Министерство науки и высшего образования Российской Федерации ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ БИОМЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ ИМЕНИ В.Н. ОРЕХОВИЧА» (ИБМХ)

№ госрегистрации 121100400105-5

УТВЕРЖДАЮ
Директор ИБМХ
Е.А. Пономаренко
<u>к.lb/» шарта</u> 2023 г.
The second second second second

ОТЧЕТ

о выполненных работах по реализации проекта

Детекция единичных биомакромолекул как основа предиктивной диагностики и диагностики социально-значимых заболеваний человека на ранней стадии (УНУ «Авогадро», рег. номер 1405855)

(промежуточный)

Этап 2

Федеральный проект

«Развитие масштабных научных и научно-технологических проектов по приоритетным исследовательским направлениям национального проекта «Наука и университеты»

Соглашение о предоставлении из федерального бюджета гранта в форме субсидии от 28 сентября 2021 г. № 075-15-2021-933 (внутренний номер №13.МНПМУ.21.0001)

Руководитель исследовательской программы (проекта), научный руководитель ИБМХ, академик РАН

Москва 2023

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель проекта

Научный руководитель ИБМХ, главный научный сотрудник, д-р биол. наук, академик РАН Исполнители темы Главный научный сотрудник, д-р биол. наук, академик РАН

Заместитель директора по научной работе, главный научный сотрудник, д-р биол. наук

Главный научный сотрудник, д-р биол. наук

Заместитель директора по научно-организационной работе, канд. биол. наук

Заведующий лабораторией, д-р биол. наук

Главный научный сотрудник, д-р биол. наук

Главный научный сотрудник, д-р биол. наук

Главный научный сотрудник, д-р биол. наук, чл.-корр. РАН

Главный научный сотрудник, д-р биол. наук

Ведущий научный сотрудник, канд. биол. наук

Ведущий научный сотрудник, канд. биол. наук

Старший научный сотрудник,

подпись, дата

подпись, дата

<u>Іла-</u>подпись, дата

подпись, дата

30. 01 202

подпись, дата

подпись, дата

ин зодерд) подпись, дата



<u>Шуни ви</u> подпись, дата

15 -

иодпись, дата

подпись, дата



подпись, дата

подпись, дата

А.И. Арчаков (разделы 1-16)

A.B. Лисица (раздел 16)

Т.О. Плешакова (разделы 2-8, 10-11,14)

Е.А. Пономаренко (раздел 9)

Ю.А. Ромашова (разделы 14, 15)

В.Г. Згода (разделы 11, 12)

Ю.Д. Иванов (разделы 2-8, 10,11)

П.Г. Лохов (раздел 13)

К.Н. Ярыгин (разделы 1, 12)

В.В.Шумянцева (раздел 3, 15)

С.П. Радько (раздел 9)

А.Ю. Лупатов (разделы 1, 12)

E.B. Ильгисонис (раздел 16)

Е.В. Поверенная (раздел 12)

О.В. Тихонова (раздел 12)

канд. биол. наук

Старший научный сотрудник, канд. биол. наук

Младший научный сотрудник

Лаборант

Лаборант-исследователь

Лаборант-исследователь

Ведущий инженер

Ведущий программист

Инженер-программист

Инженер-программист

подпись, дата

полнись, дата

<u>В. р. (30.01.2</u>023) подпись, дата

<u>Тор (30 01.2</u>023) подпись, дата

<u>Грин (30.0</u>1 2023) подпись, дата

<u>ия</u> (30.01-2023) подпись, дата

<u>Асе (30.01.27</u>43) подпись, дата

подпись, дата

<u>(30.01.2073)</u> подпись, дата

Подпись, дата

<u>ля (30.01.23</u>) подпись, дата

<u>(30.0/23)</u> подпись, дата

<u>Валена</u> подпись, дата

подпись, дата

О.П. Трифонова (раздел 13)

Д.Д.Жданов (раздел 12, 15)

А.А. Валуева (разделы 2-4,10)

К.В. Голдаева (разделы 5, 8)

М.О. Ершова (раздел 4)

И.А. Иванова (раздел 14)

А.И. Гордеева (раздел 3, 10)

Н.Э.Вавилов (раздел 3, 10)

(30.01.2025) С.Н. Тарбеева (раздел 16)

> А.С.Козлова (раздел 16)

Е.В. Сарыгина (раздел 16)

А.Ф. Козлов (раздел 7)

Р.А. Галиуллин (раздел 6)

Б.С.Вальдман (раздел 16)

И.В. Пичугин (раздел 16)

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 15 1. ФОРМИРОВАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ 19 1.1. Коллекция-1-liv – образцы ткани печени (посмертные) 20 1.2. Коллекция-1-PS – образцы плазмы и сыворотки крови условно-здоров 25 1.3. Коллекция-2-PS-сс – образцы плазмы и сыворотки крови, полученные от пашентов с диагнозом колоректальный рак 27 1.4. Подготовка и аннотация биологических образцов для Коллекции-сеll – касточные линии: эмбриональные стволовые клетки и клетки линии Нерб2 29 1.4.1. Коллекция-2-cell - hESKM-05 29 1.4.2. Протокол получения 3D культур Нерб2 32 2. ИЗГОТОВЛЕНИЕ В 2022 Г. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ АСМ-ЧИПОВ С ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННОЙ ПОВЕРХНОСТЬЮ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ 35 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЕТЕКЦИИ БЕЛКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ 4 НОСЛЕДУЮЩИМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ АНАЛИЗОМ В 5 БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ 37 3.1. Георетическое обоснование метода детекции белков с использованием 37 3.1.1. Концепция подхода на основе детекции селкови с использованием 37 3.1.1. Концепция подхода на основе детекции единичных молекул 37 3.1.2. Обоснование степени разведения биологического образца для методити 38 3.2. Разработка методики необратимого связыв	ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ 13
1. ФОРМИРОВАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ 19 1.1. Коллекция-1-liv – образцы ткани печени (посмертные) 20 1.2. Коллекция-1-IPS – образцы плазмы и сыворотки крови условно-здоровых доноров 25 1.3. Коллекция-2-PS-сс – образцы плазмы и сыворотки крови, полученные от пациентов с диагнозом колоректальный рак 27 1.4. Подготовка и аннотация биологических образцов для Коллекции-cell – клеточные линии: эмбриональные стволовые клетки и клетки линии HepG2 29 1.4.1. Коллекция-1-cell – bESKM-05 29 1.4.2. Протокол получения 3D культур HepG2 32 2. ИЗГОТОВЛЕНИЕ В 2022 Г. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ АСМ- ЧИПОВ С ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННОЙ ПОВЕРХНОСТЬО ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ 35 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЕТЕКЦИИ БЕЛКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ 40 НОСЛЕДУЮЩИМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ АНАЛИЗОМ В 37 БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ 37 3.1. Георетическое обоснование метода детекции белков с использованием 37 3.1.1. Концепция подхода на основе детекции слиничных молекул 37 3.1.2. Обоснование степени разведения биологического образца для методики необратимого связывания с использованием 38 3.2. Разработка методики необратимого связывания с использованием свуферного разрывания молекул белка с поверхностью 38 3.1.	ВВЕДЕНИЕ 15
1.1. Коллекция-1-liv – образцы ткани печени (посмертныс) 20 1.2. Коллекция-1-PS – образцы плазмы и сыворотки крови условно-здоровых доноров 25 1.3. Коллекция-2-PS-сс – образцы плазмы и сыворотки крови, полученные от пациентов с диагнозом колоректальный рак 27 1.4. Подготовка и аннотация биологических образцов для Коллекции-cell – клеточные линии: эмбриональные стволовые клетки и клетки линии HepG2 29 1.4.1. Коллекция-1-cell – hESKM-05 29 1.4.2. Протокол получения 3D культур HepG2 32 2. ИЗГОТОВЛЕНИЕ В 2022 Г. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ АСМ-ЧИПОВ С ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННОЙ ПОВЕРХНОСТЬЮ ДЛЯ 05ЕСПЕЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ 05ЕСПЕЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ 35 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЕТЕКЦИИ БЕЛКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ И НЕОБРАТИМОГО СВЯЗЫВАНИЯ НА ПОВЕРХНОСТИ АСМ-ЧИПА И 10 ПОСЛЕДУЮЩИМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ АНАЛИЗОМ В 57 5.1.1. Концепция подхода на основе детекции белков с использованием 37 3.1.1. Концепция подхода на основе детекции синичных молекул 37 3.1.2. Обоснование сепсии разведения биологического образца для методики 38 3.2. Разработка методики необратимого связывания с поверхностьо 38 3.2. Разработка методики необратимого связывания с использованием буферного раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 3.3. МС-анализ белков,	1. ФОРМИРОВАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ 19
1.2. Коллекция-1-РS – образцы плазмы и сыворотки крови условно-здоровых доноров 25 1.3. Коллекция-2-PS-сс – образцы плазмы и сыворотки крови, полученные от пациентов с диагнозом колоректальный рак 27 1.4. Подготовка и аннотация биологических образцов для Коллекции-cell – клеточные линии: эмбриональные стволовые клетки и клетки линии HepG2 29 1.4.1. Коллекция-1-cell – hESKM-05 29 1.4.1. Коллекция-2-cell -HepG2 31 1.4.2. Протокол получения 3D культур HepG2 32 2. ИЗГОТОВЛЕНИЕ В 2022 Г. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ АСМ-ЧИПОВ С ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННОЙ ПОВЕРХНОСТЬЮ ДЛЯ 0БЕСПЕЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ 0БЕСПЕЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ 35 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЕТЕКЦИИ БЕЛКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИПОСЛЕДУЮЩИМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ АНАЛИЗОМ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ 37 3.1. Георетическое обоснование метода детекции белков с использованием необратимого связывания с атомарно ровной поверхностью 37 3.1.1. Концепция подхода на основе детекции единичных молекул 37 3.1.2. Обоснование степени разведения биологического образца для методики необратимого связывания к с поверхностью 38 3.2. Разработка методики необратимого связывания с использованием буферного раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 39 3.3. МС-анализ белков, сконцентрированных на поверхности АСМ-чипов с помощью необратимого связывания с помощью необратимого св	1.1. Коллекция-1-liv – образцы ткани печени (посмертные) 20
доноров 25 1.3. Коллекция-2-РS-сс – образцы плазмы и сыворотки крови, полученные от пациентов с диагнозом колоректальный рак 27 1.4. Подготовка и аннотация биологических образцов для Коллекции-сеll – клеточные линии: эмбриональные стволовые клетки и клетки линии Нерб2 29 1.4.1. Коллекция-1-cell – hESKM-05 29 1.4.1. Коллекция-2-cell -HepG2 31 1.4.2. Протокол получения 3D культур НерG2 32 2. ИЗГОТОВЛЕНИЕ В 2022 Г. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ АСМ- ЧИПОВ С ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННОЙ ПОВЕРХНОСТЬО ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ 35 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЕТЕКЦИИ БЕЛКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ 40 НООЛЕЦУЮЩИМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ АНАЛИЗОМ В 50 БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ 37 3.1.1. Концепция подхода на основе детекции белков с использованием 37 3.1.1. Концепция подхода на основе детекции единичных молекул 37 3.1.1. Концепция подхода на основе детекции единичных молекул 38 3.2. Разработка методики белков с использованием соноць с вязывания с атомарно ровной поверхностью 38 3.2. Разработка методики необратимого связывания с использованием буферного раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 39 3.3. МС-анализ белков, сконцентрированных на поверхности АСМ-чинов с помощью необратимог	1.2. Коллекция-1-PS – образцы плазмы и сыворотки крови условно-здоровых
1.3. Коллекция-2-PS-сс – образцы плазмы и сыворотки крови, полученные от пациентов с диагнозом колоректальный рак 27 1.4. Подготовка и аннотация биологических образцов для Коллекции-cell – клеточные линии: эмбриональные стволовые клетки и клетки линии HepG2 29 1.4.1. Коллекция-1-cell – hESKM-05 29 1.4.2. Протокол получения 3D культур HepG2 32 2. ИЗГОТОВЛЕНИЕ В 2022 Г. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ АСМ-ЧИПОВ С ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННОЙ ПОВЕРХНОСТЬЮ ДЛЯ 0БЕСПЕЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ 0БЕСПЕЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ 35 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЕТЕКЦИИ БЕЛКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕОБРАТИМОГО СВЯЗЫВАНИЯ НА ПОВЕРХНОСТИ АСМ-ЧИПА И ПОСЛЕДУЮЩИМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ АНАЛИЗОМ В 500ЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ 37 3.1.1. Конценция подхода на основе детекции белков с использованием 37 3.1.1. Конценция подхода на основе детекции облков с использованием 37 3.1.2. Обоснование степени разведения биологического образца для методики 38 3.2. Разработка метода к поверхностью 38 3.2. Разработка методики необратимого связывания с поверхностью 38 3.2. Разработка метода на споверхностью 38 3.2. Разработка метода на споверхностью 38 3.2. Разработка методики необратимого связывания с использованием буферного раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 39	доноров 25
пациентов с диагнозом колоректальный рак 27 1.4. Подготовка и аннотация биологических образцов для Коллекции-cell – клеточные линии: эмбриональные стволовые клетки и клетки линии НерG2 29 1.4.1. Коллекция-1-cell – hESKM-05 29 1.4.1.1. Коллекция-2-cell - HepG2 31 1.4.2. Протокол получения 3D культур НерG2 32 2. ИЗГОТОВЛЕНИЕ В 2022 Г. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ АСМ- ЧИПОВ С ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННОЙ ПОВЕРХНОСТЬЮ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ 35 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЕТЕКЦИИ БЕЛКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕОБРАТИМОГО СВЯЗЫВАНИЯ НА ПОВЕРХНОСТИ АСМ-ЧИПА И ПОСЛЕДУЮЩИМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ АНАЛИЗОМ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ 3.1. Теоретическое обоснование метода детекции белков с использованием теобратимого связывания с атомарно ровной поверхностью 37 3.1.1. Концепция подхода на основе детекции единичных молекул 37 3.1.2. Обоснование степени разведения биологического образца для методики необратимого связывания молекул белка с поверхностью 38 3.2. Разработка методики необратимого связывания с использованием буферного раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 39 3.3. МС-анализ белков, сконцентрированных на поверхности АСМ-чипов с помощью необратимого связывания и с помощью необратимого связывания и с помощью необратимого связывания и обуферного 39	1.3. Коллекция-2-PS-сс – образцы плазмы и сыворотки крови, полученные от
1.4. Подготовка и аннотация биологических образцов для Коллекции-cell – клеточные линии: эмбриональные стволовые клетки и клетки линии HepG2 29 1.4.1. Коллекция-1-cell – hESKM-05 29 1.4.1.1. Коллекция-2-cell -HepG2 31 1.4.2. Протокол получения 3D культур HepG2 32 2. ИЗГОТОВЛЕНИЕ В 2022 Г. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ АСМ- ЧИПОВ С ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННОЙ ПОВЕРХНОСТЬЮ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ 35 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЕТЕКЦИИ БЕЛКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕОБРАТИМОГО СВЯЗЫВАНИЯ НА ПОВЕРХНОСТИ АСМ-ЧИПА И ПОСЛЕДУЮЩИМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ АНАЛИЗОМ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ 3.1. Теоретическое обоснование метода детекции белков с использованием 37 3.1.1. Концепция подхода на основе детекции единичных молекул 37 3.1.2. Обоснование степени разведения биологического образца для методики 38 3.2. Разработка методики необратимого связывания с использованием буферного 38 3.2. Разработка методики необратимого связывания биологического образца для методики 39 3.3. МС-анализ белков, сконцентрированных на поверхности АСМ-чипов с 39 3.3. МС-анализ белков, сконцентрированных на поверхности АСМ-чипов с 39	пациентов с диагнозом колоректальный рак 27
клеточные линии: эмбриональные стволовые клетки и клетки линии HepG2 29 1.4.1. Коллекция-1-cell – hESKM-05 29 1.4.1.1. Коллекция-2-cell -HepG2 31 1.4.2. Протокол получения 3D культур HepG2 32 2. ИЗГОТОВЛЕНИЕ В 2022 Г. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ АСМ- ЧИПОВ С ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННОЙ ПОВЕРХНОСТЬЮ ДЛЯ 0БЕСПЕЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ 0БЕСПЕЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ 35 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЕТЕКЦИИ БЕЛКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕОБРАТИМОГО СВЯЗЫВАНИЯ НА ПОВЕРХНОСТИ АСМ-ЧИПА И ПОСЛЕДУЮЩИМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ АНАЛИЗОМ В В бИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ 37 3.1. Теоретическое обоснование метода детекции белков с использованием 37 3.1.1. Концепция подхода на основе детекции сдиничных молекул 37 3.1.2. Обоснование степени разведения биологического образца для методики 38 3.2. Разработка методики необратимого связывания с использованием буферного 38 3.2. Разработка методики необратимого связывания с использованием буферного 39 3.3. МС-анализ белков, сконцентрированных на поверхности АСМ-чипов с 19 3.3. МС-анализ белков, сконцентрированных на поверхности АСМ-чипов с 19 3.3. МС-анализ белков, сконцентрированных на поверхности АСМ-чипов с 19	1.4. Подготовка и аннотация биологических образцов для Коллекции-cell –
1.4.1. Коллекция-1-сеll - hESKM-05 29 1.4.1.1. Коллекция-2-сеll - HepG2 31 1.4.2. Протокол получения 3D культур HepG2 32 2. ИЗГОТОВЛЕНИЕ В 2022 Г. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ АСМ- ЧИПОВ С ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННОЙ ПОВЕРХНОСТЬЮ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ 35 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЕТЕКЦИИ БЕЛКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕОБРАТИМОГО СВЯЗЫВАНИЯ НА ПОВЕРХНОСТИ АСМ-ЧИПА И ПОСЛЕДУЮЩИМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ АНАЛИЗОМ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ 37 3.1. Теоретическое обоснование метода детекции белков с использованием 37 3.1.1. Концепция подхода на основе детекции единичных молекул 37 3.1.2. Обоснование степени разведения биологического образца для методики 38 3.2. Разработка методики необратимого связывания с использованием буферного раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 39 3.3. МС-анализ белков, сконцентрированных на поверхности АСМ-чипов с помощью необратимого связывания с помощью необратимого связывания и з буферного раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 43	клеточные линии: эмбриональные стволовые клетки и клетки линии HepG2 29
1.4.1.1. Коллекция-2-cell -НерG2 31 1.4.2. Протокол получения 3D культур НерG2 32 2. ИЗГОТОВЛЕНИЕ В 2022 Г. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ АСМ- ЧИПОВ С ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННОЙ ПОВЕРХНОСТЬЮ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ 35 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЕТЕКЦИИ БЕЛКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕОБРАТИМОГО СВЯЗЫВАНИЯ НА ПОВЕРХНОСТИ АСМ-ЧИПА И ПОСЛЕДУЮЩИМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ АНАЛИЗОМ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ 3.1. Теоретическое обоснование метода детекции белков с использованием а7 3.1.1. Концепция подхода на основе детекции сдиничных молекул 37 3.1.2. Обоснование степени разведения биологического образца для методики необратимого связывания с использованием буферного раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 39 3.3. МС-анализ белков, сконцентрированных на поверхности АСМ-чипов с помощью необратимого связывания с помощью необратимого связывания к по	1.4.1. Коллекция-1-cell – hESKM-05 29
1.4.2. Протокол получения 3D культур НерG2 32 2. ИЗГОТОВЛЕНИЕ В 2022 Г. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ АСМ- ЧИПОВ С ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННОЙ ПОВЕРХНОСТЬЮ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ 35 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЕТЕКЦИИ БЕЛКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕОБРАТИМОГО СВЯЗЫВАНИЯ НА ПОВЕРХНОСТИ АСМ-ЧИПА И ПОСЛЕДУЮЩИМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ АНАЛИЗОМ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ 37 3.1. Теоретическое обоснование метода детекции белков с использованием необратимого связывания с атомарно ровной поверхностью 37 3.1.1. Концепция подхода на основе детекции единичных молекул 37 3.1.2. Обоснование степени разведения биологического образца для методики 8 9.2. Разработка методики необратимого связывания с использованием буферного даствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 39 3.3. МС-анализ белков, сконцентрированных на поверхности АСМ-чипов с помощью необратимого связывания с помощью необратимого связывания и з буферного раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 43	1.4.1.1. Коллекция-2-cell -HepG2 31
2. ИЗГОТОВЛЕНИЕ В 2022 Г. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ АСМ- ЧИПОВ С ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННОЙ ПОВЕРХНОСТЬЮ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ 35 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЕТЕКЦИИ БЕЛКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕОБРАТИМОГО СВЯЗЫВАНИЯ НА ПОВЕРХНОСТИ АСМ-ЧИПА И ПОСЛЕДУЮЩИМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ АНАЛИЗОМ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ 37 3.1. Теоретическое обоснование метода детекции белков с использованием необратимого связывания с атомарно ровной поверхностью 37 3.1.1. Концепция подхода на основе детекции единичных молекул 37 3.1.2. Обоснование степени разведения биологического образца для методики необратимого связывания молекул белка с поверхностью 38 3.2. Разработка методики необратимого связывания с использованием буферного раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 39 3.3. МС-анализ белков, сконцентрированных на поверхности АСМ-чипов с помощью необратимого связывания с помощью необратимого связывания из буферного раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 43	1.4.2. Протокол получения 3D культур HepG2 32
ЧИПОВ С ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННОЙ ПОВЕРХНОСТЬЮ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ 35 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЕТЕКЦИИ БЕЛКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕОБРАТИМОГО СВЯЗЫВАНИЯ НА ПОВЕРХНОСТИ АСМ-ЧИПА И ПОСЛЕДУЮЩИМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ АНАЛИЗОМ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ 37 3.1. Теоретическое обоснование метода детекции белков с использованием необратимого связывания с атомарно ровной поверхностью 37 3.1.1. Концепция подхода на основе детекции единичных молекул 37 3.1.2. Обоснование степени разведения биологического образца для методики 38 3.2. Разработка методики необратимого связывания с использованием буферного 38 3.3. МС-анализ белков, сконцентрированных на поверхности АСМ-чипов с 39 3.3. МС-анализ белков, сконцентрированных на поверхности АСМ-чипов с с помощью необратимого связывания с помощью необратимого связывания из 43	2. ИЗГОТОВЛЕНИЕ В 2022 Г. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ АСМ-
ОБЕСПЕЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ 35 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЕТЕКЦИИ БЕЛКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕОБРАТИМОГО СВЯЗЫВАНИЯ НА ПОВЕРХНОСТИ АСМ-ЧИПА И ПОСЛЕДУЮЩИМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ АНАЛИЗОМ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ 37 3.1. Теоретическое обоснование метода детекции белков с использованием необратимого связывания с атомарно ровной поверхностью 37 3.1.1. Концепция подхода на основе детекции единичных молекул 37 3.1.2. Обоснование степени разведения биологического образца для методики 38 3.2. Разработка методики необратимого связывания с поверхностью 38 3.3. МС-анализ белков, сконцентрированных на поверхности АСМ-чипов с 39 3.3. МС-анализ белков, сконцентрированных на поверхности АСМ-чипов с с гомощью необратимого связывания с помощью необратимого связывания из 6уферного раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 39	ЧИПОВ С ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННОЙ ПОВЕРХНОСТЬЮ ДЛЯ
3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЕТЕКЦИИ БЕЛКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕОБРАТИМОГО СВЯЗЫВАНИЯ НА ПОВЕРХНОСТИ АСМ-ЧИПА И ПОСЛЕДУЮЩИМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ АНАЛИЗОМ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ 37 3.1. Теоретическое обоснование метода детекции белков с использованием необратимого связывания с атомарно ровной поверхностью 37 3.1.1. Концепция подхода на основе детекции единичных молекул 37 3.1.2. Обоснование степени разведения биологического образца для методики 43 вобратимого связывания молекул белка с поверхностью 38 3.2. Разработка методики необратимого связывания с использованием буферного 39 3.3. МС-анализ белков, сконцентрированных на поверхности АСМ-чипов с помощью необратимого связывания с помощью необратимого связывания из буферного раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 43	ОБЕСПЕЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ 35
НЕОБРАТИМОГО СВЯЗЫВАНИЯ НА ПОВЕРХНОСТИ АСМ-ЧИПА И ПОСЛЕДУЮЩИМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ АНАЛИЗОМ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ 37 3.1. Теоретическое обоснование метода детекции белков с использованими необратимого связывания с атомарно ровной поверхностью 37 3.1.1. Концепция подхода на основе детекции единичных молекул 37 3.1.2. Обоснование степени разведения биологического образца для методики необратимого связывания молекул белка с поверхностью 38 3.2. Разработка методики необратимого связывания с использованием буферного 39 3.3. МС-анализ белков, сконцентрированных на поверхности АСМ-чипов с помощью необратимого связывания с помощью необратимого связывания из буферного раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 43	3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЕТЕКЦИИ БЕЛКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ПОСЛЕДУЮЩИМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ АНАЛИЗОМ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ 37 3.1. Теоретическое обоснование метода детекции белков с использованием иеобратимого связывания с атомарно ровной поверхностью 37 3.1.1. Концепция подхода на основе детекции единичных молекул 37 3.1.2. Обоснование степени разведения биологического образца для методики иеобратимого связывания молекул белка с поверхностью 38 3.2. Разработка методики необратимого связывания с использованием буферного раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 39 3.3. МС-анализ белков, сконцентрированных на поверхности АСМ-чипов с помощью необратимого связывания с помощью необратимого связывания из 43	НЕОБРАТИМОГО СВЯЗЫВАНИЯ НА ПОВЕРХНОСТИ АСМ-ЧИПА И
БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ 37 3.1. Теоретическое обоснование метода детекции белков с использованием необратимого связывания с атомарно ровной поверхностью 37 3.1.1. Концепция подхода на основе детекции единичных молекул 37 3.1.2. Обоснование степени разведения биологического образца для методики необратимого связывания молекул белка с поверхностью 38 3.2. Разработка методики необратимого связывания с использованием буферного раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 39 3.3. МС-анализ белков, сконцентрированных на поверхности АСМ-чипов с помощью необратимого связывания с помощью необратимого связывания из буферного раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 39	ПОСЛЕДУЮЩИМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ АНАЛИЗОМ В
3.1. Теоретическое обоснование метода детекции белков с использованием необратимого связывания с атомарно ровной поверхностью 37 3.1.1. Концепция подхода на основе детекции единичных молекул 37 3.1.2. Обоснование степени разведения биологического образца для методики 48 необратимого связывания молекул белка с поверхностью 38 3.2. Разработка методики необратимого связывания с использованием буферного 39 3.3. МС-анализ белков, сконцентрированных на поверхности АСМ-чипов с 39 омощью необратимого связывания с помощью необратимого связывания из 43	БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ 37
необратимого связывания с атомарно ровной поверхностью 37 3.1.1. Концепция подхода на основе детекции единичных молекул 37 3.1.2. Обоснование степени разведения биологического образца для методики необратимого связывания молекул белка с поверхностью 38 3.2. Разработка методики необратимого связывания с использованием буферного раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 39 3.3. МС-анализ белков, сконцентрированных на поверхности АСМ-чипов с помощью необратимого связывания с помощью необратимого связывания из буферного раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 43	3.1. Теоретическое обоснование метода детекции белков с использованием
3.1.1. Концепция подхода на основе детекции единичных молекул 37 3.1.2. Обоснование степени разведения биологического образца для методики необратимого связывания молекул белка с поверхностью 38 3.2. Разработка методики необратимого связывания с использованием буферного раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 39 3.3. МС-анализ белков, сконцентрированных на поверхности АСМ-чипов с помощью необратимого связывания с помощью необратимого связывания из 6уферного раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 43	необратимого связывания с атомарно ровной поверхностью 37
 3.1.2. Обоснование степени разведения биологического образца для методики необратимого связывания молекул белка с поверхностью 38 3.2. Разработка методики необратимого связывания с использованием буферного раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 39 3.3. МС-анализ белков, сконцентрированных на поверхности АСМ-чипов с помощью необратимого связывания с помощью необратимого связывания из буферного раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 	3.1.1. Концепция подхода на основе детекции единичных молекул 37
необратимого связывания молекул белка с поверхностью 38 3.2. Разработка методики необратимого связывания с использованием буферного 50 раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 39 3.3. МС-анализ белков, сконцентрированных на поверхности АСМ-чипов с с помощью необратимого связывания с помощью необратимого связывания из буферного раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 43	3.1.2. Обоснование степени разведения биологического образца для методики
 3.2. Разработка методики необратимого связывания с использованием буферного раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 3.3. МС-анализ белков, сконцентрированных на поверхности АСМ-чипов с помощью необратимого связывания с помощью необратимого связывания из буферного раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 	необратимого связывания молекул белка с поверхностью 38
раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 39 3.3. МС-анализ белков, сконцентрированных на поверхности АСМ-чипов с помощью необратимого связывания с помощью необратимого связывания из буферного раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 43	3.2. Разработка методики необратимого связывания с использованием буферного
 3.3. МС-анализ белков, сконцентрированных на поверхности АСМ-чипов с помощью необратимого связывания с помощью необратимого связывания из буферного раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 43 	раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 39
помощью необратимого связывания с помощью необратимого связывания из буферного раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 43	3.3. МС-анализ белков, сконцентрированных на поверхности АСМ-чипов с
буферного раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 43	помощью необратимого связывания с помощью необратимого связывания из
	буферного раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина 43

