный канал, кинетика популяции, амфотерицин Б, дрожжи.

- 1 Kondrashov O. V., Akimov S. A. Regulation of antimicrobial peptide activity via tuning deformation fields by membrane-deforming inclusions. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 23: 326, doi: 10.3390/ijms23010326
- 2 Kondrashov O. V. et al. Adsorption of bovine serum albumin to lipid membranes increases the number and stability of ion channels of gramicidin A. *Langmuir* 2025, 41: 25992-26010. doi: 10.1021/acs.langmuir.5c02629

УДК 571.27

OPTIMIZING BONE MARROW PLASMA CELL TRANSCRIPTOME RESOLUTION BY TARGETED REMOVAL OF IMMUNOGLOBULIN TRANSCRIPTS

L. Ibrahim^{1,2}, E.A. Komech¹, M.A. Turchaninova¹, I.V. Zvyagin¹

¹*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences*

²*School of Biological and Medical Physics, Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University)*

Institute of Translational Medicine, Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Bone marrow long-lived plasma cells (LLPCs) are essential for long-term antibody-mediated immunity due to their capacity for continuous antibody production [1]. Studying their transcriptional programs is important for understanding the biology of these cells in health and disease. However, transcriptomic profiling of LLPCs is technically challenging because immunoglobulin (Ig) transcripts are highly abundant, often constituting up to 90% of total mRNA [2, 3]. The abundance of Ig transcripts in plasma cells can dominate sequencing reads, potentially obscuring the detection and accurate quantification of other genes. Consequently, a clearer picture of the broader LLPC transcriptome becomes difficult to achieve.

To overcome this limitation, we developed a targeted depletion approach to remove Ig transcripts prior to sequencing. Oligos complementary to the constant regions of Ig heavy chains (IgA, IgG, IgD, IgE, IgM) and light chains (κ and λ) were used during cDNA extension in the presence of biotinylated dUTPs, enabling specific labeling of Ig cDNA. Biotinylated Ig cDNAs were then captured and removed using streptavidin-coated magnetic beads. The depletion rate was measured using qPCR, demonstrating effective removal of Ig transcripts while largely preserving non-Ig transcripts such as GAPDH and B2M.

LLPCs, expected to be enriched within the CD20⁻ CD19⁺ CD38^{hi} CD138⁺ population, were isolated from bone marrow aspirates. For bulk RNA sequencing, libraries were prepared from sorted LLPCs using the NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit. The Ig transcripts-depletion protocol was integrated after double-stranded cDNA synthesis and prior to end repair and adapter ligation. Comparative transcriptomic analyses were performed between depleted and non-depleted samples to assess the efficacy and specificity of the Ig transcript-depletion strategy, with a particular focus on immunoglobulin transcript levels across conditions. Overall, this approach aims to enhance transcriptomic resolution in plasma cells and provide clearer insight into LLPC biology.

The study was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. RSF #25-15-00589).

Key words: Bone marrow plasma cells, Ig transcripts depletion; Transcriptome, RNA sequencing

- 1 Koike T, Ise W. Developmental trajectory of long-lived plasma cells. *Front Immunol* 2025, 16:1684210, doi: 10.3389/fimmu.2025.1684210.
- 2 Duan M, Nguyen DC, Joyner CJ, Saney CL, Tipton CM, Andrews J, Lonial S, Kim C, Hentenaar I, Kusters A, Ghosn E, Jackson A, Knechtle S, Maruthamuthu S, Chandran S, Martin T, Rajalingam R, Vincenti F, Breeden C, Sanz I, Gibson G, Lee FE. Understanding heterogeneity of human bone

- marrow plasma cell maturation and survival pathways by single-cell analyses. *Cell Rep* 2023, 42(7):112682, doi: 10.1016/j.celrep.2023.112682.
- 3 Nguyen DC, Hentenaar IT, Cabrera-Mora M, Kyu S, Morrison-Porter A, Haddad NS, Andrews J, Roberts D, Lonial S, Sanz I, Lee FE. Mature Human Bone Marrow Plasma Cells Secrete More IgG than Early-Minted Blood Antibody-Secreting Cells. *Front Immunol* 2025, 16:1644102, doi: 10.3389/fimmu.2025.1644102.

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Акимов С.А. 58, 60
Ахметзянова А.А. 34
Байрамкулов Д.Д. 3, 31
Барабашкин Н.М. 27
Батищев О.В. 58
Башкиров П.В. 47, 51, 56
Белокрылова Ж.П. 5
Берсенев Е.Ю. 53
Бородина М.М. 33
Бутенко И.О. 7, 9, 11, 13, 14, 18, 25, 29, 36
Вакарюк А.В. 7, 9, 11, 13, 18
Василенко Е.О. 47
Васильева Е.А. 29
Васильева Е.А. 36
Верещагин М.А. 42
Верещагин Р.И. 42
Воловик М.В. 58
Говорун В.М. 14, 21, 23, 25, 29, 34, 36, 42, 44
Горбунов К.С. 42, 49, 53
Гремячева В.Д. 7, 9, 11, 13, 18
Гукин Е.Г. 42
Гуров С.А. 44
Давыдова Л.А. 53
Дениева З.Г. 56, 58
Дудик С.П. 51
Завалко Ф.А. 14, 29
Ивкина А.С. 34, 38
Ильина Е.Н. 44
Катичева А.Э. 16
Киселева Е.В. 34
Кициловская Н.А. 7, 9, 11, 13, 18, 27
Клочков К.А. 42
Коваленко А.В. 7, 9, 11, 13, 18, 21, 29
Кожемякин Г.Л. 27
Козырева А.И. 21, 23
Конанов Д.Н. 40
Кондрашов О.В. 58, 60
Корнеев Е.В. 23
Котова Н.В. 21
Кузьмин П.И. 47
Курилова О.В. 49, 53
Кутуков Р.Р. 33
Лазарева А.А. 9, 14, 25, 29, 36
Лапина Т.А. 53
Ларина Ю.А. 42
Лебедева А.А. 27
Лихачева П.М. 42
Лукашев А.Н. 44, 46
Малева А.В. 34
Манолов А.И. 42, 44, 49
Матюшкина Д.С. 14, 21, 23, 25, 29, 33, 36
Мацевич В.А. 34
Мелихова А.В. 34
Миков А.Н. 14
Молотковский Р.Ю. 56
Молчанова М.В. 44
Найденышева З.К. 34
Павленко А.В. 23, 42
Павлов Р.В. 56
Панова В.В. 44
Парамоненко П.К. 42
Полунина Т.А. 21
Полякова А.С. 14, 29
Попов Н.С. 44
Постика Н.Е. 34
Пустовалова Т.В. 3, 31
Рог И.С. 23, 33
Ротай Н.Д. 42
Рыбальченко Д.А. 21
Самойлов А.Е. 46
Сандалова Д.А. 33
Санданова Д.С. 23
Свешникова А.Н. 49, 53
Свистунов А.М. 14, 29
Северин Ф.Ф. 60
Селло Е.О. 53
Семашко Т.А. 16
Семёнова Е.А. 33
Сизова С.В. 51
Соколов С.С. 60
Сумарокова М.В. 29
Федоров О.В. 3, 27, 31
Фёдоров Д.Е. 42
Филиппенко П.С. 31
Фисунов Г.Ю. 33
Харрасов Д.Р. 33
Цой Е.А. 33
Чудинов И.К. 18, 23
Шакуров Р.И. 51
Шатохин А.А. 42
Шикалов А.Б. 14, 29
Шокина В.А. 34
Щербакова О.В. 14, 29, 34, 36
Ibrahim L. 62
Komech E.A. 62
Turchaninova M.A. 62
Zvyagin I.V. 62