3.3.1. Влияние кросс-линкера, используемого для необратимого связывани	ія на
результаты МС-анализа	46
3.3.2. Влияние этапов алкилирования и восстановления на результаты МС-ана	ализа
	48
3.3.3. Влияние способа концентрирования на результаты МС-анализа	51
3.3.4. Влияние процедуры обессоливания на результаты МС-анализа	52
3.3.5. Результаты МС-анализа альбумина, сконцентрированного на поверхн	юсти
АСМ-чипа с помощью необратимого связывания из растворов с разли	чной
концентрации белка	53
4. РАЗРАБОТКА СПЕЦИАЛЬНОГО ПО ДЛЯ ОБРАБОТКИ ДАНН	ЊІХ ,
ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДЕТЕКТОРА – АСМ	57
4.1. Выполнение НИР в рамках разработки ПО	58
4.2. Обоснование изменений, внесенных в ТЗ по результатам НИР	65
4.3. Формирование пакета программной документации	67
4.4. Апробация разработанного ПО с применением данных АСМ-анализа зол	отых
наночастиц	67
4.4.1. Методика синтеза золотых частиц (AuNP)	69
4.4.2. Характеристика золотых частиц методом электронной микроскопии	69
4.4.3. Характеристика золотых частиц методом спектрофотометрии	72
4.4.4. Свойства золотых частиц по данным атомно-силовой микроскопии	74
5. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ АНАЛИЗА СОДЕРЖАНИЯ НУКЛЕИНО	вых
КИСЛОТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОПРОВОДНОГО БИОСЕНСОР.	A B
БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ	87
6. РАЗРАБОТКА СПЕЦИАЛЬНОГО ПО ДЛЯ ОБРАБОТКИ ДАНН	ЊІХ ,
ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДЕТЕКТОРА	. –
НАНОПРОВОДНОГО ДЕТЕКТОРА	104
6.1. Выбор инструментов для разработки программы.	106
6.2. Модификация прибора ИС-20СД – нанопроводного детектора в составе	УНУ
Авогадро	107
6.2.1. Разработка и создание блока стабилизации температуры	107
6.2.2. Разработка и создание схемы для установки сигнала равным нулю	109
6.3. Разработка программного обеспечения	112

6.3.1. Создание среды программирования	112
6.3.2. Алгоритм обработки напряжения с нанопроводного детектора	112
6.3.3. Подпрограмма - программная оболочка	114
6.3.4. Подпрограмма для самодиагностики прибора	115
6.3.5. Подпрограмма для контроля тока затвора нанопроводных ячеек	116
6.3.6. Установка параметров измерения	117
6.3.7. Установка нулевого значения сигнала при Vg=0 и Vsd=0	117
6.3.8. Регистрация сигнала	119
6.3.9. Измерение сток затворных характеристики нанопроводов (C3X)	120
6.4. Изготовление дистрибутива программы и пакет программной документ	гации
	124
7. ИЗГОТОВЛЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ ЧИПОВ	ДЛЯ
НАНОПРОВОДНОГО ДЕТЕКТОРА, АДАПТИРОВАННЫХ ДЛЯ АНАЈ	ІИЗА
БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ	125
8. НАПРАВЛЕННЫЙ АНАЛИЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИС	ЛОТ,
АССОЦИИРОВАННЫХ, СОГЛАСНО ЛИТЕРАТУРНЫМ ДАННЫМ	, C
РАЗВИТИЕМ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, С ИСПОЛЬЗОВАН	ИЕМ
НАНОПРОВОДНОГО ДЕТЕКТОРА	128
8.1. Анализ литературы с целью поиска нуклеиновых кислот, ассоциировани	ных с
развитием онкологических заболеваний	129
8.2. Результаты направленного анализа нуклеиновых кислот, ассоциирован	ных,
согласно литературным данным, с развитием рака предстательной железы	134
9. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ АНАЛИЗА ТРАНСКРИПТОМА	В
БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОПОРОЕ	вого
ДЕТЕКТОРА	137
9.1. Разработка методики анализа транскриптома в биологических образи	цах с
использованием нанопорового детектора	137
9.2. Анализ эпитранскриптома с использованием нанопорового детектора	140
9.3. Разработка нанопорового детектора для определения свойств отдел	іьной
молекулы	145
9.3.1. Энзимология в нанопоре: принципы метода	145
9.3.2. Разработка мембранного модуля нанопорового детектора	146

SRA (NCBI), 9.4. Первичные данные, депонированные перечень В 152 идентифицированных мРНК с указанием количества прочтений 9.4.1. Результаты анализа транскриптома клеточной линии Huh7 с использованием 152 нанопорового детектора 9.4.2. Сопоставление результатов анализа транскриптома с данными транслятома 154 и протеома того же образца 10. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЕТЕКЦИИ БЕЛКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕОБРАТИМОГО СВЯЗЫВАНИЯ HA ПОВЕРХНОСТИ АСМ-ЧИПА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ 167 10.1. АСМ-визуализация поверхности после необратимого связывания белков из биологического образца – сыворотки крови 167 10.2. МС-анализ образцов после необратимого связывания белков из биологического образца – сыворотки крови 172 10.2.1. MALDI-MC-анализ 173 10.2.2. Панорамный анализ 174 11. МОЛЕКУЛЯРНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ΠΡΟΤΕΟΜΗΟΓΟ COCTABA БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ (КОЛЛЕКЦИЯ К1) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДЕТЕКТОРА ACM В КОМБИНАЦИИ С MACC-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ АНАЛИЗОМ 177 11.1. АСМ-визуализация поверхности после необратимого связывания белков из биологического образца – плазмы крови 177 11.2. Результаты МС-анализа образцов- смывов с поверхности АСМ-чипов после инкубации в биологическом образце 182 182 11.2.1. Количественный анализ пептидов HSA при MALDI-MC-анализе 11.2.2. Результаты поиска значимых белков с помощью метода 184 PeptideMassFingerprint 11.2.2.1. Результаты МС-анализа образцов, полученных после погружения АСМ-184 чипа в сыворотку 11.2.2.2. Результаты МС-анализа образцов -сывороток, разбавленные образцы которых были использованы для погружения АСМ-чипа 187 11.2.3. Результаты профилирования с помощью панорамного МС-анализа 188

11.2.3.1. Результаты МС-анализа образцов, полученных после погружения АСМ-189 чипа в сыворотку 11.2.3.2. Результаты МС-анализа разбавленных образцов сывороток, 196 используемых для погружения АСМ-чипа ΠΡΟΤΕΟΜΗΟΓΟ 12. МОЛЕКУЛЯРНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ COCTABA БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ (КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ, ОБРАЗЦЫ ТКАНИ) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО ДЕТЕКТОРА 200 12.1. Протокол повышения масс-спектрометрической ДЛЯ чувствительности 203 идентификации белков в ворсинах хориона человека 212 12.2. Исследование внеклеточных везикул аденокарциномы легкого 12.3. Разработка, синтез, молекулярная динамика и биологическая оценка действия новых родственных BIBR1532 аналогов, нацеленных на теломеразу, против немелкоклеточного рака лёгкого 220 12.4. Изучение интерактома цитохрома Р450 2Е1 в микросомах печени человека с помощью масс-спектрометрии химических сшивок 229 12.5. Профилирование интерактома белков из лизата биоматериала в составе стабильных молекулярных комплексов 235 12.6. Протеом белков плазмы крови для медицины: мета-анализ результатов количественных измерений методами целевой масс-спектрометрии содержания белков в крови здорового человека 241 12.7. Молекулярное профилирование протеомного состава биологических образцов из Коллекций с использованием масс-спектрометрического детектора 250 13. МОЛЕКУЛЯРНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ МЕТАБОЛОМНОГО СОСТАВА БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ (КОЛЛЕКЦИЯ К1) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО ДЕТЕКТОРА 252 13.1. Разработка СОП проведения панорамного молекулярного профилирования метаболомного состава биологического образца использованием с массспектрометрического анализа 254 13.1.1. Область применения и рекомендации по СОП 257 13.1.2. Молекулярное профилирование метаболомного состава биологического образца (Коллекция-1-PS) с получением перечня метаболитов 260

13.2. Молекулярное профилирование метаболомного состава плазмы кровипациентов с разной стадией почечно-клеточного рака270

13.3. Поиск стратегий повышения воспроизводимости результатов метаболомногоанализа методом ГХ-МС273

ВЕРИФИКАЦИИ АНАЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ 14. ACM. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК НАНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ ДО ВКЛЮЧЕНИЯ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ КЛАССИЧЕСКИХ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ И С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДЕТЕКТОРА АСМ 280 14.1. Определение характеристик наноразмерных частиц для доставки лекарств до активных компонентов, полученных с помощью классических включения аналитических методов 285

14.1.1. Разработка и валидация аналитического метода одновременного количественного определения фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина в растворе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии
 287

 14.1.2. Требования к средствам измерений, вспомогательному оборудованию,

 материалам и реактивам
 288

14.1.3. Интерпретация результатов измерений 293

14.2. Характеристика наноразмерных частиц методом фотонной корреляционной спектроскопии 305

14.3. Характеристика наноразмерных частиц методами атомно-силовоймикроскопии (ACM) и методом электронной микросокпии (ЭМ)309

14.3.1. АСМ измерения высоты наноразмерных частиц 311

14.3.2. Определение размеров частиц методом электронной микроскопии.31314.3.3. Определение параметров жесткости наноразмерных частиц для доставки315

 15. ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ НАНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ ДЛЯ ДОСТАВКИ

 ЛЕКАРСТВ СО ВСТРОЕННЫМ АКТИВНЫМ КОМПОНЕНТОМ
 320

 15.1. Выбор активного компонента для возможного последующего включения в
 320

 наноразмерные частицы
 320

 15.1.1.1. Фармакологически активные компоненты с противоопухолевым

действием

9

15.1.2. Цитопротекторная активность полиаминов	в при проведении химиотера	пии
	3	25
15.1.3. Молекулярный анализ L-аспарагиназ для в	выяснения механизма действи	ая и
оптимизации фармакологических функций	3	28
15.1.4. Нестероидные противовоспалительные акти	ивные компоненты 3	31
15.1.5. Противовирусные активные компоненты	3	39
15.2. Оценка безопасности (мутагенных свойсти	в) наноразмерных частиц	для
доставки лекарств со встроенным активным компон	нентом 3	40
15.2.1. Дизайн исследования	3	43
15.2.2. Постановка теста Эймса	3	45
15.2.3. Учет хромосомных аберраций	3	47
15.2.4. Результаты исследования	3	48
15.3. Исследование влияния фосфолипидных наноч	частиц на двухцепочечную Д	ĮНК
электрохимическим методом	3	54
15.4. Повышение эффективности электрокатализ	за ферментов, преобразуют	цих
ксенобиотики	3	64
16. РАЗРАБОТКА ТЕХНИЧЕСКОГО ПРОЕКТА	БД 3	75
16.1. Разработка системы СУБД MOLE	3	76
16.1.1. Разработка базы данных.	3	76
16.1.1.1. Общая схема организационной структури	ы базы данных 3	76
16.1.1.2. Развертывание виртуальных машин	3	77
16.1.1.3. Проблема выбора базы данных	3	78
16.1.1.4. Кластерное представление данных	3	79
16.1.1.5. Хранение файлов	3	80
16.1.2. Нейросетевой компонент БД	3	81
16.1.2.1. Входные данные	3	81
16.1.2.2. Использование моделей глубоких нейрон	ных сетей 3	85
16.1.2.3. Обучение моделей глубоких нейронных	сетей 3	87
16.2. Подготовка данных для исследовательских ис	пытаний БД 3	89
16.2.1. Подготовка данных транскриптомных иссле	едований 3	89
16.2.1.1. Информация о структуре исходных файл	ов 3	90
16.2.1.2. Схема обработки исходных данных	3	91

16.2.1.3.	Гистограммы распределения сплайс-вариантов	394				
16.2.1.4.	Метрика, учитывающая спласинг фармакогенов. Анализ гла	авных				
компонен	IT	395				
16.2.1.5.	Исследование фракций сплайс-форм фармакогенов при разли	ичных				
значениях	x TPM	403				
16.2.2. П	одготовка карточек фармакогенов для загрузки в БД MOLE	404				
16.2.2.1.	Определение тканеспецифичной по сплайс-вариантам вы	борки				
фармаког	енов	407				
16.2.2.2.	Представление сведений о фармакогенах в виде диаграмм Венна	415				
16.2.2.3.	Протокол загрузки сведений о фармакогенах в базу данных MOLE	420				
16.2.3. C	имуляция для цифровизации процесса альтернативного сплайсинга	424				
16.2.3.1.	Определение параметров фрагментации	425				
16.2.3.2.	Описание модели ошибок	429				
16.2.3.3.	Симуляция замен	431				
16.2.3.4.	Улучшенная модель симуляции показателя качества	432				
16.2.4. П	одготовка эпитранскриптомных данных	433				
16.2.4.1.	Исходные данные	433				
16.2.4.2.	Master of Pores: схема обработки исходных данных	433				
16.2.4.3. Анализ данных 434						
16.2.5. П	одготовка данных протеомных экспериментов	440				
16.2.5.1.	Информация о структуре исходных файлов	440				
16.2.5.2.	Обработка исходных данных	442				
16.2.5.3.	Подготовка протеомных данных, полученных при облучении клет	очной				
линии суб	бтоксической дозой ультрафиолета	443				
16.2.5.4.	Протокол загрузки файлов в базу данных MOLE	447				
16.2.6. П	одготовка данных метаболомных экспериментов	449				
16.2.6.1. Обоснование выбора биологического материала и аналитического метода						
получени	я мультиомных данных	449				
16.2.6.2.	Модификация стандартной операционной процедуры обработки	масс-				
спектров	прямого ввода	450				
16.2.6.3.	Информация о структуре исходных файлов	457				
16.2.6.4.	Обработка исходных данных	458				

16.2.6.5. Протокол загрузки файлов в базу данных MOLE 458 ЗАКЛЮЧЕНИЕ 461 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 465 ПРИЛОЖЕНИЕ А «ПРОТОКОЛ ПОЛУЧЕНИЯ 3D-КУЛЬТУР КЛЕТОК ЛИНИИ HEPG2» 505 АНАЛИЗА ПРИЛОЖЕНИЕ Б «МЕТОДИКА ТРАНСКРИПТОМА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОПОРОВОГО **ДЕТЕКТОРА»** 510 «ПЕРЕЧЕНЬ НАИБОЛЕЕ ПРИЛОЖЕНИЕ В ЧАСТО ВСТРЕЧАЕМЫХ МОДИФИКАЦИЙ РНК, КОТОРЫЕ МОГУТ БЫТЬ ВЫЯВЛЕНЫ ПРИ АНАЛИЗЕ ТРАНСКРИПТОМА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ» 522 ПРИЛОЖЕНИЕ Γ «РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ БЕЗОПАСНОСТИ НАНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ СО ВСТРОЕННЫМ АКТИВНЫМ КОМПОНЕНТОМ» 528 ПРИЛОЖЕНИЕ Г1. СПЕЦИФИЧНОСТЬ 528 ПРИЛОЖЕНИЕ Г2. КАЛИБРОВОЧНЫЕ УРОВНИ 532 ПРИЛОЖЕНИЕ ГЗ ПРЕЦИЗИОННОСТЬ И ПРАВИЛЬНОСТЬ 540 ПРИЛОЖЕНИЕ Г4. КРОСС-ПЕРЕНОС 562 ПРИЛОЖЕНИЕ Г5. СТАБИЛЬНОСТЬ 564 ПРИЛОЖЕНИЕ Г6. ПАСПОРТ НАНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ ДЛЯ ДОСТАВКИ ВКЛЮЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВ ДΟ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ. С ХАРАКТЕРИСТИКАМИ ПОЛУЧЕННЫМИ С ПОМОЩЬЮ КЛАССИЧЕСКИХ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ 570 ПРИЛОЖЕНИЕ Г7. ПАСПОРТ НАНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ ДЛЯ ДОСТАВКИ CO ВСТРОЕННЫМ АКТИВНЫМ КОМПОНЕНТОМ ЛЕКАРСТВ ПРОТИВОВИРУСНОГО ДЕЙСТВИЯ 574 ПРИЛОЖЕНИЕ «ПОДГОТОВКА ДАННЫХ Д ТРАНСКРИПТОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ» 578 ПРИЛОЖЕНИЕ Е «ПРОЕКТ СОП ВО ИЗМЕНЕНИЕ СОП ВЕРСИИ 1.0» 583

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ASCII – формат входящих данных при обработке данных ACM-сканирования

BSA – белок бычий сывороточный альбумин

DLS – лазерная корреляционная спектроскопия

Ids – ток, протекающий между стоком и истоком НП-чипа

Ids – ток, протекающий между стоком и истоком НП-чипа

NGS – Next-generation sequencing – группа методов определения нуклеотидной последовательности ДНК и РНК для получения формального описания её первичной структуры

ONT- секвенирование – технология секвенирования с применением нанопорового детектора MinION (Oxford Nanopore Technology).

QNM – Quantitative NanoMechanics, количественное наномеханическое картирование

Ribo-seq – Ribosome sequencing – метод, основанный на массовом секвенировании фрагментов мРНК, взаимодействующих с рибосомами.

RNA-seq – RNA sequencing – метод определения первичной структуры молекул РНК, представляющий собой высокочувствительный и точный инструмент для изучения траскриптома

RNC-seq – Ribosome nascent-chain complex-bound RNA sequencing – метод, основанный на массовом секвенировании фрагментов транслируемых мРНК

SEM, TEM – методы электронной микроскопии

SuccBB — фотокросслинкер N-сукцинимидиловый эфир 4-бензоилбензойной кислоты

Vds – напряжение между стоком и истоком НП-детектора

Vds – напряжение между стоком и истоком НП-детектора;

АПТЭС (APTES) – аминопропилтриэтоксисилан (англ. 3-aminopropyltriethoxysilane,

APTES), кремнийорганическое соединение для химической модификации поверхности нанопроводов

ACM – атомно-силовая микроскопия (метод) или атомно-силовой микроскоп (прибор)

БКГ – белок-кодирующий ген

БКГ – белок-кодирующий ген

ДРС – динамическое рассеяние света (метод)

ДТССП – 3,3'-дитио[сульфосукцинимидилпропионат] (англ. 3,3'-dithiobis (sulfosuccinimidylpropionate)), кросс-линкер для активации поверхности и последующей иммобилизации молекулярных зондов

КФБ – калий-фосфатный буфер

мРНК – матричная (информационная) РНК, содержащая информацию о первичной структуре (аминокислотной последовательности) белков

МС- метод масс-спектрометрии

Нанопровод (НП) – сенсорный элемент (сенсор), расположенный на поверхности нанопроводного чипа и имеющий контактные сток-истоковые области на концах

Нанопроводный биосенсор (НП-биосенсор) – измерительная система, позволяющая проводить детекцию белков в режиме реального времени

Нанопроводный чип (НП-чип) – основной структурный элемент НП-биосенсора с интегрированной системой кремниевых нанопроволок

оДНК – олигонуклеотидная ДНК

ПКР – почечно-клеточная карцинома

ПО – программное обеспечение

Протеом – набор белков

Режим реального времени (Ids(t)) – регистрация зависимости величины тока стокаистока (Ids) от времени (t)

РМП – рак мочевого пузыря

РПЖ – рак предстательной железы

ТЗ – техническое задание

УФ – ультрафиолетовое излучение

ЭМ – электронная микроскопия

ЭСК – эмбриональные стволовые клетки

введение

Ключевые слова: молекулярные детекторы; высокочувствительный биоанализ; ранняя медицинская диагностика; мультиомный биоанализ; биомаркеры заболеваний; протеом; метаболом; транскриптом; УНУ «Авогадро».

Цель проекта - внедрение молекулярного профилирования с разрешением на уровне единичных биомолекул в систему оценки состояния здоровья человека и поиск клинически значимых белковых маркеров на новом уровне чувствительности Разработка и апробация методического подхода биоанализа. на основе ультрачувствительных молекулярных детекторов ориентирована на полную инвентаризацию протеомного, транскриптомного и метаболомного состава крови (мультиомный анализ). В результате инвентаризации будет определена совокупность молекул (биомакромолекул и низкомолекулярных соединений), имеющих потенциал применения в системах малоинвазивной и предиктивной мелицинской диагностики. Результаты позволят выявлять отклонения В молекулярном профиле, свидетельствующие о возможных нарушениях в организме, и интерпретировать эти отклонения в контексте анализа рисков возникновения патологических процессов, связанных с развитием онкологических заболеваний.

Основным направлением исследований по проекту является поиск и отработка комплексных методических решений для ультрачувствительного молекулярного анализа биологических образцов с помощью молекулярных детекторов. Полученные экспериментальные результаты высокочувствительного анализа рассматриваются В совокупности с данными молекулярного профилирования, полученными протеомными, метаболомными И транскриптомными методами. Биоинформатические методы применяются для интеграции, анализа и интерпретации результатов экспериментов, выполненных на УНУ «Авогадро».

Для обнаружения единичных молекул белков в проекте предлагается комбинация молекулярных детекторов и методов фишинга биомакромолекул, позволяющих эффективно концентрировать белки на функционализированной поверхности. С целью получения полной молекулярной картины предложено сопряжение высокопроизводительных постгеномных методов (массспектрометрическое профилирование), с высокочувствительными методами,

которые доступны в УНУ «Авогадро» ИБМХ за счет уникальных инструментальных решений.

На первом этапе работ разработан комплекс методических решений для обнаружения белков и нуклеиновых кислот с помощью молекулярных детекторов – атомно-силового микроскопа (ACM), нанопроводного (НП-детектор) и нанопорового детекторов.

Для идентификации обнаруженных объектов предложено использовать сопряжение технологий ACM, масс-спектрометрической идентификации (MC) и необратимого фишинга на поверхность (комбинированный метод ACM/MC). На предыдущем этапе работ разработана методическая часть (методики анализа, регламент изготовления чипов с функционализированной поверхностью и т.д.). На втором (отчетном) этапе показана возможность применения разработанных методик для экспериментальной детекции белков в буферном растворе (модельные системы) и в образцах биологического происхождения. В серии экспериментальных работ показана возможность обнаружения белков и нуклеиновых кислот с помощью молекулярных детекторов. По результатам работ разработаны и апробированы в экспериментах методики и СОП для анализа целевых объектов в биологических образцах (разделы 3, 5, 9, 10, 12).

Обработка данных, поступающих с молекулярных детекторов, ориентирована на выявление отклонений в молекулярном профиле, свидетельствующих о возможных нарушениях в организме, и интерпретацию этих отклонений в контексте анализа рисков возникновения патологических процессов, связанных с развитием онкологических заболеваний.

На первом этапе разработаны ТЗ для создания программного обеспечения (ПО), использующего более эффективные алгоритмы обработки данных, получаемых с помощью АСМ и НП-биосенсоров. В текущем году требуемое ПО разработано в рамках договоров (ООО «РИКО-мед» и ФПТН (раздел 4 и раздел 6)). ПО для обработки данных АСМ-изображений протестировано в ИБМХ на примере анализа изображений наноразмерных модельных объектов – золотых частиц. Информационные выдачи, сформированные с использованием разработанного ПО, необходимых дальнейшего включают полный спектр для практического применения статистических параметров исследуемых объектов. Корректность

работы ПО для обработки данных ACM (раздел 4) подтверждена с помощью независимых методов – электронной микроскопии и спектрофотомерии.

Экспериментальная работа по обнаружению белков с помощью ACM проведена с применением чипов, изготовленных для нужд проекта в рамках пункта 2.2 ПГ.

Разработка экспериментальных образцов чипов ДЛЯ нанопроводного детектора (НП-чипов), адаптированных для анализа биологических образцов, выполнялась в рамках договора с ИФП СО РАН в рамках выполнения пункта 2.7 ПГ. Итогом работы стала партия печатных плат, содержащих основной элемент НПчипов – кристалл кремния с наноразмерными структурами «кремний-на-изоляторе». Проведены научные исследования, обосновывающие необходимость И правомерность предложенных проектов инженерных модификаций конструкции чипов с учетом специфики задачи анализа биологических образцов.

В рамках ранее разработанной и утвержденной схемы молекулярного анализа транскриптома (работ по пункту 2.9 ПГ), разработана и апробирована методика анализа транскриптома биологических образцов с использованием нанопорового детектора. Проведен мета-анализ результатов транскриптомного профилирования для выявления наиболее частых модификаций мРНК (эпитранскриптома), которые могут быть определены с использованием нанопорового детектора.

Выполнен пилотный эксперимент по сопоставлению результатов анализа транскриптома, транслатома и протеома одного биологического образца (на примере клеточной линии HepG2). Результаты анализа показали, что, вероятно, дифференцировка продуктов экспрессии генов происходит на протеомном, а не на транслятомном уровне. Таким образом, предложен способ создания с использованием детекторов УНУ «Авогадро» полного геноцентричного молекулярного профиля образца, включающего информацию о транскриптомном, транслатомном и протеомном уровнях реализации закодированной в геноме информации.

Разработанные на первом этапе методики панорамного молекулярного профилирования протеомного и метаболомного состава биологического образца с использованием масс-спектрометрического детектора в текущем году были применены для молекулярного высокопроизводительного профилирования (раздел

12 и 13). Получены результаты протеомного анализа различных типов биологических образцов – клеточных линий, биоптатов и плазмы крови здоровых добровольцев. Результаты метаболомного анализа получены для образцов из коллекции плазмы крови здоровых добровольцев.

Ha предыдущем этапе работ оптимизирован процесс получения фосфолипидных наноразмерных частиц для доставки лекарств, разработан протокол получения наноразмерных частиц для доставки лекарств и изучены их физикохимические характеристики, на основании которых был разработан аналитический паспорт; разработана методика АСМ-визуализации наноразмерных частиц, позволяющая охарактеризовать объекты по их размерам (высотам) и жесткости. Полученные результаты использованы в отчетном периоде (раздел 14) для отработки методологии АСМ-визуализации фосфолипидных наночастиц (размер не более 50 нм) как объектов, обладающих практической значимостью для разработки новых лекарственных композиций в качестве системы доставки биологически активных компонентов. Проведено комплексное исследование физико-химических параметров наноразмерных частиц, включающее анализ классическими аналитическими методами и применение молекулярного детектора на основе АСМ УНУ «Авогадро». Наноразмерные частицы в перспективе могут использоваться в качестве компонентов лекарственных препаратов, поэтому проведены работы по исследованию их безопасности с использованием стандартных токсикологических методов, а также инновационных методик электрохимического анализа (раздел 15).

Заключительный раздел (раздел 16) содержит информацию о логике и ходе разработки базы данных и нейросетевого модуля обработки данных, а также о логистическом и техническом устройстве программных модулей. Также в этом разделе аккумулирована информация о способах обработки сырых данных, полученных в транскриптомных, протеомных и метаболомных экспериментах в рамках настоящего проекта.

1. ФОРМИРОВАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ

Согласно работам по пункту 2.1 ПГ и 4.1 ТЗ в отчетный период проведено формирование коллекции биологических образцов. В соответствии с п.6.1.1. ТЗ по Требованиям к коллекции биологических образцов в проекте формируются Коллекция 1, включающая образцы от условно-здоровых добровольцев, и Коллекция 2 – образцы от пациентов с заболеваниями на разных стадиях развития патологического процесса (п.6.1.1.2 ТЗ). Согласно п. 6.1.1.1 ТЗ в коллекцию входят плазма и сыворотка крови пациентов, клеточные линии и образцы ткани, поэтому далее, для сохранения единой системы обозначения введена следующая маркировка коллекций «К-х-пате-pat», где:

«К» – обозначает «коллекция»;

«х» -присваивается 1 или 2, соответственно для условно-здоровых пациентов или пациентов с заболеваниями на разных стадиях развития патологического процесса;

«name» – короткое название типа биологического материала, Р- плазма крови, S- сыворотка крови, PS – плазма и сыворотка крови, liv – печень, cell – клеточная линия с указанием ее названия;

«pat» – краткое название патологии в случае Коллекции 2.

Согласно п 6.1.1.3 ТЗ число образцов для каждого типа образца в коллекции не менее 10. Данное требование соблюдалось для типа образцов – плазмы и сыворотки крови, а также в случае образцов печени. В случае клеточных линии количество образцов составило 2.

В 2022 году биобанк ИБМХ был пополнен коллекциями образцов биологического материала человека следующего состава:

Коллекция-1-liv: образцы ткани печени (посмертные) в количестве 10 образцов, 100 аликвот;

– Коллекция-1-PS: образцы плазмы и сыворотки крови условно-здоровых добровольцев в количестве 60 образцов плазмы крови (стабилизатор К2 ЭДТА), 60 образцов плазмы крови (стабилизатор цитрат натрия 3,2%.), 720 аликвот;

– Коллекция-2-PS-сс: образцы плазмы и сыворотки крови, полученные от пациентов с диагнозом коллоректальный рак (англ. colorectal cancer, обозначение «сс») в количестве 50, 500 аликвот;

- Коллекция-1-cell – клеточные линии: эмбриональные стволовые клетки;

– Коллекция-2-cell – клеточные линии: клетки линии HepG2

Формирование Коллекция-1-РЅ и Коллекция-1-РЅ-сс осуществлялся с одобрения независимого комитета по этике при ООО Арте Мед Асистанс Протокол №206 от 06.09.2019 г. Формирование Коллекция-1-liv выполнено на основании Постановления правительства Российской Федерации от 21 июля 2012 г. № 750 Об утверждении правил передачи невостребованного тела, органов и тканей умершего человека для использования в медицинских, научных и учебных целях, а также использования невостребованного тела, органов и тканей умершего человека в указанных целях (https://base.garant.ru/70206830/).

1.1. Коллекция-1-liv – образцы ткани печени (посмертные)

Сбор биоматериала осуществлялся в рамках договора на выполнение научноисследовательских работ №43/233 от 28 июня 2022 г. (исполнитель ООО «Национальный биосервис», г. Санкт-Петербург).

Критериями включения являлись:

- 1. посмертный интервал (ПМИ) <6 часов;
- 2. возраст 60±5 лет.

Критериями исключения являлось наличие:

- 3. онкологического и/ или аутоиммунного заболевания в анамнезе;
- 4. заболевания желудочно-кишечного тракта;
- 5. некротических фрагментов печени.

Сбор биообразцов осуществлялся в соответствии с разработанным Протоколом сбора, хранения, транспортировки посмертных образцов ткани печени, отвечающих особенностям научных исследований по Проекту УНУ «Авогадро» (Представлен в составе пакета отчетной документации за 2022 год, название «Пункт_ПГ-1.2-Протокол_биоптаты-170122»). Данный Протокол разработан на основе Протокола сбора, хранения, транспортировки образцов плазмы крови, отвечающих особенностям научных исследований по Проекту УНУ «Авогадро», разработанного на первом этапе выполнения проекта в 2021 году.

Была создана коллекция из 100 образцов ткани печени, полученные от 10 условно-здоровых доноров: 5 мужчин и 5 женщин (возраст 60±5 лет). От каждого донора было получено 10 аликвот ткани печени размеров 4 мм×10 мм×10 мм (. В

размеры указаны в соответствии п.6.1.1.4 ТЗ). Из 10 полученных аликвот 5 хранили в буфере для стабилизации РНК («RNAlater» Thermo Fisher Scientific), при -200С и предназначены для проведения транскриптомного анализа. Другие 5 аликвот подвергались мгновенной заморозке (-800С) и были предназначены для протеомного анализа.

Согласно п.6.1.1.4 ТЗ, для каждого образца получены клинические сведения, включающие: антропометрические характеристики доноров (Таблица 1.1), сведения о социо-демографических характеристиках доноров (Таблица 1.2) и клинические данные (Таблица 1.3).

, , , , , , , , , , , , , , , , , , , ,					,
ID донора	Пол	Возраст	Вес (кг)	Рост (см)	ИМТ (кг/м2)
CIDp520006147	жен	62	79	169	27,7
CIDp520006147	жен	62	79	169	27,7
CIDp520006148	муж	59	76	175	24,8
CIDp520006148	муж	59	76	175	24,8
CIDp520006149	жен	69	94	194	25,0
CIDp520006149	жен	69	94	194	25,0
CIDp520006150	муж	57	112	187	32,0
CIDp520006150	муж	57	112	187	32,0
CIDp520006151	муж	53	88	163	33,1
CIDp520006151	муж	53	88	163	33,1
CIDp520006152	жен	63	83	173	27,7
CIDp520006152	жен	63	83	173	27,7
CIDp520006153	жен	62	85	181	25,9
CIDp520006153	жен	62	85	181	25,9
CIDp520006154	жен	65	124	196	32,3
CIDp520006154	жен	65	124	196	32,3
CIDp520006155	муж	64	104	186	30,1
CIDp520006155	муж	64	104	186	30,1
CIDp520006156	муж	53	101	174	33,4
CIDp520006156	муж	53	101	174	33,4

Таблица 1.1 – Антропометрические характеристики доноров в Коллекции-1-liv

ID донора	Вредные привычки	Образование Социально-трудовой статус		Группа инвалидности
CIDp520006147	Отсутствуют	Высшее техническое	Пенсионер	Нет
CIDp520006147	Отсутствуют	Высшее техническое	Пенсионер	Нет
CIDp520006148	20 лет*	Среднее техническое	Работал	Нет
CIDp520006148	20 лет*	Среднее техническое	Работал	Нет
CIDp520006149	Отсутствуют	Среднее профессиональное	Пенсионер	Нет
CIDp520006149	Отсутствуют	Среднее профессиональное	Пенсионер	Нет
CIDp520006150	30 лет*	Высшее техническое	Работал	Нет
CIDp520006150	30 лет*	Высшее техническое	Работал	Нет
CIDp520006151	20 лет*	Высшее техническое	Работал	Нет
CIDp520006151	20 лет*	Высшее техническое	Работал	Нет
CIDp520006152	Отсутствуют	Высшее	Пенсионер	Нет
CIDp520006152	Отсутствуют	Высшее	Пенсионер	Нет
CIDp520006153	Отсутствуют	Высшее	Пенсионер	Нет
CIDp520006153	Отсутствуют	Высшее	Пенсионер	Нет
CIDp520006154	Отсутствуют	Среднее профессиональное	Пенсионер	Нет
CIDp520006154	Отсутствуют	Среднее профессиональное	Пенсионер	Нет
CIDp520006155	20 лет	Среднее техническое	Работал	Нет
CIDp520006155	20 лет	Среднее техническое	Работал	Нет
CIDp520006156	20 лет	Высшее	Пенсионер	Нет
CIDp520006156	20 лет	Высшее	Пенсионер	Нет

<u>Таблица 1.2 – Социо-демографические характеристики доноров в Коллекции-1-liv</u>

*Стаж табакокурения на момент смерти.

ID донора	ПМИ (часы)	Патология	Причина смерти	Длительность заболевания	Сопутствующие заболевания	Сопутствующая терапия	Анализ на трансмиссивные заболевания	Анализ на COVID- 19
CIDp520006147	4	Острый инфаркт миокарда	ОКН	2 года	Ишемическая болезнь сердца, атеросклероз аорты.	нет данных	Отрицательный	Отрицательный
CIDp520006147	4	Острый инфаркт миокарда	ОКН	2 года	Ишемическая болезнь сердца, атеросклероз аорты.	нет данных	Отрицательный	Отрицательный
CIDp520006148	5	Острый инфаркт миокарда	ОКН	1 месяц	Ишемическая болезнь сердца, атеросклероз аорты.	нет данных	Отрицательный	Отрицательный
CIDp520006148	5	Острый инфаркт миокарда	ОКН	1 месяц	Ишемическая болезнь сердца, атеросклероз аорты.	нет данных	Отрицательный	Отрицательный
CIDp520006149	4	Острый инфаркт миокарда	ОКН	6 лет	Ишемическая болезнь сердца, атеросклероз аорты.	нет данных	Отрицательный	Отрицательный
CIDp520006149	4	Острый инфаркт миокарда	ОКН	6 лет	Ишемическая болезнь сердца, атеросклероз аорты.	нет данных	Отрицательный	Отрицательный
CIDp520006150	2	Острый инфаркт миокарда	ОКН	3 года	Ишемическая болезнь сердца, атеросклероз аорты.	нет данных	Отрицательный	Отрицательный
CIDp520006150	2	Острый инфаркт миокарда	ОКН	3 года	Ишемическая болезнь сердца, атеросклероз аорты.	нет данных	Отрицательный	Отрицательный
CIDp520006151	2	Инфаркт головного мозга	СМН	0,5 месяца	Атеросклероз артерий головного мозга	нет данных	Отрицательный	Отрицательный
CIDp520006151	2	Инфаркт головного мозга	СМН	0,5 месяца	Атеросклероз артерий головного мозга	нет данных	Отрицательный	Отрицательный
CIDp520006152	4	Острый инфаркт миокарда	ОКН	5 лет	Ишемическая болезнь сердца, атеросклероз аорты.	нет данных	Отрицательный	Отрицательный
CIDp520006152	4	Острый	ОКН	5 лет	Ишемическая болезнь	нет данных	Отрицательный	Отрицательный

Таблица 1.3. – Клиническая характеристика доноров в Коллекции-1-liv

ID донора	ПМИ (часы)	Патология	Причина смерти	Длительность заболевания	Сопутствующие заболевания	Сопутствующая терапия	Анализ на трансмиссивные заболевания	Анализ на COVID- 19
		инфаркт миокарда			сердца, атеросклероз аорты.			
		Острый			Ишемическая болезнь			
CIDp520006153	4	инфаркт	ОКН	3 года	сердца, атеросклероз	нет данных	Отрицательный	Отрицательный
		миокарда			аорты.			
CIDp520006153	4	Острый инфаркт	ОКН	3 года	Ишемическая болезнь сердца, атеросклероз	нет данных	Отрицательный	Отрицательный
		миокарда			аорты.			
CIDp520006154	4	инфаркт головного мозга	СМН	0,5 месяца	Атеросклероз артерий головного мозга	нет данных	Отрицательный	Отрицательный
CIDp520006154	4	Инфаркт головного мозга	СМН	0,5 месяца	Атеросклероз артерий головного мозга	нет данных	Отрицательный	Отрицательный
CIDp520006155	2	Острый инфаркт миокарда	ОКН	3 года	Ишемическая болезнь сердца, атеросклероз аорты.	нет данных	Отрицательный	Отрицательный
CIDp520006155	2	Острый инфаркт миокарда	ОКН	3 года	Ишемическая болезнь сердца, атеросклероз аорты.	нет данных	Отрицательный	Отрицательный
CIDp520006156	3	Острый инфаркт миокарда	ОКН	5 лет	Ишемическая болезнь сердца, острая коронарная недостаточность.	нет данных	Отрицательный	Отрицательный
CIDp520006156	3	Острый инфаркт миокарда	ОКН	5 лет	Ишемическая болезнь сердца, острая коронарная недостаточность.	нет данных	Отрицательный	Отрицательный

Примечание - ОКН – острая коронарная недостаточность; ПМИ – постмортальный интервал; СМН – сосудистая мозговая недостаточность. Сведения о донорах были предоставлены в обезличенном виде с возможностью проведения аудита полученных данных.

1.2. Коллекция-1-PS – образцы плазмы и сыворотки крови условно-здоровых доноров

Сбор биоматериала выполнен в рамках договора на выполнение научноисследовательских работ №77/233 от 14 сентября 2022 г. (исполнитель ООО «Национальный биосервис», г. Санкт-Петербург).

Сбор биообразцов осуществлялся в соответствии с разработанным на первом этапе проекта Протоколом сбора, хранения, транспортировки биологических образцов, отвечающих особенностям эксплуатации УНУ «Авогадро».

Критериями включения являлись:

условно-здоровые участники;

индекс массы тела от 18,5 до 25,0.

Критериями исключения являлось наличие в анамнезе:

онкологического, аутоиммунного заболевания, сахарного диабета, бронхиальной астмы, ХОБЛ, желчнокаменной болезни (допустимые заболевания: гипертония, хронический гастрит, варикоз, мочекаменная болезнь, нейродегенеративные заболевания, панкреатит);

трансмиссивное заболевания;

вирусного и бактериального заболевания в острой фазе;

гормональной терапия в течении 30 дней перед забором биоматериала;

беременности или грудного вскармливания;

алкогольной и/или химической зависимости.

Коллекция включала две группы: 1 группа – 15 мужчин и 15 женщин в возрасте от 45 до 59 лет; 2 группа – 15 мужчин и 15 женщин в возрасте от 60 до 74 лет.

Забор биоматериала проводился с утра натощак в следующие типы вакуумных пробирок:

1. со стабилизатором К2 ЭДТА;

2. со стабилизатором цитрат натрия 3,2%.

Сведения о донорах были предоставлены в обезличенном виде с возможностью проведения аудита полученных данных. Согласно п.6.1.1.4 ТЗ, для каждого образца получены клинические сведения, включающие антропометрических характеристики доноров (Рисунок 1.1). Также были получены клинические характеристики доноров (Рисунок 1.2).

Все участники исследования в анкетировании отрицали наличие вредных привычек, являлись трудоспособными.



Рисунок 1.1 – Антропометрические характеристики доноров, образцы от которых были включены в Коллекцию-1-PS



Рисунок 1.2 – Клинические характеристики доноров, образцы от которых были включены в Коллекцию-1-PS

1.3. Коллекция-2-PS-сс – образцы плазмы и сыворотки крови, полученные от пациентов с диагнозом колоректальный рак

Сбор биообразцов выполнен в рамках договора на выполнение научноисследовательских работ №77/233 от 14 сентября 2022 г. (исполнитель ООО «Национальный биосервис», г. Санкт-Петербург). Сбор биообразцов осуществлялся в соответствии с разработанным на первом этапе проекта Протоколом сбора, хранения, транспортировки биологических образцов, отвечающих особенностям эксплуатации УНУ «Авогадро».

Критериями включения являлись:

1) пациенты с диагнозом колоректальный рак I-IV стадии;

2) любое лечение.

Критериями исключения являлось наличие в анамнезе:

1) наследственных онкологических синдромов, связанных с раком толстой кишки, таких как семейный аденоматозный полипоз и синдром Линча;

2) трансмиссивного заболевания.

Коллекция включала биообразцы от трех групп доноров. Забор биоматериала проводился с утра натощак в следующие типы вакуумных пробирок:

- со стабилизатором К2 ЭДТА.

-с активатором свертывания и гелем-разделителем (типа SST) (Таблица 1.4).

Таблица 1.4 – Группы доноров, участвующие в исследовании, биологические образцы от которых вошли в Коллекцию-2-PS-сс

Группа	Гендерное	Возраст	Стадия	Тип биоматериала
	распределение			
1	10 мужчин	от 50 до 70 лет	I-II	плазма (К2ЭДТА)
	10 женщин			
2	10 мужчин	от 50 до 70 лет	III-IV	плазма (К2ЭДТА)
	10 женщин			
3	5 мужчин	от 50 до 70 лет	III-IV	сыворотка (SST)
	5 женщин			

Сведения о донорах были предоставлены в обезличенном виде с возможностью проведения аудита полученных данных. Согласно п.6.1.1.4 ТЗ, для каждого образца получены клинические сведения, включающие антропометрические характеристики доноров (Рисунок 1.3) и клинические показатели.



Рисунок 1.3 – Антропометрические характеристики доноров, биологические образцы от которых вошли в Коллекцию-2-PS-сс

Также были получены клинические характеристики доноров (Рисунок 1.4). Все доноры отрицали наличие вредных привычек, трудоспособными являлись только 35% доноров.



Рисунок1.4 – Клинические характеристики доноров, биологические образцы от которых вошли в Коллекцию-2-PS-сс. *ГРЭБ – гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь

1.4. Подготовка и аннотация биологических образцов для Коллекции-cell – клеточные линии: эмбриональные стволовые клетки и клетки линии HepG2

1.4.1. Коллекция-1-cell – hESKM-05

В связи с невозможностью приобретения в 2022 году коммерческой линии человеческих эмбриональных стволовых клеток (ЭСК, Cellartis® Human ES Cell Line 181 (SA181) Kit (Takara Bio), которую планировалось использовать в исследовании, в лабораторию клеточной биологии ИБМХ коллегами из РНИМУ им. Н.И. Пирогова была передана на безвозмездной основе клеточная линия человеческих

эмбриональных стволовых клеток (hESKM-05). Клеточная линия hESKM-05 была получена в 2008 г. в НИИ общей генетики им. Н.И. Вавилова, Российской академии наук (Москва), под руководством М.А. Лагарьковой из бластоцисты с развитой внутренней клеточной массой. Уникальность этой линии состоит в том, что она исходно была выведена, как бесфидерная (не требующая для своего роста фидерного слоя, состоящего из мышиных фибробластов), что делает ее свободной от ксеногенных (чужеродных) контаминаций, связанных с наличием в культуре продуктов жизнедеятельности клеток, относящихся к иному виду животного. Необходимость использования ЭСК, растущих без фидера и без добавления сыворотки (т.е. животных белков), крайне важна, поскольку контаминация животными продуктами может существенно искажать результаты. По данным создателей клеточной линии hESKM-05 [5], она экспрессирует белки, характерные для плюрипотентных клеток, такие как осt4, nanog, SSEA-4, Tra1-60, и имеет нормальный диплоидный 46 XX-набор хромосом.

Клетки линии hESKM-05 размораживали и культивировали в соответствии с протоколом, разработанным нами на предыдущем этапе проекта (см. 1.9.П.2. Протокол культивирования человеческих эмбриональных стволовых клеток Научного отчета по проекту за 2021 год), и рекомендациями авторов этой линии. За сутки до размораживания ЭСК 6-луночные планшеты покрывали матригелем (MatrigelTM). Разморозку клеток осуществляли в течение 5 мин при 37°С на водяной бане. Клетки суспендировали в ростовой среде mTeSRTM1 или mTeSRTM Plus и осаждали при 300 g в течение 5 мин для избавления от криосреды. Полученный осадок ресуспендировали в той же ростовой среде с добавлением 10 мкмМ ингибитора ROCK. Ингибитор ROCK добавляли в культуральную среду при каждой пересадке/разморозке клеток. Через 24 ч после разморозки культуральную среду меняли на свежую без ингибитора ROCK. Смену среды осуществляли ежедневно, если клетки выращивали на mTeSRTM1, или через день, если клетки выращивали на mTeSR^{тм} Plus. Морфологию клеток оценивали с использованием фазовоконтрастного микроскопа Zeiss Axiovert 40 CFL (объектив CP-ACHROMAT, 10x/0,25Ph1), фотографировали культуры, используя фотокамеру Nikon D5000 (Рисунок 1.5).

Клетки линии hESKM-05 при культивировании образовывали нечеткие

колонии или отдельные группы клеток, которые не формировали плотный монослой, заполняя поверхность лунки 6-луночного планшета не более, чем на 60-70%. При достижении такой конфлюентности осуществляли пересадку клеток, используя для этого раствор аккутазы. После инкубации ЭСК в аккутазе клетки отмывали в ростовой среде 2-3 раза центрифугированием и рассаживали 1/6 часть (~500 тыс клеток/лунка) в новые лунки, покрытые заранее матригелем. Из каждой лунки 6-луночного планшета можно было собрать 3-3,5 млн клеток. Чтобы единовременно получить 100 млн ЭСК, сначала было проведено первичное наращивание культуры до количества ~20 млн клеток, которые одновременно были Таким рассажены на шесть 6-луночных планшетов. образом, протокол, разработанный нами на предыдущем этапе выполнения проекта (Научный отчет за 2021 год Приложение 1.9.П.2.) является оптимальным для наращивания клеток линии hESKM-05. Таким образом, сформированная на отчетном этапе Коллекция-1cell- hESKM-05 соответствует требованиям п.6.1.1.4 ТЗ.



Рисунок 1.5 – Клетки линии hESKM-05 через четыре дня после разморозки. Фазовоконтрастная микроскопия с использованием микроскопа Zeiss Axiovert 40 CFL (объектив CP-ACHROMAT, 10x/0,25Ph1) и фотокамеры Nikon D5000. hESKM-05 имеют вытянутую морфологию и начинают формировать колонии. Не адгезировавшиеся клетки обладают округлой формой и в фазовом контрасте имеют желтоватый оттенок

1.4.1.1. Коллекция-2-cell -HepG2

Для обеспечения выполнения работ проекта были культивированы клетки линии HepG2 (гепатобластома) и сформирована Коллекция-2-cell-HepG2. Клетки культивированы в количестве 70 млн. клеток для отработки методики анализа

транскриптома в биологических образцах и 110 млн. клеток для протеомного профилирования в рамках данного проекта. На рисунке 1.6 приведена фотография культуры, получена с использованием фотокамеры Nikon D5000 (Рисунок 1.6). Выращивание клеток HepG2 осуществляли в соответствии с протоколом, разработанным и утвержденным на предыдущем этапе проекта (см. 1.9.П.1. Протокол культивирования линий трансформированных клеток Научного отчета по проекту за 2021 год). Сформированная на отчетном этапе Коллекция-2-cell-HepG2 соответствует требованиям п.6.1.1.4 ТЗ.



Рисунок 1.6 Клетки линии HepG2, культивируемые в двумерных условиях. Фазовоконтрастная микроскопия с использованием микроскопа Zeiss Axiovert 40 CFL (объектив CP-ACHROMAT, 10x/0,25Ph1) и фотокамеры Nikon D5000

1.4.2. Протокол получения 3D культур НерG2

Чаще всего при проведении медико-биологических экспериментов в качестве модельных объектов используют клетки, культивируемые в двумерных условиях. Такой способ наиболее прост и доступен, однако следует учесть, что, будучи распластанными по плоской пустой поверхности, клетки теряют контакт со своим микроокружением, что неизбежно приводит к изменениям их метаболизма и функциональных свойств. Применительно к in vitro моделям это может сулить снижение чувствительности клеток к исследуемым веществам, утрату

специфического фенотипа, потерю способности к дифференцировке и т.д. В природе же как правило встречается абсолютно противоположная ситуация: все клетки тесно соседствуют в трехмерных условиях организма. По этой причине полученные на двумерных культурах научные данные в конечном итоге часто оказываются далеки от реальности.

В последнее время наблюдается тенденция перехода к трехмерному культивированию клеток в экспериментальных исследованиях. Показано, что в трехмерных условиях в клетках возрастает продукция тканеспецифичных маркеров и полнее проявляются их важные биологические особенности. На сегодняшний день трехмерные культуры уже широко применяются при изучении межклеточных взаимодействий, регуляции экспрессии генов и механизмов дифференцировки, а также для оценки действия разрабатываемых лекарственных препаратов. Таким образом, трехмерные культуры выполняют важную роль, заполняя разрыв между экспериментами на двумерных культурах и испытаниями *in vivo*.

(A)

(Б)





Рисунок 1.7 – Получение 3D сфероидных культур HepG2. А – двумерная культура клеток линии HepG2; Б – 3D сфероид, полученный путем агрегации 2 тыс. клеток HepG2 в висящей капле в течение 4 сут. с последующим культивированием в низкоадгезивном планшете в течение 3 сут. Фазово-контрастная микроскопия. Увеличение X100

Один из наиболее перспективных способов трехмерного культивирования клеток представляют собой сфероиды – агрегаты клеток, получаемые без добавления синтетических матриксов. Поскольку культивирование в сфероидах дает клеткам возможность образовывать контакты и самостоятельно продуцировать

экстрацеллюлярный матрикс, такие условия гораздо ближе имитируют естественную среду организма, чем плоская пластиковая поверхность. Сфероиды также являются удобной платформой для прямого сокультивирования различных клеток в своем составе.

Востребованность сфероидов в онкобиологии обусловлена их пригодностью для изучения механизмов взаимной регуляции клеток и их роли в злокачественном процессе – вопросов, за которыми могут открываться новые мишени для подавления опухолевого роста. В ближайшем будущем можно ожидать все больший научный интерес к сфероидам в связи с бурным развитием биопечати, микрофабрикации и высокопроизводительного скрининга – крайне востребованных сейчас технологий, в каждой из которых сфероиды выступают ключевым инструментом.

Для создания 3D сфероидных культур на основе клеток линии HepG2 нами были опробованы три основных методических подхода, а именно формирование в низкоадгезивных планшетах, применение 3D агарозных чашек Петри и метод висящей капли (англ. – «hanging drop»). Наилучшие результаты были в тех случаях, когда культивирование проводили сначала в висящих каплях, а затем продолжали в низкоадгезивных планшетах. Пример фотоизображения полученных 3D сфероидных культур HepG2 приведен на рисунке 1.7. Разработанный протокол получения 3D культур HepG2 подробно представлен в виде Приложения A к настоящему отчету.

Работы по пунктам 2.1 ПГ, 4.1 ТЗ, 5.18 ТЗ и 6.1.1 ТЗ выполнены в полном объеме. Однако формирование коллекции биологических образцов будет продложено на следующем этапе, так как пилотные эксперименты по анализу полученных данных показали, что требование ТЗ в пункте 6.1.1.3 «-Число биообразцовдля каждого типа – не менее 10» является недостаточным в случае анализа биологического образца типа сыворотки крови или плазмы крови. Количество образцов этого типа будет доведено до «не менее 50» и они будут использованы в работах по пунктам 3.6-3.8 на следующем этапе работ.

2. ИЗГОТОВЛЕНИЕ В 2022 Г. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ АСМ-ЧИПОВ С ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННОЙ ПОВЕРХНОСТЬЮ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве исходных субстратов для изготовления АСМ-чипов с функционализированной поверхностью были использованы пластины слюды, размерами 7,5 мм * 15 мм, со слоем аминосилана (APTES). Неспецифический фотокросслинкер N-сукцинимидиловый 4-бензоилбензойной эфир кислоты (SuccBB) на основе бензофенона выступал в роли функционализирующего агента поверхности. Условия функционализации поверхности АСМ-чипа соответствовали технологическому регламенту, разработанному ранее с тем лишь исключением, что была снижена концентрация раствора кросслинкера до 0,31 мМ, что позволило загрязнения поверхности нерастворенными уменьшить риск частицами кросслинкера, а также минимизировать расход импортного реагента. На рисунке 2.1 представлен пример АСМ-изображения поверхности АСМ-чипа после стадии функционализации кросслинкером SuccBB.



Рисунок 2.1 – Типичное АСМ-изображение поверхности АСМ-чипа после стадии функционализации кросслинкером SuccBB (слева) и соответствующее сечение (справа)

Среднеквадратическое отклонение формы поверхности или шероховатость (RMS) для приведенного на рисунке 2.1 АСМ-изображения размером 5 *5 мкм2 (количество точек 256 * 256) составляет 0,102 нм.

В рамках данного этапа было изготовлено 52 ACM-чипа с функционализированной кросслинкером SuccBB поверхностью, на основании чего был составлен акт изготовления. Изготовленные ACM-чипы далее были использованы для разработки методик, соответствующих пунктам 2.3 и 2.10 ПГ, а также в экспериментах, необходимых для реализации пункта 2.11 ПГ.

Характеристики АСМ-чипов после стадии функционализации кросслинкером SuccBB соответствуют требованиям, указанным в п.6.1.2 ТЗ.

Изготовление экспериментальных образцов АСМ-чипов с функционализированной кросслинкером SuccBB поверхностью для обеспечения исследований пункту 2.2 ПГ оформлено Актом изготовления экспериментальных образцов АСМ-чипов с функционализированной поверхностью (п. 7.1.30 ТЗ), который представлен в составе пакета отчетной документации (документ «Пункт ПГ-2.2-Акт-АСМ-чипы»).

Работы по пункту 2.2 плана-графика выполнены в полном объеме, предусмотренном в отчетном периоде, и соответствуют пунктам 5.3, 6.1.2 и 7.1.12 технического задания.
3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЕТЕКЦИИ БЕЛКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕОБРАТИМОГО СВЯЗЫВАНИЯ НА ПОВЕРХНОСТИ АСМ-ЧИПА И ПОСЛЕДУЮЩИМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ АНАЛИЗОМ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ

3.1. Теоретическое обоснование метода детекции белков с использованием необратимого связывания с атомарно ровной поверхностью

3.1.1. Концепция подхода на основе детекции единичных молекул

В области наук о жизни человека традиционно существуют две основные науки – биология и медицина. Познание жизни в подавляющем большинстве исследований ведется внутри этих наук или на их стыке. Традиционно исследования в науках о жизни проводятся с применением биоаналитических методов, чувствительность которых основана на регистрации сигнала от миллионов или миллиардов объектов. Результатом таких исследований являются усредненные характеристики биологических систем, в ряде случаев несовпадающие ни с одной из них.

Альтернативным является подход исследования живых систем на уровне отдельных молекул, сфокусированный на регистрации свойств единичных объектов – биомакромолекул (нуклеиновых кислот, белков) и вирусов.

Современное развитие биомедицинской науки подошло к рубежу, когда для кардинальных перемен остро необходимо знание этих свойств. В литературе представлено достаточно много примеров результатов работ, описанных с использованием терминологии «single molecule», «single molecule measurement», «single molecule tech-niques». Важным является устранить разрозненный характер таких исследований и объединить их в рамках принципиально нового подхода, в котором объектом исследования является отдельная молекула или вирус. В рамках новой науки сочетание «single molecule approaches» будет противопоставлено «omics approaches».

В практическом плане, в науке о жизни появление нового подхода, в котором объектом исследования является отдельная молекула или вирус, является стратегическим важным, т.к. появление биомакромолекул с существенно отличными свойствами играет важную роль при балансировании биосистемы между

состоянием «здоровье» и «болезнь». Наличие в современном мире методических возможностей для выявления таких молекул обосновывает принципиальную возможность перехода в биологии и медицине от исследования усредненных свойств (основанных на анализе сложных молекулярных ансамблей) к анализу свойств отдельных молекул.

В рамках работ по проекту подготовлена концептуальная публикация, которая обозначает стартовые позиции single molecule approaches в биологии и медицине в сравнении с omics approaches: границы применимости панорамного и таргетного подходов к изучению живых систем, существующие методические решения для детекции биомакромолекул и определения физико-химических свойств и функциональных особенностей отдельных молекул, расчетные обоснования необходимого уровня аналитической чувствительности для использования результатов в практике молекулярной биологии и медицины. В заключении статьи пример результатов, полученных к настоящему приводится моменту с использованием single molecule approaches. Сведения о публикации: Pleshakova TO, Ivanov YD, Valueva AA, Shumyantseva VV, Ilgisonis EV, Ponomarenko EA, Lisitsa AV, Chekhonin VP, Archakov AI. Analysis of Single Biomacromolecules and Viruses: Is It a Myth or Reality? International Journal of Molecular Sciences. 2023; 24(3):1877. https://doi.org/10.3390/ijms24031877.

3.1.2. Обоснование степени разведения биологического образца для методики необратимого связывания молекул белка с поверхностью

В качестве начальной рабочей концентрации для дальнейших экспериментов было выбрано разведение биологического образца буфером Дульбекко (PBSD) (10 мМ, pH 7,4) в 100 раз, поскольку ранее для такого разведения были подобраны условия отмывки поверхности АСМ-чипа в условиях биоспецифического связывания – при использовании чипов, содержащих молекулярные зонды – аптамеры или антитела, специфичные к детектируемым белкам. Кроме того, такое разведение предусматривает 10 мкл начального объема биологического образца – сыворотки или плазмы крови, аликвота, объем которой обоснован в разделе 3.1.1.

Для данного разведения были выполнены теоретические расчеты количества белка в биологическом образце на примере плазмы крови. Известно, что

концентрация белка в плазме крови составляет ~100 мг/мл; имеется 6 мажорных белков (сывороточный альбумин, иммуноглобулины lgG/lgA, трансферрин, антитрипсин и гаптоглобин), которые составляют 90% белков плазмы крови, притом на долю альбумина приходится ~380 мкмоль/л; белки истощенной плазмы составляют 10% или ~10 мг/мл [6]. На нормированной площади 400 мкм2 можно разместить 15 000 штук антител, что будет соответствовать монослою по данным [7]. АСМ-визуализации Примерная площадь рабочей зоны функционализированного АСМ-чипа составляет ~63 мм2. Тогда на этой площади можно разместить ~ 2,36 * 109 штук молекул белка. Исходя из данных, что содержание белка в плазме составляет 100 мг/мл, и приняв среднюю молекулярную массу белка за 50 кДа, получим молярную концентрацию белка в плазме 2*10-3 моль/л. Для дальнейшей работы с применением АСМ исходная плазма разбавляется буфером PBSD в 102 раз, тогда концентрация белка составляет 2*10⁻⁵ моль/л. Объем разбавленной плазмы – 1 мл. В 1 мл разбавленной плазмы с такой концентрацией белка содержится 1,2*1016 молекул. Тогда, чтобы неспецифически выловить все белки на функционализированную поверхность из 1 мл разбавленной в 102 раз плазмы крови (последовательное «обеднение»), понадобится ~106 ACM-чипов, что трудно реализуемо. Однако, на эффективность иммобилизации также влияет ряд факторов: разная природа взаимодействий между белком и поверхностью, рН раствора, доступность функциональных групп для связывания, температура и т.д. Поэтому мы решили выбрать разведение биологического образца в 102 раз на первом этапе исследований для экспериментальных работ.

3.2. Разработка методики необратимого связывания с использованием буферного раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина

Так как альбумины составляют большой процент содержания в биологическом образце, а их концентрация в разбавленной в 102 раз сыворотке составит ~ 10⁻⁷ М, был выбран буферный раствор бычьего сывороточного альбумина (BSA) в концентрации 10⁻⁷ М в качестве модельного объекта для имитации раствора биологического образца и подбора оптимальных параметров для отработки соответствующих методик. Бычий сывороточный альбумин (BSA) представляет собой небольшой, стабильный и в меру инертный белок. В лабораториях он обычно

используется в качестве эталона концентрации белка, как ингибитор во многих иммуноанализах или в качестве добавки к культуре клеток. BSA – самый распространенный сывороточный белок в бычьей крови. Благодаря промышленности скотоводства, он относительно дешевый и легкодоступный. Согласно литературным данным, BSA имеет молекулярную массу 66,5 кДа [8].

АСМ-чипы были функционализированы с помощью фотокросслинкера SuccBB на основе бензофенона (см раздел 2 данного отчета), а также была изготовлена партия чипов с поверхностью, активированной с помощью с помощью кросслинкера дитиобис-(сукцинимидилпропионата) (DSP) на основе сукцинимида, который несмотря на наличие необратимой конкурентной реакции гидролиза функциональных групп мог оказаться привлекательным для снятия белка с поверхности АСМ-чипа при последующем МС-анализе и использовался нами ранее в работах по биоспецифическому фишингу.

Для контрольных экспериментов были изменены следующие условия по сравнению с рабочими экспериментами:

1) контроль 1, АСМ-чипы, активированные SuccBB, инкубировали в растворе, не содержащем белок – в буфере PBSD;

 контроль 2, АСМ-чипы, поверхность которых не была функционализирована кросслинкером, инкубировали в 10⁻⁷ М растворе BSA;

 контроль 3, АСМ-чип, активированный SuccBB, инкубировался в растворе 10⁻⁷ М BSA без воздействия УФ-облучения.

Результаты ACM-визуализации поверхности ACM-чипа в рабочих и контрольных экспериментах представлены на рисунке 3.1.







Рисунок 3.1 — Типичные ACM-изображения (слева), полученные в рабочих экспериментах (а-в) и в контрольных экспериментах (г-е) и соответствующие сечения (справа). Условия экспериментов были следующие: рабочие эксперименты а) поверхность ACM-чипа функционализирована кросслинкером на основе сукцинимида (DSP), инкубация проводилась в буферном растворе BSA с концентрацией 10⁻⁷ M; б) поверхность ACM-чипа функционализирована кросслинкером на основе бензофенона (SuccBB), инкубация проводилась при УФоблучении в буферном растворе BSA с концентрацией 10⁻⁷ M;

в) поверхность ACM-чипа функционализирована кросслинкером на основе бензофенона (SuccBB), инкубация проводилась при УФ-облучении в буферном растворе BSA с концентрацией 10⁻⁹ M; Контрольные эксперименты г) поверхность ACM-чипа функционализирована кросслинкером на основе бензофенона (SuccBB), инкубация проводилась при УФ-облучении в буфере PBSD;

д) поверхность ACM-чипа не функционализирована кросслинкером, инкубация проводилась при УФ-облучении в буферном растворе BSA с концентрацией 10⁻⁷ M; е) поверхность ACM-чипа функционализирована кросслинкером на основе бензофенона (SuccBB), инкубация проводилась в отсутствие УФ-облучения в буферном растворе BSA с концентрацией 10⁻⁷ M

Как видно из рисунка 3.1, в случае иммобилизации BSA из раствора с концентрацией 10⁻⁷ М на поверхности, функционализированной кросслинкером DSP, визуализируются компактные объекты с высотой ~ 1.5 нм (а). В случае иммобилизации BSA из растворов с концентрациями 10⁻⁷ М и 10⁻⁹ М на поверхности, функционализированной кросслинкером SuccBB, наблюдаются фрагменты слоя с

высотами ~3 нм и ~2 нм, соответственно (б и в).

В случае контроля 1 (г) на поверхности визуализируется незначительное число неспецифических объектов с высотой >1 нм, количество которых не превышает шумовой сигнал (500 объектов/400 мкм2). В случае контроля 2 на поверхности также визуализируется шумовое количество объектов с высотами до 2 нм. В случае контроля 3 на поверхности визуализируются объекты, высотой до 4 нм, некоторые из этих объектов латерально протяженные. Полученные в рабочих экспериментах структуры были отнесены нами к молекулам BSA, так как в контрольных экспериментах (г и д) такие структуры отсутствуют. Объекты, визуализированные в небольшом количестве на поверхности в случае контроля 3, также могут быть отнесены к молекулам BSA. Причиной этому может служить сама функционализация фотокросслинкером SuccBB, которая повышает гидрофобность поверхности ACM-чипа и делает неспецифическое взаимодействие BSA с такой поверхностью благоприятным.

Результаты, полученные в случае (в), согласуются с данными ACMсканирования, представленными нами ранее при иммобилизации человеческого сывороточного альбумина (HSA) из водного раствора (10⁻⁹ M) в работе. Тогда на поверхности ACM-чипа, функционализированного SuccBB, визуализировался слой, толщиной ~1,4 нм, который был отнесен нами к молекулам HSA.

Таким образом, по данным ACM-визуализации кросслинкер SuccBB показал большую эффективность иммобилизации BSA в сравнении с кросслинкером DSP. Поэтому кросслинкер SuccBB был использован на следующем этапе в экспериментах по «обеднению» раствора биологического образца (сыворотки здорового добровольца).

3.3. МС-анализ белков, сконцентрированных на поверхности АСМ-чипов с помощью необратимого связывания с помощью необратимого связывания из буферного раствора высокопредставленного белка плазмы крови – альбумина

В рамках разработки методики, в соответствии с п.2.3 ПГ была проведена пробоподготовка и масс-спектрометрическая детекция АСМ-чипов с функционализированной поверхностью и растворов. Использованных для инкубации АСМ-чипов.

На первом этапе работ, для отработки протокола пробоподготовки были использованы АСМ-чипы и растворы из серии по обнаружению бычьего сывороточного альбумина (BSA), необратимый фишинг которого описан в подразделе 3.2.1.

масс-спектрометрического анализа достаточно требуется Для часто многоэтапная пробоподготовка образца, однако большое количество этапов может повлечь за собой потерю образца или его загрязнение, что может стать критичным при высокочувствительном анализе на уровне единичных молекул. По этой причине следует выбрать необходимые, но достаточные этапы пробоподготовки, которые бы не оказали существенного влияния на результат, особенно В случае высокочувствительного анализа [9].

Для оптимизации процесса пробоподготовки, в ранее используемые для ACM/MC подхода протоколы подготовки проб – смывов с поверхности ACM-чипа, были внесены следующие изменения:

1. Термошкаф был заменен термошейкером, по следующим причинам: удобство использования, более интенсивное перемешивание при гидролизе, лучшая контролируемость процесса.

2. Вместо бикарбонатного буфера предложено использовать бикарбонат триэтиламммония буфер. Так как бикарбонат триэтиламмония буфер более летучий, поэтому лучше подходит для процесса концентрирования.

3. Так же для более тщательного перемешивания после стадии гидролиза был добавлен этап выдерживания пробы на вортексе.

Для возможности масс-спектрометрической детекции необходимо провести гидролиз белков на поверхности с помощью протеазы – трипсина, так как последующая идентификация происходит белка по триптическим пептидам с использованием масс-спектрометрических и биоинформатических подходов.

Бикарбонат триэтиламммония буфер (TEAB) и хлорацетамид (CAM) были разведены до рабочей концентрации 50 мМ. Для проведения трипсинолиза чипы погружали в объем раствора, содержащего 5 мкл трипсина с концентраций 0,18 г/л, 20 мкл TEAB (50 мМ) и 400 мкл деионизованной воды для того, чтобы раствор полностью покрывал слюду. Трипсинолиз проходил в термошейкере (18 часов, 37 °C, 800 об) в горизонтальном положении, чтобы буфер покрывал слюду. После чего

образцы встряхивали на вортексе MIX 1 и 10 минут на центрифуге rpm 9000 об/мин для тщательного перемешивания.

Для проведения масс-спектрометрического анализа разводилась матрица DHB 40 мг в 1 мл в 50% ACN и 0,7% TFA. Выбор матрицы DHB и концентрация были сделаны на прошлом этапе отчетности. Раствор матрицы опускали в ультразвуковую ванну на 10 минут, после визуально оценивая отсутствие осадка на дне пробирки. Смыв с каждого ACM-чипа наносился в трех повторах на мишень на MALDI MTP384 масс-спектрометра (Bruker Autoflex) послойно с матрицей 2:1.

Масс-спектрометрический анализ был проведен для смывов с ACM-чипа для модельного белка BSA, для контрольных экспериментов и для растворов с данным белком в трех повторах. Так как наличие солей каждом образце понижает чувствительность детекции масс-спектрометра, перед каждым из 3 повторов на мишень наносилась калиброванная смесь пептидов 10⁻⁵ M BSA. Калибровка перед измерением смывов с ACM-чипа происходила в режиме Quadratic для 6-8 точек для смеси пептидов 10⁻⁷ M BSA. Количество точек и режим выбирались экспериментально для растворов гидролизованного белка 10⁻⁵ M BSA в соответствии с рекомендациями производителя для данного режима (Bruker Daltonik GmbH, Бремен, Германия).

Масс-спектрометрический анализ проводился с использованием массспектрометра AutoFlex III TOF (Bruker Daltonik GmbH, Бремен, Германия), оснащенным азотным лазером с длиной волны эмиссии 337 нм. Калибровку массспектрометра проводили с использованием пептидного раствора 10⁻⁵ М BSA в положительном ионном в режиме. Зарегистрированный масс-спектр был от 660 до 4000 m/z при времени задержки импульса 200 нс. МС-анализу подвергались смывы триптической смеси пептидов с поверхности АСМ-чипов и гидролизованные растворы BSA.

Полученные масс-спектры были откалиброваны в программе FlexControl (Bruker Daltonik GmbH, Бремен, Германия), (внешняя калибровка) и FlexAnalysis 2.0 (внутренняя калибровка), для калибровки использовали как минимум 2 пика автолиза трипсина 842.509 и 2211.104 в режиме Linear (по рекомендации производителя Bruker Daltonik GmbH) и в режиме Quadratic при внутренней калибровке по 3 и более пикам BSA.

Далее была составлена пептидная карта в соответствии с паспортом BSA, предложенным производителем. Для поиска нужного белка P02769 (ALBU_BOVIN) был использован сервис UniProt (https://www.uniprot.org). Для составления пептидной карты был использован сервис web.expasy (https://web.expasy.org) с двумя пропущенными сайтами гидролиза, возможные модификации: Oxidation (M) [10] и для образцов, претерпевших алкилирование и восстановление был выбран карбамидометилцистеин в качестве фиксированной модификации [11].

Идентификация белков производилась сопоставлением по принципу пептидного отпечатка (PeptideMassFingerprint).

В программе Excel была разработан шаблон для автоматизации поиска пиков BSA с точностью до100 ppm.

Для отработки протокола были рассмотрены следующие параметры для варьирования:

- 1. Кросс-линкер
- 2. Алкилирование и восстановление
- 3. Способы концентрирования
- 4. Обессоливание
- 5. Различные концентрации BSA

3.3.1. Влияние кросс-линкера, используемого для необратимого связывания на результаты МС-анализа

Цель эксперимента заключалось в анализе различия в составе пептидной смеси бычьего сывороточного альбумина (BSA), ковалентно иммобилизованного с помощью сукцинимидного кросс-линкера дитиобис (сукцинимидилпропионата (DSP) и фотокросс-линкера N-сукцинимидилового эфира 4-бензоилбензойной кислоты (SucBB) на ACM-чипах. В настоящей работе был выполнен сравнительный анализ результатов MC-идентификации пептидов BSA.

В таблице 3.1 представлены результаты масс-спектрометрического и биоинформатического анализа для кросс-линкеров DSP и SuccBB, а также для гидролизованного раствора BSA. Пептиды, представленные в таблице, были получены с помощью шаблона, разработанного для анализа масс-спектров после внутренней калибровки на основе метода PeptideMassFingerprint. Количество

идентифицированных пиков мы использовали как критерий эффективности и чувствительности анализа, при S/N> 2, ppm <100.

Таблица 3.1 – Результаты MALDI-MC-анализа для пептидов, зарегистрированных со смывов с ACM-чипов с функционализированной поверхностью на основе сукцинимидного кросс-линкера (DSP) и фотокросс-линкера (SucBB), а также же пептиды, зарегистрированные в растворе белка 10⁻⁷ M (solution)

SucBB	DSP	Solution10 ⁻⁷ M
665.3287	689.3729	665.3287
689.3729	927.49344	689.3729
712.3736	1163.6306	927.4934
818.4254	1479.7954	1163.6306
922.488	1567.7427	1249.6211
927.49344	1955.9379	1283.7106
1050.4924		1439.8117
1249.6211		1479.7954
1305.7161		1567.7427
1479.7954		1639.9377
1511.8427		1955.9379
1567.7427		2045.0279
1639.9377		
1888.9268		
Итого: 14	Итого: 6	Итого: 12

Как видно из таблицы 3.1, фотосшивающий агент SuccBB показал лучшую эффективность в части концентрирования белков – пептидов в MC-анализе обнаружено больше, чем в случае использования DSP.

Для анализа полученных данных мы представили различие в результатах МС для случае использования кросслинкеров DSP и SuccBB, а также для раствора белка 10⁻⁷ М в виде диаграммы Венна на Рисунке 3.2. Зарегистрированные пептиды сравнивали с использованием трехуровневой диаграммы Венна (рисунок 3.2). Сегмент темно-сиреневого цвета в центре представляет собой 6 общих пептидов, идентифицированных: в растворе и с поверхности АСМ-чипа с разными сшивающими агентами. Сегмент персикового цвета представляет 7 пептидов, идентифицированных исключительно при использовании фотокросслинкера SuccBB; фиолетовый сегмент представляет 4 пептида, идентифицированных исключительно в растворе; а зеленый сегмент представляет уникальные пептиды, идентифицированных исключительно в результате использования сукцинимидного кросслинкера DSP.

На основе полученных данных МС-анализа сделано предположение, что белок при концентрировании на поверхности с помощью фото-кросслинкера SuccBB на ACM-чип ориентируется на поверхности определенным образом, образуя больше доступных сайтов для трипсина.



Рисунок 3.2 — Результаты МС-идентификации белка BSA представленные в виде диаграммы Венна: пептиды, зарегистрированных в случае анализа 10⁻⁷ М раствора (фиолетовый); в случае анализа образцов с поверхности чипа, активированного DSP (зеленый) и SucBB (розовый)

3.3.2. Влияние этапов алкилирования и восстановления на результаты МСанализа

Подготовка проб для масс-спектрометрического протеомного анализа на данном этапе исследований включала дополнительные этапы восстановление белков и алкилирование остатков цистеина перед последующим ферментативным гидролизом.

Подготовка проб для масс-спектрометрического протеомного анализа включала восстановление белков и алкилирование остатков цистеина [9] с ферментативным гидролизом [12]. последующим Важным является этап дисульфидных последующего алкилирования восстановления связей И образованных свободных тиольных групп, [9]. Метод пробоподготовки

восстановления предполагает восстановление остатков цистеина – разрыв S-Sсвязей из-за чего белок должен развернуться и количество свободных сайтов для гидролиза должно увеличиться. В ходе пробоподготовки могут протекать побочные химические реакции, влияющие на результат поиска. Например, спонтанное окисление метионина [13].

Для проведения алкилирования и восстановления остатков цистеина добавляли: 20 мкл ТЕАВ (50 мМ), 2 мкл трис(2-карбоксиэтил) фосфин гидрохлорид (TCEP) и 4 мкл САА (50 мМ) в пробирку со слюдой и инкубировали (60 минут, 80 °C, 1100 об, пробирки накрыты фольгой) [9].

Результаты масс-спектрометрического анализа с учетом стадии алкилирования и восстановления и для гидролиза без дополнительного этапа показаны в таблице 3.2.

Таблица 3.2 – Результаты MALDI-MC-анализа для пептидов, зарегистрированных со смывов с ACM-чипов с функционализированной поверхностью на основе сукцинимидного кросс-линкера (SucBB) и фотокросс-линкера (DSP), перепревших гидролиз и для ACM-чипов с наличием стадии алкилирования и восстановления, с последующим гидролизом

Тип кросс линкера	Наличие стадии алкилирования и	Количество пиков		
	восстановления			
Кросс-линкер DSP/ 10-7М	Да	3±1*		
	Нет	5±3		
Кросс-линкер SucBB/	Да	9±8		
10^{-7} M	Нет	10±6		

Примечание – Среднее количество рассчитывалось как среднее арифметическое. Стандартное отклонение посчитано как степень отклонения данных от среднего значения (квадратный корень из дисперсии).

На этапе анализа полученных результатов, оценки влияния, используемого кросс-линкеров и этапов алкилирования и восстановления, была использована визуализация детектируемых пептидов в молекуле BSA на основе полученных данных с масс-спектров с помощью данные из PDB [14], сгенерированные RasMol [15] с использованием скрипта RasMol. Как видно из рисунка 3.6. в рабочем эксперименте пептиды, полученные со смыва ACM –чипа, модифицированного кросслинкером DSP и SuccBB с BSA (10⁻⁷ M) (а) и (b) имеют явные отличия – в случае смыва с ACM-чипа с SuccBB кросслинкером доля обнаруженных пептидов больше, что видно по закрашенным областям молекулы BSA. В случае этапа

алкилирования и восстановления (c) и (d) смыв с ACM-чипа, модифицированного SuccBB кросслинкером показывает наилучший результат, так как позволяет детектировать больше пептидов.

Низкую эффективность этапа алкилирования и восстановления на поверхности ACM-чипа можно объяснить следующим образом. При нейтральных рН дисульфидные связи погружены вглубь молекулы белка и не экспонированы в растворитель, т.е. при работе с раствором BSA его структура компактно свернута [16]. Единственный свободный остаток цистеина (Cys-34) находится в домене I, в гидрофобном «кармане» молекулы [10].

Результаты данного этапа работ показали, что этапы алкилирования и восстановления не существенно влияет на результаты МС-анализа – количество идентифицированных пептидов.



Рисунок 3.3 – Визуализация мономера BSA (с помощью скрипта RasMol) Пептиды, зарегистрированные с помощью масс-спектрометрического анализа, выделены цветом. Образцы с использованием различных сшивающих агентов, включая алкилирование остатков цистеина и без этой стадии: (а) сшивающий агент SuccBB; (b) сшивающий агент DSP; (c) сшивающий агент SuccBB, включая алкилирование остатков цистеина; (d) сшивающий агент DSP, включая алкилирование остатков цистеина

3.3.3. Влияние способа концентрирования на результаты МС-анализа

Для того чтобы повысить чувствительность комбинированного метода ACM/MC, нами было рассмотрена возможность введения дополнительной стадии концентрирования.

Были выбраны два способа концентрирования: лиофилизация и концентрация с помощью роторного вакуумного испарителя (концентратора SpeedVac). Результаты МС-анализа на данном этапе работ приведены в таблице 3.3.

Лиофилизация – это сублимация. При лиофилизации происходит переход вещества из твердого (лед) состояния в газообразное (водяной пар). Вода в образцах находится в замороженном состоянии, и в впоследствии удаляется путем сублимации.

В вакуумных концентраторах используются технологии центрифугирования, вакуумирования и нагревания для удаления растворителей и концентрирования образцов при сохранении их целостности.

Концентратор SpeedVac не требует длительной пробоподготовки как лиофилизация. Мы провели сравнение двух методов концентрирования.

Для высушивания с помощью концентратора SpeedVac открытые пробирки с триптической смесью помещаются в концентратор при температуре 45 0С и высушиваются до нужного объёма. Чтобы лиофилизировать образец открытую пробирку с триптической смесью заклеить сверху с помощью пленки Parafilm, заморозить и далее лиофилизировать до сухого порошка.

Таблица 3.3 – Результаты MALDI-MC-анализа для пептидов, зарегистрированных со смывов с ACM-чипов с функционализированной поверхностью на основе кросслинкера SucBB и DSP, прошедших стадию концентрирования в лиофильном аппарате и в концентраторе SpeedVac

Метод концентрирования	Количество пиков SucBB	Количество пиков DSP
Лиофильный аппарат	8±6	5±2
Концентратор SpeedVac	8±5	6±4

Результаты эксперимента не показали существенных различий – сравнение производилось по критерию количества идентифицированных пиков. Но ранее в опытах было зафиксировано, что АСМ-чип при вращении ротора концентратора SpeedVac может выпасть из пробирки. Поэтому мы, опасаясь возможности перекрестной контаминации или потери образца сочли метод лиофилизации более

надежным для достижения цели высокочувствительного анализа.

3.3.4. Влияние процедуры обессоливания на результаты МС-анализа

При идентификации пептидов на масс-спектрометре наличие солей значительно снижает разрешающую способность и чувствительность. Поэтому было принято решение провести процедуру обессоливания для смывов с ACM-чипов.

Процедура обессоливание производилось с помощью наконечников ZipTip(µ-C18) Pipette Tip. Суть метода заключается в том, что в носике расположена специальная смола C18, которая задерживает пептиды. Для активации смолы используется растворитель –ацетонитрил (ACN 100%), далее носик с смолой промывается трифторуксусной кислотой (TFA 0,7%). Следующий этап самый важный – обеднение образца с помощью многократного пипетирования – именно так пептиды должны захватываться смолой. Далее пептиды со смолы снимаются с помощью промывки ацетонитрилом в отдельную пробирку – этот раствор мы называем целевым. А оставшаяся обедненная жидкость называется стоком.

В таблице 3.4 показано количество пептидов, зарегистрированных с помощью масс-спектрометрического анализа после стадии обессоливания с помощью наконечников ZipTip(µ-C18) PipetteTip для сукцинимидного кросс-линкера (SucBB) и фотокросс-линкера (DSP). В таблице указано среднее количество пептидов в целевом растворе и в стоковом.

Таблица 3.4 — Результаты MALDI-MC-анализа для пептидов, зарегистрированных со смывов с ACM-чипов с функционализированной поверхностью на основе сукцинимидного кросс-линкера (SucBB) и фотокросс-линкера (DSP), прошедших стадию обессоливания с помощью наконечников ZipTip(µ-C18) PipetteTip

Тип раствора	Количество пиков SucBB	Количество пиков DSP
Целевой раствор	2±1	5±3
Сток	5±4	5±2

Для демонстрации разницы МС-данных между двумя растворами (стоковый растром и целевой), приведен пример спектров для целевого (обессоленного) раствора, стокового и спектр без стадии обессоливания, рисунок 3.4.



Рисунок 3.4 – MALDI-спектры смыва с ACM-чипа для стадии обессоливания, a) – спектр целевой раствор, б)- сток, с) – смыв с ACM-чипа после инкубации в шейкере до этапа обессоливания

Полученные результаты показали эффективность при непосредственном процессе обессоливания, но вместе и с пиками солей из спектра пропало так же подавляющее количество пептидов, которые были обнаружены в стоковом растворе. Было принято решение исключить этот этап и не использовать его в последующих экспериментах, где проводится работа с низкими концентрациями белка.

3.3.5. Результаты МС-анализа альбумина, сконцентрированного на поверхности АСМ-чипа с помощью необратимого связывания из растворов с различной концентрации белка

АСМ-чипы были инкубированы в растворах BSA с концентрациями: 10^{-7} M, 10^{-9} M, 10^{-11} M, 10^{-13} M для чипов с кросс-линкером (SucBB) и с концентрациями: 10^{-7} M, 10^{-9} M для кросс-линкера (DSP).

Так как ранее было замечено, что DSP хуже концентрирует BSA (см подраздел 3.3.1), дополнительные эксперименты с концентрациями 10⁻¹¹M, 10⁻¹³ были поставлены только для кросс-линкера (SucBB).

На рисунке 3.5 приведена гистограмма, показывающая распределение количества найденных пептидов для концентраций 10^{-7} M, 10^{-9} M, 10^{-11} M, 10^{-13} M и для контрольного ACM-чипа инкубированного только в буфере PBSD.



Рисунок 3.5 – Диаграмма, представляющая количество идентифицированных пиков для случаев использования ACM-чипа с фотокросс-линкером (SucBB), инкубированного в BSA при концентрации $10^{-7}M, 10^{-9}M, 10^{-11}M, 10^{-13}M$ и для контрольного ACM-чипа, инкубированного только в буфере PBSD

Для подтверждения идентификации белка BSA был проведен MALDI-MS/MS анализ для самых интенсивных пиков, а именно для масс 927,49 и 1639,94. Результаты показаны рисунке 3.6.

Из MS/MS спектров для молекулярных ионов с m/z 927,49 с последовательностью YLYEIAR и 1639,94 с последовательностью KVPQVSTPTLVEVSR белка BSA можно сделать вывод о том, что пики молекулярного иона с массой 927,49 и 1639,94 с высокой вероятностью принадлежат белку BSA.

Количество найденных пиков пептидов с уменьшением концентрации сильно убывало, но во всех экспериментах не равнялось нулю, что свидетельствует о возможности идентификации.



DI-TOF/TOF MS/MS молекулярного иона с m/z 927,49 (a) с последовательностью YLYEIAR и 1639,94 (b) с последовательностью KVPQVSTPTLVEVSR белка BSA. На рисунке показана основная структура молекулярного иона с массой 927,49 и 1639,94 Y-, a- и b-ионы, образующиеся в результате фрагментации этой структуры, отмечены синим, зеленым и красным цветом соответственно

Результаты работ, описанные в разделе 3 настоящего Отчета были получены в рамках работ по п.2.3. ПГ. На основании полученных результатов в соответствии с п.5.19 и п.7.1.22 ТЗ разработана Методика детекции белков с использованием необратимого связывания на поверхности АСМ-чипа и последующим массспектрометрическим анализом в биологических образцах, которая представлена отдельным документом в составе пакета отчетной документации (документ «Пункт_2.3-ПГ – Методика_АСМ_МС»). Разработанная Методика удовлетворяет требования п.6.1.15 ТЗ. Так, при использовании разведения биологического образца в 102 раз используется не более 10 мкл анализируемого образца, к которому добавляется 990 мкл буфера и конечный объем аналита составляет 1 мл, в который погружается АСМ-чип. При разведении в большей степени используется также 10 мкл образца и последовательное разведение. Следовательно, п.6.1.15.2 ТЗ выполнен.

Как показали результаты комбинированного ACM/MC подхода, высокопредставленный белок сыворотки крови – альбумин детектирован в растворе при концентрации 10⁻¹³ M (рисунок 3.5), что соответствует высокому уровню чувствительности анализа и соответствует требованию п.6.1.15.2 ТЗ.

Касательно пункта п.6.1.15.2 ТЗ в части требования ко времени анализа (не более 1 часа), установлено, что время проведения АСМ-анализа (исключая время

подготовки пробы) в основном складывается из времени сканирования – получения не менее 10 сканов с различных участков поверхности. В настоящее время получение такого количества сканов требует порядка 50 мин (4,5 мин на сканирование и перемещение сканер в заданную точку). Данные по времени сканирования получены на приборе ACM Титаниум – приборе с возможностью среднескоростного сканирования (до 2 Hz), однако на следующих этапах будет исследована возможность сканирования поверхности на высокоскоростном приборе ACM FastScan (скорость сканирования до 30 Hz). Возможность повышения скорости сканирования, предположительно, позволит повысить количество получаемых сканов и сохранить время анализа в пределах 1 часа, что соответствует T3.

Таким образом, работы по пункту 2.3 плана-графика выполнены в полном объеме и соответствуют пунктам 5.19, 6.1.15 и 7.1.22 технического задания.

4. РАЗРАБОТКА СПЕЦИАЛЬНОГО ПО ДЛЯ ОБРАБОТКИ ДАННЫХ, ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДЕТЕКТОРА –

ACM

Атомно-силовая микроскопия (ACM) открывает большие возможности для изучения структуры и свойств биологических объектов. С помощью ACM можно исследовать белки и нуклеиновые кислоты, в том числе белок-белковые комплексы. Главными определяемыми характеристиками молекул методом ACM является их размер – высота и латеральные размеры.

Работы по пункту 2.4 ПГ и в соответствии с п.5.5 ТЗ направлены на разработку программного обеспечения, позволяющего быстро и эффективно обрабатывать данные ACM-сканирования. Разработка ПО направлена на развития потенциала молекулярных детекторов на основе ACM в составе УНУ «Авогадро». Как уже описывалось в отчете за предыдущий этап проекта, в состав УНУ входит несколько различных приборов ACM от различных производителей и данные, полученные в стандартном ПО приборов, могут быть экспортированы в единый формат ASC, который далее используется для подсчета объектов и определения их высоты и объема. Однако далее, интерпретация результатов требует значительных временных ресурсов и при этом возникает ряд трудностей, описанных в отчете за прошлый этап работ. Для разработки ПО на первом этапе работ было разработано Техническое задание, которое явилось основой работ по Договору № 10/223 от 30.03.2022 г. (далее в разделе Договор), заключенному в рамках работ по Соглашению с Фондом перспективных технологий и новаций (далее ФПТН) для разработки ПО.

Работы по Договору являлись НИР, поскольку выполнение некоторых пунктов ТЗ требовало проведение исследований с целью поиска решений, позволяющих максимально эффективно решить поставленные задачи. Выполнение НИР проводилось сотрудниками ФПТН с привлечение сотрудников ИБМХ для консультаций и проверки предложенных решений. Во избежание неточности интерпретации пунктов ТЗ далее по тексту в данном разделе будет применены следующие обозначения: Техническое задание в рамках текущего проекта по Соглашению № 075-15-2021-933 будет указываться как «ТЗ-С», а Техническое задание по Договору с ООО будет указываться как «ТЗ-Д».

Исходя из п. 6.1.4. ТЗ-С требования по разработке специального программного обеспечения следующие:

-ПО предназначено для обработки данных анализа биологического образца или модельной системы, полученных с молекулярного детектора – ACM (п.6.1.4.1 ТЗ-С).;

-Формат данных для обработки представлены в кодировке ASCII (п.6.1.4.2 ТЗ-С).;

-Результаты обработки должны быть представлены в виде статистических данных (графики, диаграммы, числовые значения и др.) (п.6.1.4.3 ТЗ-С).

В качестве объекта для апробации ПО на данном этапе были выбраны золотые наночастицы, поскольку они наименее подвержены воздействию зонда в процессе сканирования на АСМ Были получены АСМ-изображения с разных микроскопов, входящих в УНУ Авогадро, а также размеры наночастиц золота были определены методами электронной микроскопии и спектрофотомерии для верификации данных анализа, полученных с помощью АСМ. На следующем этапе работ разработанное ПО будет проходит испытания по Программе и методике испытаний с привлечение данных по АСМ-анализу белков.

4.1. Выполнение НИР в рамках разработки ПО

Результаты промежуточной приёмки специального ПО для обработки данных, полученных с помощью молекулярного детектора – АСМ, разработанного ООО ФПТН, коротко описаны ниже и позволяют описать задачи, решенные на данном этапе работ. На первом этапе проверялись требования по интерфейсу и функциональным характеристикам ПО.

Исходя из пункта 2.3. технического задания (ТЗ-Д) были приведены основные параметры для разрабатываемого ПО. Исходя из этого был проведен анализ на соответствие интерфейса по ТЗ-Д и представленного в ПО.

Главная страница

Основные требования к главной странице ПО (пункт 2.3.1 ТЗ-Д) соблюдены, но были модифицированы для более удобного пользования с ПО. Однако, пункт 2.3.1-iii(2) отсутствовал и требовал доработки, далее была добавлена функция сохранения настроек обработки данных в шаблон. А также был добавлен экспорт графических данных, полученных в результате обработки исходных данных, с возможностью выбора формата .CSV, .DOCX, .JPEG.

Вкладка «Работа с файлами»

Требования к интерфейсу по вкладке «Работа с файлами» (пункт 2.3.2 ТЗ-Д) были выполнены согласно ТЗ, но оптимизированы для пользователя ПО. Однако не было выполнено 2 требования. В требовании именуемым «Поле ввода 1» имелось в виду возможность добавления дополнительных сведений по образцу, которые задаются пользователем. На рисунке 4.1 отображено возможное дополнение к представленному нам ПО. Отображение подписи необходимо выводить под графиком в виде «Название образца (название папки) → описание образца (которое задал пользователь)». Пример, представлен на рисунке 4.2.

Файл: Добавить Удалить	Доба для
Пороги отсечения, нижний: 0.8 нм, верхный: 14 нм	образ
Чысло пикселей в объекте: 4 рх. Площадь нормирования: 400 мкн2	польз
Размер карманов пистограни: для высот: 0.2 ни для площадей: 100 ни**2 для объенов: 50 ни**3 для объемов: 2000 ни**3	
Выбрать данные для обработки:	
Содин файл С Выбранные файлы 🕫 Все файлы в папке	
Метод обратотки:	
С Контуры С Гистогранну С 30 гистогранну С Аппрокоинацию	
Паранетры аппроконкации: Число функций: 3 Тип функций: 🧟 Гаусоланы С Другие	
Папка с результатани: d:\TestMany\ Найти	
Обработать Аппроксинация	

Добавить поле ввода для комментария к образцу (папке) от пользователя

Рисунок 4.1 – Требование к ПО по ТЗ-Д согласно пункту 2.3.2 «Поле ввода 1», которое необходимо добавить к представленному ПО на стадии промежуточно проверки.



Рисунок 4.2 – Отображение информации по образцу, которая вводится в поле «Описание образца»

В требовании именуемым «Ch[1:n]» отсутствовал в представленном ПО на стадии промежуточной приёмки. Данный пункт указывает, что в ПО необходим функционал, который отвечает за возможность выбора отображения образца (папки) на графиках без его удаления из обсчета. На рисунке 4.3 представлено возможное отображение данного требования, которое указано знаком *Э*.

Отображение вкладки «работа с файлами» на момент промежуточной приёмки 25.09.2022							
Файл: D:\Scan\Data 💌 Добавить Удалить							
Необходимое отображение вкладки «работа с файлами»							
Путь к файлам для обработки Описание образца Путь к файлу(папке) Поле ввода информации по описанию образца							
 — Собавление образца — Удаление образца Указатель отображения образца на графиках 							

Рисунок 4.3 – Необходимое отображении вкладки «Работа с файлами» согласно 2.3.2 пункта ТЗ-Д

Согласно пункту 2.3.2 ТЗ-Д требования именуемым «Скрол бар 1» необходимо добавить полосу прокрутки (scrollbar). В таком случае необходимо, чтобы отображалось как минимум 4 образца в одном поле видимости, а если образцов будет добавлено более 4, то необходима будет полоса прокрутки, таким образом выполнение этого пункта ТЗ не может быть проигнорировано.

Особое внимание потребовалось уделить взаимодействию программы с файловой системой. В момент тестирования возникали проблемы при работе с файлами, а именно программа переходила в состояние не функционирования и через определенное время закрывалась, не сохранив работу.

Вкладка «Общие настройки»

Согласно пункту 2.3.3. ТЗ-Д соблюдены все требования к интерфейсу вкладки «Общие настройки». Интерфейс данной вкладки представлен на рисунке 4.4.

Пороги отсечения, н	нижний:	0.8	ΗМ,	верх	сний:	10	н	M	
Число пикселей в об	ъекте:	4	px.	Пло	щадь	нормиро	вани	я: 40	0 мкм2
Размер карманов г	истогра	MM:		В	ерхни	й преде	л гис	тограм	IM:
для высот:	0.2	нм			для в	высот:	1	0	нм
для площадей:	100	нм**2			для г	площаде	й: 3	500	нм**2
для объемов:	100	нм**3			для с	бъемов:	2	000	нм**3
Выбрать данные д	ля обраб	ботки: —							
Один файл	Свы	бранные с	файлы		€ B	се файл	ывп	апке	
Метод обратотки:									_
О Выпуклый ана.	лиз	• Окон	турив	ание	грани	ц			

Рисунок 4.4 – Пример отображения вкладки «Общие настройки» в ПО во время промежуточной приёмки

Вкладка «Окно изображений»

Согласно пункту 2.3.4. ТЗ-Д (2) в рабочей зоне должно отображаться выбранное ACM-изображение, а также отдельно результат обработки данных, который представлен в виде выделенных частиц на ACM-изображении. Данный функционал был выполнен не корректно, а именно отображение результатов обработки данных отсутствовал на момент промежуточной приёмки, но был исправлен к окончательной приемке работ.

Согласно пункту 2.3.4. ТЗ-Д (3) необходимо добавление метрики к АСМ-

изображению, которое отсутствовало в ПО на стадии промежуточной приёмки. Необходимо было добавить метрику под изображение, которое отображается в рабочей зоне. Пример представлен на рисунке 4.5. Данные для метрики получаются из файлов подаваемых на обработку ПО в кодировке ASCII (параметры указаны в шапке файла), формат файла предусмотрен п.6.1.4.2. ТЗ-С.



Рисунок 4.5 – Пример отображения вкладки «Окно изображений» в рабочем поле. Зеленым прямоугольником выделен объект, который было необходимо добавить

В ходе выполнения НИР разработчиками программы был предложен оптимальный вариант работы с АСМ-данными в галерее, а именно добавлен функционал отбора АСМ-изображений для обсчёта. Отбор происходит посредством двойного клика по изображению в поле отображения всех изображений. Пример представлен на рисунке 4.6. Данный функционал был сделан согласно пункту 2.3.4. (Ch[1:n]) ТЗ-Д.



Рисунок 4.6 – Пример отображения вкладки «Окно изображений». Красным выделен пример ACM-изображения, которое в последующем пойдёт в обработку данных

Вкладка «Окно графиков»

Основные требования по пункту 2.3.5. ТЗ-Д были выполнены. Пример предложенного интерфейса представлен на рисунке 4.7. Возможность представление данных в формате гистограммы отражает требование п. 6.1.4.3 ТЗ-С

Отобразить в рабочей области результаты обработки:
• Высоты С Площади С Объемы П Относительные распределения
Тип полученных результатов:
С Контуры • Гистограмму С 3D гистограмму С Аппроксимацию
Параметры аппроксимации:
Число функций: 3 Тип функций: 📀 Гауссианы С Другие
Папка с результатами: d:\TestMany\ Найти

Рисунок 4.7 — Пример отображения вкладки «Окно графиков» в панели выбора параметров обработки.

Выявленные недочеты, которые далее были устранены разработчиками:

При не активированной кнопке «Относительные распределения» должны отображаться графики типа «Гистограмма», которые представлена в виде вертикальных столбиков. На момент промежуточной приёмки тип графика отображался линейный.

Надписи к графикам требуют доработки, основные требовании отображены на рисунке 4.8. К необходимым требованиям относится:

- добавление заголовка к диаграмме, которое соответствует объекту на рисунке 4.8 «Название серии». Данную информацию можно получить из названия папки, которая по иерархии файловой системы стоит над конечной папкой. Например, «C:\Users\IBMC\Desktop\HRP_22.06.2022\Sample1\», где «HRP_22.06.2022» является названием серии, а «Sample1» – название образца;

- корректное отображение названий образцов, которые должны быть

представлены в виде названия конечной папки, откуда были взяты файлы для обработки;

 корректное отображение количества частиц, которые были включены в обсчёт;

 корректное отображения количества частиц, которые были пересчитаны на площадь сканирования, указанным в поле площадь нормирования во вкладке «Общие настройки»;

- добавления значения площади сканирования, полученным на основе обработки данных из файлов с кодировкой ASCII.



Относительное распределение серии – «название серии»

Рисунок 4.8 – Схематичное представление отображение вкладки «Окно графиков»

Представленное специальное ПО для обработки ACM-данных было доработано по результатам промежуточной приёмки в части требований к интерфейсу, функционала, взаимодействия специального ПО с файловой системой, вывода основных данных, полученных в результате обработки исходных данных.

4.2. Обоснование изменений, внесенных в ТЗ по результатам НИР

Разработчиками специального программного обеспечения был предложен упрощенный вид интерфейса, а именно вынесение основного функционала на левую панель (рисунок 4.9). Исходя из технического задания была предложена версия в виде вкладок, но интерфейс, предложенный разработчиками, является удобным и оптимальным.

		×
Блок		î
«Работа с файлами»	Файл: Добавить Удалить Х	
«Pabora c φαιλιαλιίη»		
Блок	проги отсечения:	
«Оощие настроики»	province a movement 20 MPa, Bepxelant 30 MPa	
	Число пикселей в объекте: 4 рх. Площадь нормирования: 400 мон2	
_	Размер карманов гистограми: верхнии предел гистограми:	
Блок	для высот: 0.2 нн для высот: 10 нн	
«Параметры для	для площадей: 100 нм**2 для площадей: 3500 нм**2	
отображения графиков»	для объемов: 50 нм**3 для объемов: 2000 нм**3 Блок	
	модуль Юнга: 0.1 МРа модуль Юнга: 10 МРа «Отображение	
	графической	
	Выбрать данные для обработки:	
Блок	С Выбранные файлы 🕫 Все файлы в папках	
«Дополнительные	Петод обратотки:	
настройки»	С Выпуклый анализ 🙃 Оконтуривание границ	
-	Г Логарифи. масштао	
	Отобразить в рабочей области результаты обработки:	
Блок	Высоты С Площади С Объемы Относительные распределения	
"Babara a maduwanu"		
«гаобластрафиками»	Тип полученных результатов:	
	Сконтуры Срафики С 30 гистограмму С Аппрокомашию	
Блок	Параметры аппрокомации:	~
«Аппроксимация данных»	Число функций: 3 Тип функций: 🤄 Гауссианы С Другие	>
_	Папка с результатами: d:\TestManv\ Найти	
Блок		
«Сохранение результатов»	Название проекта:	
	«Галерея»	
		>

Рисунок 4.9 – Интерфейс ПО

Вкладка «работа с файлами» была модернизирована. Добавлена функция включения/исключения образца из обсчета, что облегчает работу оператора. Есть возможность добавления нескольких образцов. Для экономии места, все добавленные образцы отображаются выпадающим списком. Главным преимуществом является возможность загрузки данных с разных атомно-силовых микроскопов.

В ходе промежуточной приёмки необходимо было добавление функционала, которое позволит описывать кратко характеристики образца в отдельном поле. Разработчиками было предложено создавать файл «readme.txt» в папке с образцом. При добавлении образца в обработку информация из файла «readme.txt» подтягивается автоматически. Данный функционал полезен, т.к. оператору нужно будет прописать характеристики только один раз.

Вкладка «общие настройки» соответствует п. 2.3.3. ТЗ-Д

Вкладка «окно изображений» состоит из двух блоков: «Отображение графической информации» и «Галерея». В блоке «отображения графической информации» отображаются АСМ-изображения до и после обработки, а также статистические данные после обработки. Как ранее описывалось, разработчиками был предложен оптимальный вариант работы с АСМ-данными в галерее, а именно добавлен функционал отбора АСМ-изображений для обсчёта. Отбор происходит посредством двойного клика по изображению в блоке «Галерея». Также была добавлена метрика к статистическим данным, где отображается название образца, площадь сканирования, количество частиц в обсчёте, количество частиц на указанной площади сканирования и описание образца.

Вкладка «окно графиков» соответствует требованиям п 2.3.5 ТЗ-Д. Выявленные недостатки в отображения графической информации, устранены.

Вкладка «работы с графиками» соответствует требованиям п 2.3.6. ТЗ-Д. Отображение было модернизировано. Функционал данного раздела распределен по двум блокам: «Параметры отображения графиков» и «Сохранение результатов». Сохранение результатов происходит в указанную папку. В качестве результатов выступают графические и числовые данные полученные в ходе обработки АСМданных, что соответсвтуетп.6.1.4.3 ТЗ-С. А также добавлена функция «Сохранение отчёта», который представлен в виде PDF файла, где включены все графические

данные с метриками по ним. Данная функция была предложена разработчиками, что оптимизировало хранение обработанных данных.

Вкладка «Аппроксимация относительных распределений» соответствует требованиям п 2.3.7. ТЗ-Д

4.3. Формирование пакета программной документации

Согласно техническому заданию, разработчиками ПО была предоставлена программная документация специального программного обеспечения для обработки данных, полученных с помощью молекулярного детектора – ACM (п.7.1.2.1 ТЗ-С) в составе:

- 1. Текст программы в соответствии с ГОСТ 19.401-78;
- 2. Описание программы в соответствии с ГОСТ 19.402-78;
- 3. Описание применения в соответствии с ГОСТ 19.502-78;
- 4. Руководств оператора в соответствии с ГОСТ 19.505-79;
- 5. Пояснительная записка в соответствии с ГОСТ 19.404-79;
- 6. Программа и методика испытаний в соответствии с ГОСТ 19.301-79.

Программная документация представлена в составе пакета отчетной документации, название файлов «Пункт_ПГ-2.4-ххх», где «ххх» краткое название документа из списка, указанного выше. Производители предложили название «BioImageAFM», но в дальнейшем для регистрации ПО, в ИБМХ предложено название «SiMol», отражающее сочетание «single molecule» – единичная молекула, и соответствующее подходу к исследованию биосистем, отраженную в статье, опубликованной в рамках проекта Pleshakova, T.O.; Ivanov, Y.D.; Valueva, A.A.; Shumyantseva, V.V.; Ilgisonis, E.V.; Ponomarenko, E.A.; Lisitsa, A.V.; Chekhonin, V.P.; Archakov, A.I. Analysis of Single Biomacromolecules and Viruses: Is It a Myth or Reality? Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 1877. https://doi.org/10.3390/ijms24031877.

4.4. Апробация разработанного ПО с применением данных АСМ-анализа золотых наночастиц

В апробации участвовало 2 набора данных с одного образца, полученных на основных приборах, входящих в УНУ Авогадро. Первый набор представлял из себя 6 ACM-изображений, полученных в результате сканирования образца на ACM FastScan от производителя Bruker. Второй набор включал в себя 4 ACM-изображения, полученных с того же образца. Второй набор был получен на ACM

Titanium от производителя NT-MDT.

Каждое АСМ-изображение было обработано отдельно, а также в группе, исходя от прибора, с помощью которого они были получены (рисунок 4.10). Метод выделения «оконтуривание». Пороги отсечения по высоте от 3 нм до 10 нм. Число пикселей в объекте 2. В ходе апробации ошибок не возникало. Результаты, полученные в ходе апробации, будут сравнены с данными анализа, полученными коммерчески доступными программными обеспечениями далее в работе.



(B)

Рисунок 4.10. Типичные распределения частиц золота по каждому ACMизображению с прибора FastScan (A) и прибора Titanium (Б), а также отдельно по каждому прибору (В), где были включены все ACM-изображения исходя от прибора

Выбор золотых наночастиц в качестве тестовых объектов обусловлен их свойствами. Главным параметром является их размер, который можно определить различными методами: атомно-силовой микроскопией, спектрофотомерией и

электронной микроскопией. Полученные данные можно сравнивать друг с другом, так как наночастицы золота практически не изменяют своих размеров во время измерения разными методами.

4.4.1. Методика синтеза золотых частиц (AuNP)

Для получения суспензии AuNP необходимы следующие исходные растворы:

Раствор золотохлористоводородной кислоты HAuCl4 1% (38,8 мМ) приготовлен из навески 0,05 г HAuCl4*3H2O растворенной в 1мл воды (4.31%,), к объему 0,23мл было добавлено 0,77мл воды.

Раствор цитрата натрия 1%, приготовлен из навески 0,014г Na3C6H5O7*5,5H2O растворенной в 1мл воды, раствор фильтрованный.

ТСЕР 50мМ приготовлен растворением в 100мкл воды навески 0,001435г;

Деионизованная вода.

Синтез AuNP проведен по следующему протоколу:

Нагреть 24 мл воды в пробирке на 50 мл, обмотанной фольгой, на шейкере при 99°С (точность поддержания температуры ±3°С) 30 мин. Температура внутри должна быть порядка 84°С (стеклянный термометр).

Добавить 0,25 мл 1% (38.8 мМ) раствора золотохлористоводородной кислоты, увеличить до максимума скорость перемешивания (с 650 до 750).

Быстро добавить (впрыснуть из пипетки) 0,75 мл 1% раствора цитрата натрия (навеска 1,38 г в 100 мл деионизованной воды, фильтрованный раствор комнатной температуры), перемешивать на шейкере 30 мин.

Оставить охлаждаться до комнатной температуры при перемешивании. Выключить нагрев. В результате раствор должен быть рубиново- красной окраски.

Раствор наночастиц хранить в темноте при 4°С.

4.4.2. Характеристика золотых частиц методом электронной микроскопии Подготовка образцов для ЭМ исследования.

Капля раствора с суспензией золотых частиц, приготовленной по методике, изложенной в п.4.4.1., размещалась на гидрофобной поверхности пластиковой чашки Петри. Капля не растекалась по поверхности и представляла собой хорошо оформленную полусферу.

3-х миллиметровая ЭМ-сеточка, покрытая углеродной пленкой, помещалась на вершину капли на время 10-12 минут. Этого времени оказалось вполне

достаточно, чтобы частицы золота сели на углеродную пленку в количестве, вполне подходящем для их дальнейшего изучения в ЭМ.

Затем излишки воды "стягивались" с поверхности углерода при помощи фильтровальной бумаги, и далее сеточки высушивались в вакууме в течение 3-5 часов.

Результаты

ЭМ исследование показало, что частицы золота, приготовленные по вышеупомянутой методике, имеют размеры 10-15 нм и располагаются на углеродной пленке как по одиночке, так и в виде «колоний». На рисунке 4.11 представлена микрофотография типичной колонии золотых частиц.

На рисунке 4.12 представлены типичные картины расположения золотых частиц на поверхности углеродной пленки.





Рисунок 4.11 – Колония частиц золота. Слева изображение "на отражение", во вторичных электронах SE, справа – "на просвет", в прошедших электронах BF-STEM



Рисунок 4.12 – Частицы золота на поверхности углеродной пленки по данным ЭМ

Полученные микрофотографии (12 штук) были взяты за основу расчета гистограммы распределения частиц по размерам. Для расчета размера частиц

использовалась программа ImageJ, которая позволяет выделить частицы на изображении и определить проекцию площади каждой частицы. Используя эти значения, был вычислен диаметр частиц в предположении их сферичности.

Гистограмма распределения размера частиц золота приведена на рисунке 4.13



Рисунок 4.13 – Гистограмма распределения частиц золота по размерам по данным ЭМ

Кроме ярко выраженных золотых наночастиц на поверхности углеродной пленки присутствуют темные пятна размером 200-300 нм. (Рисунок 4.14), которые, и как хорошо видно при больших увеличениях, состоят из множества мелких (1-3нм) частиц. Было сделано предположение, что эти темные частицы 2-3 нм являются кластерами золота. Такие кластеры хорошо известны и описаны в литературе. Следовательно, по данным ЭМ, в растворе содержаться две основные фракции частиц – «большие» размером от 10 до 16 нм и мелкие 1-2 нм.



Рисунок 4.14 – Микрофотографии мелких частиц, предположительно, кластеров золота, по данным ЭМ

4.4.3. Характеристика золотых частиц методом спектрофотометрии

Известно, что спектр поглощения водной суспензии наночастиц (НЧ) золота зависит как от размера, так и от концентрации НЧ в суспензии [17-19]. А именно, длина волны, соответствующая максимуму (пику) поглощения суспензии НЧ зависит от их размера [17-19] (и формы), а интенсивность пика прямо пропорциональна их концентрации в суспензии [17]. В этом отношении спектрофотометрия представляет собой очень удобный способ определения характеристик суспензий НЧ золота, поскольку позволяет одновременно определять концентрацию и размер НЧ в одном измерении. Для сферических НЧ золота диаметром 10 нм длина волны, соответствующая пику поглощения, обычно составляет от 515 до 520 нм [17,18], увеличиваясь до 570 нм для НЧ диаметром 100 нм [17] за счет так называемого эффекта красного смещения. Таким образом, Хе и соавт. отметили, что водная суспензия 12-нм НЧ золота имеет оранжево-красный цвет, а суспензия более крупных (41 нм) НЧ — фиолетовый [18]. Это явление позволяет выявить агрегацию НЧ: агрегаты НЧ имеют увеличенный размер и,
следовательно, характеризуются большей длиной волны, соответствующей пику поглощения [19]. Спектрофотометрические измерения проводили следующим образом. Во-первых, для определения размера НЧ золота в суспензии 900 мкл исходной водной суспензии НЧ золота пипеткой переносили в кварцевую кювету объемом 3 мл (длина оптического пути 1 см; Agilent Deutschland GmbH, Waldbronn, ФРГ), содержащую 2100 мкл. мкл сверхчистой деионизованной воды и тщательно перемешивают. Спектр поглощения полученной суспензии регистрировали на спектрофотометре Agilent 8453 UV-vis (Agilent Deutschland GmbH, Waldbronn, ФРГ). На рисунке 4.15 показан типичный спектр поглощения, полученный в этих экспериментах.



Рисунок 4.15 – Типичный спектр поглощения суспензии НЧ золота в деионизованной воде. Условия эксперимента: объемы исходной суспензии НЧ золота и деионизованной воды 900 мкл и 2100 мкл соответственно; длина оптического пути составляла 1 см

Спектр, показанный на рисунке 4.15, показывает, что для исходной суспензии AuNP длина волны пика поглощения наблюдалась при 521 нм. Согласно [17,18], применительно к сферическим НЧ Au это значение длины волны пика поглощения соответствует диаметру НЧ Au 16-17 нм. Кроме того, на основании данных, приведенных в [17], концентрация НЧ золота в кювете оценили на уровне 1,27*1012 частиц/мл. Это означает, что концентрация НЧ золота в исходной суспензии была 2100/900*1,27*1012=2961,27*1012 частиц/мл. Во-вторых, чтобы выяснить, вызывает ли разбавление суспензии НЧ золота водой агрегацию НЧ, в кювету, содержащую 2910 мкл сверхчистой деионизованной воды, пипеткой вносили в 10 раз меньший объем (90 мкл) исходной водной суспензии НЧ, тщательно перемешивали и регистрировали спектр поглощения полученной разбавленной суспензии. Все спектрофотометрические измерения проводили при комнатной температуре не менее чем в трех технических повторах. Данные, полученные в этих экспериментах, представлены на рисунке 4.16.



Рисунок 4.16 — Спектр поглощения разбавленной разбавленной суспензии НЧ золота в деионизованной воде. Условия эксперимента: объемы исходной суспензии НЧ золота и деионизованной воды 90 мкл и 2910 мкл соответственно; длина оптического пути составляла 1 см

Данные, представленные на рисунке 4.16, показывают, что при снижении концентрации НЧ золота в кювете в 10 раз наблюдалось ожидаемое снижение интенсивности пика поглощения. При этом практически не наблюдалось сдвига длины волны пика поглощения, что указывает на то, ЧТО В наших экспериментальных условиях не наблюдалось индуцированной разбавлением агрегации НЧ золота.

4.4.4. Свойства золотых частиц по данным атомно-силовой микроскопии Обработка данных с прибора Bruker FastScan

Серия контрольных ACM-изображения свежеприготовленного раствора наночастиц золота с помощью прибора Dimension Fastscan в полуконтактном режиме с помощью кантилеверов fastscan-b.

Для избавления от агрегатов и отбора мелких частиц, раствор AuNP центрифугировался и исследовалась верхняя фракция натанта.

Обработка АСМ-изображений проводилась в бесплатно распространяемом

программном комплексе с открытым кодом Gwyddion [20].

Для каждого ACM-изображения в контрольной серии объекты выделены по методу Оца и построены гистограммы распределения частиц по высотам, объему и площади (рисунки 4.17 – 4.22).

Как видно из рисунков 4.17-4.22 основной вклад в распределения по высотам вносили объекты с высотой 5-10 нм. Площадь визуализированных объектов лежала в диапазоне от 0,001 до 0,15 мкм². Объем визуализированных объектов составил 0,00001-0,001 мкм³.



Рисунок 4.17 – ACM-изображение 1, полученное с прибора FastScan (A). Выделенные частицы, с помощью программы Gwyddion на ACM-изображении (Б). Типичные графики вклада частиц по высотам (В), по площади частиц (Г) и по объему частиц (Д)



Рисунок 4.18 – ACM-изображение 2, полученное с прибора FastScan (A). Выделенные частицы, с помощью программы Gwyddion на ACM-изображении (Б). Типичные графики вклада частиц по высотам (В), по площади частиц (Г) и по объему частиц (Д)



Рисунок 4.19 - ACM-изображение 3, полученное с прибора FastScan (A). Выделенные частицы, с помощью программы Gwyddion на ACM-изображении (Б). Типичные графики вклада частиц по высотам (В), по площади частиц (Г) и по объему частиц (Д)



Рисунок 4.20 – ACM-изображение 4, полученное с прибора FastScan (A). Выделенные частицы, с помощью программы Gwyddion на ACM-изображении (Б). Типичные графики вклада частиц по высотам (В), по площади частиц (Г) и по объему частиц (Д)



Рисунок 4.21 — ACM-изображение 5, полученное с прибора FastScan (A). Выделенные частицы, с помощью программы Gwyddion на ACM-изображении (Б). Типичные графики вклада частиц по высотам (В), по площади частиц (Г) и по объему частиц (Д)



Рисунок 4.22 – ACM-изображение 2, полученное с прибора FastScan (A). Выделенные частицы, с помощью программы Gwyddion на ACM-изображении (Б). Типичные графики вклада частиц по высотам (В), по площади частиц (Г) и по объему частиц (Д)

Обработка данных с прибора NT-MDT Titanium

Серию контрольных ACM-изображений получали на приборе NT-MDT Titanium. Данные получали при сканировании подложки с сорбированными наночастицами золота в полуконтакном режиме. Кантилеверы NSG10. Подложка при сканировании приборами Bruker FastScan и NT-MDT Titatnium была одинаковой.

Обработка ACM-изображений была произведена в программном обеспечении ImageAnalysis 3.5 Trunk. Статистический анализ был выполнен функцией «Advanced Watershed». Для обработки использовались следующие значения:

«Min grain height» – 2 нм; «Max grain size» – 1 мкм; «Local min threshold» – 4 нм; «Radius» – 0,002 мкм. Карманы гистограмм составили: Для высот – 0,23 нм; Для объемов – 0,0102 мкм*мкм*нм; Для площадей – 0,0025 мкм*нм.

Результаты обработки данных стандартным ПО, входящим в состав прибора приведены на рисунках 4.23-4.26. Полученные результаты обработки данных, полученных с прибора Titanium (NT-MDT), соответствуют результатам, полученных с прибора FastScan (Briker).



Рисунок 4.23 — ACM-изображение 1, полученное с прибора Titanium(A). Выделенные частицы, с помощью программы ImageAnalysis 3.5 Trunk на ACMизображении (Б). Типичные графики вклада частиц по высотам (В), по площади частиц (Г) и по объему частиц (Д). Количество визуализированных частиц – 281



Рисунок 4.24 — ACM-изображение 2, полученное с прибора Titanium(A). Выделенные частицы, с помощью программы ImageAnalysis 3.5 Trunk на ACMизображении (Б). Типичные графики вклада частиц по высотам (В), по площади частиц (Г) и по объему частиц (Д). Количество визуализированных частиц – 226



Рисунок 4.25 — ACM-изображение 3, полученное с прибора Titanium(A). Выделенные частицы, с помощью программы ImageAnalysis 3.5 Trunk на ACMизображении (Б). Типичные графики вклада частиц по высотам (В), по площади частиц (Г) и по объему частиц (Д). Количество визуализированных частиц – 208



Рисунок 4.26 – ACM-изображение 4, полученное с прибора Titanium(A). Выделенные частицы, с помощью программы ImageAnalysis 3.5 Trunk на ACM-изображении (Б). Типичные графики вклада частиц по высотам (В), по площади частиц (Г) и по объему частиц (Д). Количество визуализированных частиц – 182

Обработка АСМ-данных ПО, предназначенным для обработки совокупности сканов

Все ACM-данные были обработаны с помощью 2 программ: Recognite и разработанным специальным ПО (далее обозначено как SiMol). Главными параметрами для сравнивания являются количество частиц и статистические результаты (графики и гистограммы).

Программа Recognite может обрабатывать несколько ACM-изображений, но после статистической обработки результатом является распределение частиц по высотам. В данном программном обеспечении отсутствует возможно расчёт площадей и объемов визуализированных частиц.

Для обработки изображений использовались следующие параметры:

Границы для высот от 3 нм до 10 нм;

Количество пикселей – 2;

Карман по оси для высот Х – 0.2 нм.

Результаты обработки представлены в Таблице 4.1 и на рисунке 4.27.

Таблица 4.1 — Количество выделенных части разными программными обеспечениями: Recognite и SiMol

ACM-	Количество частиц общее			
изображение	Image	Recognite	SiMol	SiMol
	Analysis	_	(метод выделения –	(метод выделения –
			оконтуирование)	выпуклый анализ)
Titanium_1	281	220	40	20
Titanium_2	226	297	135	39
Titanium_3	208	210	200	25
Titanium_4	182	165	66	32
Titanium_All	-	892	441	116
FastScan_1	-	218	183	105
FastScan_2	-	242	208	103
FastScan_3	-	142	95	45
FastScan_4	-	266	213	77
FastScan_5	-	168	122	68
FastScan_6	-	219	177	66
FastScan_All	-	1260	998	464





Рисунок 4.27 — Типичные ACM-распределения частиц золота по данным, полученных с разных атомно-силовых микроскопов, обработанных в ПО Recognite (A), ПО SiMol методом выделения «оконтуривание» (Б) и ПО SiMol методом выделения «выпуклый анализ» (В)

Как видно из таблицы 4.1 и рисунка 4.27 данные обсчета, полученные ранее использованным в УНУ Авогадро ПО и вновь разработанным совпадают по порядку и по характеру распределений, что свидетельствует о работоспособности разработанного продукта.

В рамках проекта, по ТЗ, разработанному на предыдущем этапе работ, разработано специальное ПО для обработки данных, полученных с помощью молекулярного детектора – АСМ. (п. 4.5. ТЗ-С). Показана работоспособность продукта, тестирование его будет осуществлено на следующем этапе работ по разработанной Программе и методике испытаний. В ходе тестирования будет показано соответствие разработанного ПО пункту 6.1.4.1 ТЗ-С. Соответствие разработанного ПО остальным пунктам п.6.1.4 показано в результате работ на текущем этапе. Работоспособность разработанного ПО показана на примере обработки изображений наночастиц золота – тестовых объектов, имеющих размер того же порядка, что и биомакромолекулы. По результатам электронной микроскопии размеры наночастиц золота составили 10-15 нм, но также наблюдались кластеры золота, где размер наночастиц золота составил 1-3 нм. По данным спектрофотометрии размер золотых частиц составил 16-17 нм. По данным атомносиловой микроскопии основной вклад соответствует частицам высотой 5-10 нм. Уменьшение размера по сравнению с данными ЭМ, предположительно, связано с влиянием поверхности на результаты измерений. Предположение будет проверено на следующем этапе работ. Площадь визуализированных объектов лежала в диапазоне от 0,001 до 0,15 мкм². Объем визуализированных объектов составил 0,00001-0,001 мкм³.

Работы по пункту 2.4 плана-графика выполнены в полном объеме и соответствуют пунктам 5.5, 6.1.4 и 7.1.2.1 технического задания.

5. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ АНАЛИЗА СОДЕРЖАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОПРОВОДНОГО БИОСЕНСОРА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ

В настоящее время идет активная разработка новых подходов к анализу состояния здоровья человека, позволяющих осуществлять диагностику заболеваний на ранней стадии их развития в реальном времени, используя при этом малое количество анализируемого биологического материала. Одним из примеров таких новых подходов являются нанопроводные биосенсоры, качестве сенсорных элементов которых выступают массивы кремниевых нанопроводов. Данные биосенсоры отличаются высокой чувствительностью, производительностью, а также биологической совместимостью.

Основными современными методами лабораторной диагностики в настоящее время являются методы иммуноферментного анализа, полимеразной цепной реакции, а также микробиологические методы. Однако данные методы обладают рядом недостатков, к которым можно отнести высокую стоимость, нестабильность качества коммерческих диагностических наборов, длительное время проведения анализа (вплоть до нескольких часов), а также необходимость наличия специально обученного персонала. Например, метод полимеразной цепной реакции хоть является высокочувствительным диагностическим методом, однако его основным недостатком является длительность анализа исследуемого материала, которая, в зависимости от тест-системы, может составлять около 1 часа.

Таким образом, разработка биосенсоров, позволяющих осуществлять регистрацию единичных патогенных частиц в образцах, полученных из плазмы крови пациентов, в течение короткого промежутка времени (порядка нескольких минут), без использования меток и с высокой концентрационной чувствительностью (ниже фемтомолярной), а также последующая интеграция таких биосенсоров в медицинскую и биомедицинскую практику, позволит осуществить мощный прорыв в предиктивной диагностике и терапии социально-значимых заболеваний, в частности онкопатологий, на ранней бессимптомной стадии их развития.

В связи с этим, в рамках проекта была поставлена задача разработки методики анализа содержания нуклеиновых кислот с использованием нанопроводного биосенсора в биологических образцах. Разработанная методика позволит с помощью

нанопроводного биосенсора осуществлять анализ нуклеиновых кислот в биологических образцах, а именно анализ РНК, выделенной из плазмы крови человека, с субфемтомолярной чувствительностью, временем детекции ~10 мин и с использованием малого количества анализируемого биологического материала (7 мкл).

Согласно пп.5.20, 6.1.11. и 7.1.23 ТЗ, была разработана методика анализа содержания нуклеиновых кислот с использованием нанопроводного биосенсора в биологических образцах.

Разработанная методика предназначена для высокочувствительной детекции нуклеиновых кислот в биологических образцах с низкой концентрацией биомакромолекул с помощью нанопроводного биосенсора. В качестве нуклеиновых кислот выступают РНК, выделенные из образцов плазмы крови человека, ассоциированные с развитием социально-значимых заболеваний, в частности онкологических, выбор которых осуществлялся на основании анализа литературных данных. Экспериментальная часть методики состоит из двух основных частей: операций, выполняемых при подготовке к измерениям, основной из которых является выделение суммарной РНК из образцов плазмы крови человека, и, собственно, самих измерений.

Выделение РНК, является отправной точкой для многих молекулярнобиологических исследований и разработки различных диагностических наборов, и, в том числе, для детекции РНК-биомаркеров с помощью нанопроводного биосенсора. РНК, а также ДНК и белок, можно выделить из любого биологического материала, такого как живые или законсервированные ткани, клетки, вирусные частицы или другие образцы для аналитических или препаративных целей [21]. Чистота и целостность выделенной РНК являются критическими элементами для общего успеха анализа на основе РНК. Использование в работе РНК низкого качества может поставить под угрозу результаты экспериментов, которые могут быть трудоемкими, отнимающими много времени и очень дорогими.

Следует отдельно отметить, что возможность экстрагировать общую РНК высокого качества из образцов замороженной крови человека имеет важное практическое значение как в клинических, так и в исследовательских условиях, когда образцы пациентов часто берутся в то время, когда недоступно или

невозможно проведение немедленных анализов. Это также облегчает ретроспективный молекулярный анализ материала пациентов, хранящегося в биобанках, как для клинических, так и для исследовательских целей.

РНК является нестабильной молекулой и имеет очень короткий период полураспада после выделения из клетки или ткани. Также РНК подвержена деградации, что требует особой осторожности при ее выделении. РНК особенно нестабильна из-за повсеместного присутствия РНКаз, представляющих собой ферменты, присутствующие в крови, во всех тканях, а также в большинстве бактерий и грибов в окружающей среде [22].

Таким образом, чтобы гарантировать приемлемое качество суммарной РНК, процедура экстракции РНК должна соответствовать ряду требований. Во-первых, конечный препарат не должен содержать белков, геномной ДНК или ингибиторов ферментов. Во-вторых, конечный препарат не должен содержать излишек фенола или спирта, который может повлиять на дальнейший эксперимент. Кроме того, очищенная РНК также не должна содержать РНКаз для сохранения целостности при соответствующих условиях хранения.

Существует три основных и относительно простых в исполнении метода, широко используемых для выделения суммарной РНК: технология спин-колонок на основе диоксида кремния и технология магнитных шариков/частиц, которые относятся к твердофазным методам, а также органическая экстракция с использованием растворов на основе тиоцианата гуанидина-фенола-хлороформа. Эти методы были преобразованы в коммерческие наборы, упрощающие процессы экстракции РНК.

Коммерческие наборы для выделения нуклеиновых кислот, относящиеся к твердофазным подходам, основываются на том, что нуклеиновые кислоты, экстрагированные в раствор, поглощаются твердофазным связывающим материалом в хаотропных условиях с последующей отмывкой ненуклеиновых кислот, оставшихся на связывающем материале, с использованием соответствующих буферных растворов и элюированием очищенных нуклеиновых кислот из связывающего материала с использованием слабосолевых растворов. Материалы на основе диоксида кремния в матричной форме (фильтры из стекловолокна или мембраны из диоксида кремния) являются широко используемым материалом для

связывания нуклеиновых кислот, а буферы на основе гуанидина обычно используются для обеспечения хаотропных условий для связывания нуклеиновых кислот [23]. Коммерческие наборы, использующие твердофазный подход, обеспечивают быстрое выделение высококачественных нуклеиновых кислот и широко используются, например, в лабораториях молекулярной биологии. Однако такие коммерческие наборы имеют высокую стоимость.

Твердофазную экстракцию обычно проводят с помощью спин-колонки, работающей под действием центробежной силы [24]. Матрицы диоксида кремния, частицы стекла, диатомовая земля и анионообменные носители используются в данном методе твердофазной экстракции в качестве твердой подложки. Эти соединения, как правило, необходимо кондиционировать с использованием буферных растворов при определенном pH, чтобы преобразовать их в требуемую химическую форму [25]. Спин-колонки на основе диоксида кремния являются одними из часто используемых систем экстракции как PHK, так и ДНК, и позволяют извлекать высококачественные нуклеиновые кислоты без какой-либо органической экстракции. На рисунке 5.1 представлено изображение спин-колонки.



Рисунок 5.1 — Пример спин-колонки (А), внутри которой расположена 2 мл пробирка для сбора образцов (В)

В основе метода лежит свойство нуклеиновых кислот при определенных условиях связываться с силикатами. Это позволяет сепарировать компоненты клетки от частиц силики со связанными нуклеиновыми кислотами. Конструкция спинколонки продумана таким образом, что при нанесении на нее клеточного лизата и дальнейшего центрифугирования, РНК остается на ней, а остальные фрагменты клетки отсеиваются. После этого нуклеиновую кислоту несколько раз промывают, а затем извлекают в пробирку для сбора образца для исследования. Таким образом, четырьмя ключевыми этапами твердофазной экстракции с использованием спинколонок являются лизис клеток, адсорбция нуклеиновых кислот, отмывка и элюирование [23], как показано на рисунке 5.2.



Рисунок 5.2 – Схема протокола выделения нуклеиновых кислот на спин-колонках

Начальным этапом процесса твердофазной экстракции является подготовка колонки к адсорбции образца. Кондиционирование колонки может быть выполнено с использованием буфера с определенным pH для преобразования поверхности или функциональных групп твердого вещества в определенную химическую форму [24]. Затем на колонку наносят образец, разложившийся с помощью буфера для лизиса. Желаемая нуклеиновая кислота будет абсорбироваться на колонке с помощью высокого pH и концентрации соли в связывающем растворе. Другие соединения, такие как белок, также могут иметь сильную специфическую связь с поверхностью колонки. Эти загрязнения могут быть удалены на этапе промывки с использованием промывочного буфера, содержащего конкурирующий агент. На этапе элюирования вводят специальный буфер или воду для высвобождения нужной нуклеиновой кислоты из колонки, чтобы ее можно было собрать в очищенном состоянии [24]. Обычно во время этапов промывки и элюирования в процессе очистки требуется быстрое центрифугирование, вакуумная фильтрация или разделение колонок.

Наиболее часто в спин-колонках используются матрицы на основе диоксида кремния. Принцип экстракции нуклеиновых кислот с использованием этих матриц основан на высоком сродстве отрицательно заряженного остова нуклеиновой кислоты к положительно заряженным частицам диоксида кремния [26]. Натрий играет роль катионного мостика, который притягивает отрицательно заряженный

кислород в фосфатном остове нуклеиновой кислоты. Катионы натрия разрывают водородные связи между водородом в воде и отрицательно заряженными ионами кислорода в диоксиде кремния в условиях высокого содержания солей (pH \leq 7) [27]. Нуклеиновая кислота прочно связана, и обширная промывка удаляет все загрязнения. Очищенные молекулы нуклеиновой кислоты могут быть элюированы при низкой ионной силе (pH \geq 7) позже с использованием специального буфера или дистиллированной воды [26]. Также, следует отметить, что коммерческий набор для выделения PHK с использованием спин-колонок на основе матриц диоксида кремния включает стадию удаления ДНК путем обработки ДНКазой или кислым фенолом.

Однако основным недостатком спин-колонок на основе матриц диоксида кремния является невозможность идеально разделить РНК и ДНК. Также немаловажным недостатком спин-колонок является их стоимость, поскольку их можно использовать только один раз из-за удержания значительного количества материала в матрице диоксида кремния даже после элюирования [28]. Поскольку полная экстракция РНК необходима для многих исследований и диагностических приложений, желательна возможность повторного использования колонок, используемых для этих целей, с помощью короткой процедуры и без дополнительных затрат. Помимо этого, матрица иногда может забиваться, а также минимальный объем элюции составляет 30-50 мкл, что приводит к более низким концентрациям экстрагируемых нуклеиновых кислот.

Другим распространённым методом твердофазной экстракции является метод выделения нуклеиновых кислот с использованием магнитных частиц или шариков. Этот метод включает выделение нуклеиновых кислот из сложных смесей посредством комплементарной гибридизации. Используя этот диспергированный твердофазный подход, магнитные шарики смешивают с большими объемами исследуемого образца. Затем магнитные шарики снова собираются с помощью магнита, а захваченные нуклеиновые кислоты высвобождаются с поверхности шариков в более поддающийся реакции буфер. Покрытие на поверхности магнитных шариков является одним из ключевых моментов этого подхода.

В настоящее время коммерчески доступны многие магнитные носители. Частицы, имеющие магнитный заряд, могут быть удалены с помощью постоянного магнита при приложении магнитного поля. Часто для процесса выделения

используют магнитные носители с иммобилизованными аффинными лигандами или приготовленные из биополимера, проявляющего аффинность к нуклеиновой кислоте-мишени. Например, магнитные частицы, которые производятся из различных синтетических полимеров, биополимеров, пористого стекла или магнитных частиц на основе неорганических магнитных материалов, таких как оксид железа с модифицированной поверхностью. Для связывания нуклеиновых использовать большой кислот предпочтительно материалы с площадью поверхности. Материалы с магнитными частицами, такие как гранулы, более предпочтительны в качестве подложки в процессе выделения из-за их большей связывающей способности. Процессу связывания нуклеиновой кислоты может способствовать нуклеиновая кислота, «оборачивающая» подложку. Магнит можно приложить к стенке сосуда, в котором находится смесь образца, для агрегации частиц у стенки сосуда и элюирования остатка образца [29].

Магнитные шарики, как правило, состоят из одного или нескольких магнитных ядер, таких как магнетит (Fe3O4) или маггемит (гамма-Fe2O3), покрытых матрицей из полимеров, кремнезема или гидроксиапатита с концевыми функционализированными группами [25]. Адсорбция нуклеиновых кислот на кремнеземе в присутствии высоких концентраций хаотропных солей широко используется для извлечения нуклеиновых кислот из сложных матриц образцов в растворы, не содержащие ингибиторов. Кроме того, подвижность магнитных шариков позволяет переносить адсорбированные нуклеиновые кислоты в меньшие объемы и, следовательно, приводит к получению более концентрированных растворов [29].

Таким образом, принцип метода с использованием магнитных шариков основан на связывании нуклеиновых кислот с веществом, которое покрывает магнитные шарики. В лизированный образец добавляют магнитные шарики и перемешивают. Далее фиксируют твердую фазу, поднося пробирки с образцом к магниту или ставя их в магнитный штатив. Наконец, отбирают супернатант (надосадок), а нуклеиновые кислоты промывают и элюируют. Схема протокола выделения нуклеиновых кислот с использованием технологии магнитных шариков показана на рисунке 5.3.



Рисунок 5.3 – Схема протокола выделения нуклеиновых кислот с использованием технологии магнитных шариков

На рынке существует множество наборов для экстракции нуклеиновых кислот с помощью магнитных шариков [30]. Например, один из наборов основан на модифицированной процедуре щелочного лизиса с последующим связыванием нуклеиновой кислоты с магнитными частицами. Магнитный инструмент используется для захвата магнитных частиц со связанной нуклеиновой кислотой, а загрязнители удаляются путем промывки прилагаемым промывочным буфером. Затем нуклеиновую кислоту элюируют с магнитных частиц буфером для элюции [30]. Другой набор для улавливания магнитных частиц используется магнитный стержень, входящий в сосуд с образцами и притягивающий магнитные частицы [31].

Однако, несмотря на все вышеуказанное, данный метод также имеет ряд существенных недостатков. Во-первых, вязкие образцы могут препятствовать движению шариков. Во-вторых, есть вероятность загрязнения образца самими магнитными шариками. Наконец, ручное извлечение магнитных шариков утомительно и подвержено ошибкам, так как необходимо соблюдать осторожность, чтобы не аспирировать магнитные шарики.

Еще одним распространенным методом выделения нуклеиновых кислот является фенол-хлороформная экстракция. Хотя фенол горючая, коррозионная и токсичная карболовая кислота, может быстро денатурировать белки, он не полностью ингибирует активность РНКазы [32]. Эту проблему можно решить, используя смесь фенол:хлороформ:изоамиловый спирт (25:24:1). Белки, липиды, углеводы и клеточный дебрис удаляют экстракцией водной фазы органической смесью фенола и хлороформа [32,33]. При добавлении фенола и хлороформа образуется двухфазная эмульсия. Гидрофобный слой эмульсии затем осаждается на

дно, а гидрофильный слой – наверх путем центрифугирования. Далее собирают верхнюю фазу, содержащую ДНК, которые затем можно осадить из супернатанта добавлением этанола или изопропанола в соотношении 2:1 или 1:1 и высокой концентрации соли. Осадок ДНК собирают центрифугированием, а избыток соли промывают 70% этанолом и центрифугируют, чтобы удалить супернатант этанола [22].

Использование изотиоцианата гуанидиния для экстракции РНК было впервые упомянуто Ulrich et al. (1977). Метод был достаточно трудоемким. Поэтому он был заменен одностадийным методом, известным как экстракция тиоцианатом гуанидиния-фенолом-хлороформом, согласно Chomczynski and Sacchi (1987) [32,33], при котором гомогенат экстрагируется фенолом/хлороформом при пониженном pH. Тиоцианат гуанидиния является хаотропным агентом, используемым при деградации белка. Принцип этого одноэтапного метода заключается в том, что PHK отделяется от ДНК после экстракции кислым раствором, состоящим из тиоцианата гуанидиния, ацетата натрия, фенола и хлороформа [33]. В кислых условиях суммарная PHK останется в верхней водной фазе всей смеси, а ДНК и белки останутся в интерфазе или нижней органической фазе. Затем проводят восстановление суммарной PHK путем осаждения изопропанолом [32].

Таким образом, гуанидин-тиоционат-фенол-хлороформный метод экстракции (англ. acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, AGPC), основанный на использовании специального pearentra для экстракции – кислотного тиоцианата гуанидина-фенола-хлороформа, является одним распространённых методов органической экстракции нуклеиновых кислот [33]. Особенность этого pearentra – быстрое ингибирование активности РНКазы – делает его полным, готовым к использованию и удобным реагентом для выделения суммарной РНК [34]. Немаловажно отметить, что данный метод позволяет выделять как нуклеиновые кислоты, так и белки, из образцов замороженной крови человека.

Принцип гуанидин-тиоционат-фенол-хлороформного метод основан на разделении фаз путем центрифугирования смеси водного образца и раствора, содержащего насыщенный водой фенол и хлороформ, в результате чего образуется верхняя водная фаза и нижняя органическая фаза (в основном фенол). Тиоцианат гуанидиния, хаотропный агент, добавляют к органической фазе, чтобы

способствовать денатурации белков (например, тех, которые прочно связывают нуклеиновые кислоты или те, которые разрушают РНК). Нуклеиновые кислоты (РНК и/или ДНК) распределяются в водной фазе, а белок – в органической фазе. pH смеси определяет, какие нуклеиновые кислоты подлежат очистке [35]. В кислых условиях (pH 4-6) ДНК переходит в органическую фазу, а РНК остается в водной фазе. В нейтральных условиях (pH 7-8) и ДНК, и РНК переходят в водную фазу. На последнем этапе нуклеиновые кислоты выделяют из водной фазы путем осаждения изопропанолом. Схема протокола выделения нуклеиновых кислот с использованием гуанидин-тиоционат-фенол-хлороформный метода экстракции представлена на рисунке 5.4.



Рисунок 5.4 — Схема протокола выделения нуклеиновых кислот с использованием гуанидин-тиоционат-фенол-хлороформный метода экстракции

Гуанидин-тиоционат-фенол-хлороформный метод экстракции широко используется в молекулярной биологии для выделения РНК высокого качества из широкого круга объектов, а также считается «золотым стандартом» среди других методов выделения нуклеиновых кислот [36]. Особенно полезен этот метод в ситуациях, когда клетки или ткани обогащены эндогенными РНКазами или когда отделение цитоплазматической РНК от ядерной РНК нецелесообразно. Этот метод может занять больше времени, чем выделение на спин-колонках (метод экстракции нуклеиновых кислот на частичках диоксида кремния) или магнитных частицах, но имеет преимущество с точки зрения выхода, чистоты и целостности выделенной РНК [23,37,38]. Также следует отметить, что отсутствие в данном методе дополнительных манипуляций с образцами позволяет свести к минимуму вероятность (перекрестного) загрязнения образца.

Таким образом, гуанидин-тиоционат-фенол-хлороформного метод экстракции нуклеиновых кислот, в частности РНК, представляет интерес как для диагностических, так и для исследовательских целей, в том числе и для работы с замороженными образцами плазмы крови человека для молекулярного анализа, а именно для анализа исследуемой РНК с использованием нанопроводного биосенсора. Следует также дополнительно отметить, что метод позволяет выделять из образца плазмы крови человека суммарную РНК, то есть все молекулы РНК (микроРНК, рибосомальную РНК, ядрышковую РНК и многие другие), содержащиеся в образце, что может позволить осуществлять одновременный анализ нескольких РНК-биомаркеров, что крайне перспективно для применения в ранней диагностике онкологических заболеваний.

Для разработки методики анализа содержания нуклеиновых кислот с использованием нанопроводного биосенсора в биологических образцах для выделения суммарной РНК из образцов замороженной плазмы крови человека был выбран гуанидин-тиоционат-фенол-хлороформный метод экстракции. Для возможности применения этого метода был использован набор реагентов ExtractRNA компании «Евроген», Москва, Россия (https://evrogen.ru). ExtractRNA представляет собой однофазный раствор фенола и гуанидин-изотиоционата, который одновременно солюбилизирует биологический материал и денатурирует белок. После солюбилизации добавление хлороформа вызывает разделение фаз, при котором белок экстрагируется в органическую фазу, ДНК распределяется в интерфазе, а РНК остается в водной фазе, как схематично показано на рисунке 5.5. Следовательно, РНК, ДНК и белок можно выделить из одного образца. Последующие этапы выделения РНК включают стадии преципитации РНК 99% изопропанолом и разбавление выделенной суммарной РНК в 75% этаноле.



Рисунок 5.5 – Демонстрация принципа метода выделения РНК, использованного при разработке методики. Обычное разделение фаз с использованием гуанидинтиоционат-фенол-хлороформного метода экстракции, демонстрирующее три слоя. Верхняя водная фаза (РНК), интерфаза (ДНК) и органическая фаза (белок). Затем РНК экстрагируют из водной фазы преципитацией изопропанолом

Далее образец суммарной РНК в 75% этаноле использовался для детекции с помощью нанопроводного биосенсора целевой РНК, ассоциированной с развитием социально-значимых заболеваний, в частности онкопатологий, и выбранной на основании анализа литературных данных. Следует дополнительно отметить, что количество образцов плазмы крови человека, из которых осуществляется выделение суммарной РНК, а также их характеристики (например, пол и возраст пациента, патология, стадия развития патологии и т.д.) задаются при планировании эксперимента. Однако, в эксперименте желательно использовать как минимум два рабочих образца, полученных от пациентов с исследуемой патологией, и два контрольных образца, полученных от условно-здоровых добровольцев и/или от пациентов, страдающих от другой патологии.

Разработка методики анализа содержания нуклеиновых кислот в биологических образцах для проведения электрических измерений проводилась с применением нанопроводного биосенсор, входящего в УНУ Авогадро. Устройство и принцип действия нанопроводного биосенсора подробно описаны в отчете о выполненных работах по реализации проекта за 2021 год «Детекция единичных биомакромолекул как основа предиктивной диагностики и диагностики социальнозначимых заболеваний человека на ранней стадии (УНУ Авогадро, рег. номер 1405855).

Таким образом, детекция ассоциированных с развитием социально-значимых

заболеваний РНК, выбранных на основании литературных данных, осуществляется с использованием нанопроводного биосенсора в режиме реального времени и без использования меток. Перед проведением измерения часть нанопроводов чипа, рабочих, предварительно выбранных В качестве функционализируются молекулярными оДНК зондами, комплементарными исследуемой РНК, выбранной на основании анализа литературных данных. В качестве контрольных нанопроводов выступают нанопровода, модифицированные оДНК-зондами, некомплементарными исследуемой РНК, или не модифицируется ничем (контрольные нанопровода). Количество рабочих и контрольных нанопроводов задается исследователем при планировании эксперимента. Следует также отметить, что ввиду того, что нанопроводный чип имеет на своей поверхности массив из 10-ти нанопроводов, то сенсибилизировать чип 10 различными оДНК-зондами, возможно комплементарными различным исследуемым РНК, используя при этом минимум 2 нанопровода в качестве контрольных.

Разработанный в методике анализа содержания нуклеиновых кислот в биологических образцах принцип анализа выглядит следующим образом. В кювету вносят образец, содержащий суммарную РНК, выделенную из плазмы крови человека. В процессе регистрации происходит биоспецифическое связывание целевых детектируемых молекул с молекулярными оДНК-зондами на поверхности нанопроводов, которые комплементарны исследуемой РНК, выбранной на основании литературных данных и ассоциированной с развитием, например, онкопатологии. С помощью программного обеспечения PowerGraph 3.3 Professional осуществляется в реальном времени регистрация сигнала с массива нанопроводов, который отображается в графическом виде на мониторе персонального компьютера.

Как указано выше, в методике анализа содержания нуклеиновых кислот в биологических образцах регистрацию исследуемых РНК осуществляют в режиме реального времени «Ids(t)», то есть в режиме регистрации зависимости величины тока стока-истока (Ids) от времени (t) при постоянном напряжении на затворе (Vg). В этом режиме перед началом эксперимента задают постоянное рабочее напряжение сток-исток (Vds) и постоянное рабочее напряжение на затворе (Vg). Далее осуществляется сборка нанопроводного биосенсора: устанавливают кювету, дном которой является нанопроводный чип с массивом нанопроводов, мешалку (скорость

перемешивания раствора составляет ~3000 об/мин), а также перистальтический насос со стерильными поливинилхлоридными трубками для забора образца и промывки нанопроводного чипа. Далее в кювету вносят 100 мкл рабочего 1 мМ калий-фосфатного буфера. Непосредственно сами измерения проводятся при добавке в кювету 7 мкл анализируемого раствора, содержащего суммарную РНК, выделенную из плазмы крови человека, а также при замене в кювете анализируемого раствора на отмывочный 1 мМ калий-фосфатный буфер. Заземленный платиновый электрод, погруженный в раствор измерительной кюветы, используется для повышения стабильности работы системы.

Схема измерения анализируемого раствора, содержащего суммарную РНК, выделенную из плазмы крови человека, выглядит следующим образом. В кювету биосенсора добавляют 100 мкл 1 мМ КФБ и в течение 10 мин прописывают базовую линию. Далее в кювету к 100 мкл 1 мМ КФБ добавляют 7 мкл анализируемого раствора суммарной РНК и также осуществляют регистрацию сигнала в течении 10 мин. Затем с помощью перистальтического насоса 107 мкл раствора откачивают из кюветы и 3 раза промывают кювету 100 мкл 1 мМ КФБ. На последнем этапе в кювету добавляют 100 мкл отмывочного 1 мМ КФБ и осуществляют регистрацию сигнала в течение 5 мин. Таким образом, объем биологического образца для анализа составляет 7 мкл, что соответствует пункту № 6.1.11.2. ТЗ. Контрольный эксперимент осуществляют аналогичным образом, однако вместо анализируемого раствора суммарной РНК в кювету добавляют 7 мкл 1 мМ КФБ. После каждого цикла буфер/раствор суммарной РНК проводится отмывка поверхности чипа 50 мл деионизированной воды (60-70°C) для регенерации сенсорной поверхности [39]. Для контрольного и рабочего эксперимента обычно проводится около трех технических повторов. Схематично цикл измерения как для контрольного, так и для рабочего эксперимента, представлен на рисунке 5.6.



Рисунок 5.6 – Схема цикла измерения с помощью нанопроводного биосенсора с чипом п-типа проводимости. А. Контрольный эксперимент с 1 мМ КФБ. В. Рабочий эксперимент с анализируемым раствором суммарной РНК, выделенной из плазмы крови человека. Обозначения: (1) – прописывание базовой линии; (2) – регистрация сигнала, полученного после добавки в кювету буфера (в случае контрольного эксперимента) или анализируемого раствора суммарной РНК (в случае рабочего эксперимента); (3) – отмывка буфером

В методике анализа содержания нуклеиновых кислот с помощью нанопроводного биосенсора в биологических образцах время регистрации молекул анализируемого раствора суммарной РНК составляет 10 мин. Данное время регистрации было выбрано с целью сделать анализ менее продолжительным. Следует отметить, что, согласно литературным данным, после 10 мин сигнал должен увеличиваться и в итоге выйти на насыщение, что также подтверждается в работах [40,41].

Таким образом, с помощью нанопроводного биосенсора осуществляется детекция молекул РНК, ассоциированных с развитием социально-значимых заболеваний, в частности онкологических, и которые выбираются на основе анализа литературных данных. Продолжительность каждого измерительного цикла составляет не более 1 часа, что соответствует п.6.1.11.2 ТЗ, а время регистрации анализируемых молекул занимает 10 мин. Следует отметить, что это значительно меньше времени, требуемого других молекулярно-биологических методов [42].

Полученные в результате эксперимента данные представляют в виде сенсограмм – графиков зависимости величины тока (Ids) от времени эксперимента (t). Зарегистрированные изменения уровня тока (Ids) от каждого нанопровода нормализуют к 1 путем деления на начальное значение тока. Для учета неспецифических взаимодействий, значения, полученные в контрольном

эксперименте (т.е. с использованием чистого 1 мМ КФБ), вычитают из абсолютных данных, полученных во время анализа растворов суммарных РНК, полученных в результате выделения из образцов плазмы крови человека. Таким образом, полученные в ходе вышеперечисленных действий зависимости текущего сигнала от времени Ids(t) представляют в виде сенсограмм, отображающих дифференциальный сигнал, рассчитанный путем вычитания сигнала, полученного от контрольных нанопроводов, из сигнала, полученного от рабочих нанопроводов. Для каждой кривой далее рассчитываются значения стандартного отклонения и строятся полосы погрешностей.

В рамках проекта согласно п 2.5 ПГ и пунктам 5.20, 6.1.11. и 7.1.23 ТЗ, была разработана Методика анализа содержания нуклеиновых кислот с использованием нанопроводного биосенсора в биологических образцах. Документ входит в пакет отчетной документации: файл «Пункт_ПГ-2.5-Методика_нукл_кислоты». Данная методика позволяет осуществлять детекцию РНК, ассоциированных с развитием социально-значимых заболеваний, в частности онкологических, и выбранных в результате анализа литературных данных. Разработанная методика, согласно пункту № 6.1.11 ТЗ, предназначена для высокочувствительной детекции нуклеиновых кислот в разбавленных биологических образцах и обеспечивает:

- выделение суммарной РНК из образцов плазмы крови человека;

- время проведения анализа, а именно цикла измерений буфер/образец суммарной РНК, составляет не более 1 часа;

- время анализа непосредственно исследуемой РНК составляет 10 минут;

- объем биологического образца для анализа, а именно анализируемого раствора суммарной РНК, выделенной из плазмы крови человека, составляет 7 мкл;

 количество определяемых аналитов, а именно анализируемых растворов суммарной РНК, выделенной из плазмы крови пациентов, с помощью нанопроводного биосенсора, составляет не менее 4-х;

- наличие контрольных измерений: контроль 1 мМ калий-фосфатным буфером проводится каждый раз перед измерением анализируемого раствора суммарной РНК, также в качестве контроля выступают образцы, полученные от условноздоровых добровольцев и/или пациентов, страдающих от другой нецелевой патологии.

Работы по пункту 2.5 плана-графика выполнены в полном объеме и соответствуют пунктам 5.20, 6.1.11 и 7.1.23 технического задания.

6. РАЗРАБОТКА СПЕЦИАЛЬНОГО ПО ДЛЯ ОБРАБОТКИ ДАННЫХ, ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДЕТЕКТОРА – НАНОПРОВОДНОГО ДЕТЕКТОРА

Обоснование необходимости разработки специального ПО для обработки полученных при анализе анализируемых растворов с помощью данных, нанопроводного детектора (НП-детектора) подробно описано на предыдущем этапе работ при разработке ТЗ на специальное ПО. Коротко, специальное ПО предназначено для регистрации сигнала от множества каналов детектора и интерпретации полученных результатов. На сегодняшний день в состав УНУ «Авогадро» входит НП-детектор с аппаратной возможностью регистрации сигнала от двух чипов, содержащих 10 сенсорных элементов каждый (сенсорный элемент – нанопровод (НП)). Разрабатываемое ПО, должно предоставлять проводить измерения с использованием, как минимум 20-ти каналов, но архитектура ПО должны предусматривать перспективу развития до возможности регистрации 960 каналов. Перспективность формата молекулярного детектора с 96 ячейками, содержащими 10 сенсорных элементов каждый, подробно обсуждался в отчёте за первый этап проекта. Коротко – 10 сенсорных элементов на одном кристалле обеспечивает мультиплексность анализа одного образца, увеличение ячеек для одновременного анализа позволяет увеличить производительность анализа и обеспечить выполнение анализа одновременно для нескольких проб.

Дизайн эксперимента по обнаружению биомакромолекул с помощью НП (подробно описан в отчете за предыдущий этап работ) предусматривает использование одного из десяти НП, находящихся на кристалле, в качестве опорного для сравнения сигналов с других НП. Одной из проблем является технологическая сложность и дороговизна получения НП с близкими характеристиками. Электрические характеристики НП различны, и при одинаковом воздействии на них дают сигналы разного уровня. Это обстоятельство не позволяет достаточно точно интерпретировать данные, полученные с нанопроводного детектора, затрудняет математическую обработку.

Разработка специального ПО для обработки данных, полученных с помощью молекулярного детектора – нанопроводного детектора проводилась сотрудниками Общества с ограниченной ответственностью «РИКО-мед» (ООО «РИКО-мед», ИНН

7727738227) по Договору № 13/223 от 7 апреля 2022 г. на выполнение научноисследовательских работ. Основой ТЗ Договора являлось ТЗ, разработанное в рамках работ по Соглашению на первом этапе (представлено в составе отчетной документации за первый год исполнения Соглашения). Привлечение ООО «РИКОмед» именно в формате НИР потребовалось по следующей причине. Сотрудниками ИБМХ (Галиуллин Р.А. и Иванов Ю.Д.) ранее было предложено обратить внимание на то, что измеряемый сигнал определяется не только характеристиками нанопровода, а также другими элементами электрической цепи, такими как усилители, аттенюаторы, фильтры, АЦП. На основании этой идеи было предложено решение адаптировать весь электронный тракт канала измерения к характеристикам НП так, чтобы сигналы со всех каналов одной ячейки имели равное значение при равном воздействии детектируемых частиц на НП. Реализация этого решения лежит в основе разрабатываемого ПО и потребовала работы не только программистов, но и проведение исследований в области схемотехники. Подробно состав выполненных работ описан в отчете по Договору с ООО «РИКО-мед», который будет предоставлен в 1-м квартале 2023 года. Задержка сдачи работ по Договору, которые должны были быть выполнены до конца 2022 года) вызваны обстоятельствами, подробно описанными в письме генерального директора ООО «РИКО-мед», направленному в ИБМХ 14 декабря 2022 года. Коротко, причины задержки сдачи ПО следующие:

Программное обеспечение разрабатывалось с использованием ПО Microsoft Visual Studio на базе системного API Windows. В июле 2022, ввиду активной санкционной политики западных стран в отношении РФ, в том числе в области программного обеспечения, и из-за опасений введения блокировок на программное обеспечение Microsoft было принято решение изменить используемый стек решений и перевести разработку на Opensource ПО с использованием компилятора gcc с поддержкой кросс-платформенности, а также включить в использование фреймворк wxWidgets, поддерживающий кроссплатформенность по части интерфейса и сервисных функций.

Переход на данный технологический стек потребовал дополнительных временных трудозатрат в связи с необходимостью проверок и подбора безопасных версий компилятора и фреймворка, а также полной переработки всего кода ПО.

При адаптации ПО на новый технологический стэк и АЦП ЛА2-USB, нами были выявлены выраженные проблемы взаимодействия ПО с периферийным устройством АЦП. Проблемы выражались в нестабильной работе АЦП и получении малопредсказуемых результатов (данных) с устройства.

Принято решение в октябре перейти на АЦП от L-Card E14-440, имеющую в своем составе богатую документацию, широкий SDK с поддержкой кроссплатформенности, а также активную и отзывчивую техническую поддержку. Данный переход также занял дополнительные временные трудозатраты.

На момент составления отчетной документации по проекту от ООО РИКОмед» в ИБМХ направлена текущая версия пакета Программной документации, которая представлена в данном отчете в виде отдельных документов (файлы с названием «Пункт_ПГ-2.6-ххх», где «ххх» краткое название документа). Далее, после финальной приемки работ будут предоставлены финальные версии документов.

Ниже описаны основные блоки работы по разработки ПО и полученные результаты по состоянию на конец отчетного периода – декабрь 2022 года. Для описания работ используются ссылки на ТЗ Договора с ООО «РИКО-мед», обозначенное как «ТЗ-Д».

6.1. Выбор инструментов для разработки программы.

Аппаратная часть – модифицированный прибор ИС- 20СД для работы с двумя нанопроводными ячейками с десятью нанопроводами в каждой ячейке. Описание модификации, которые потребовались в ходе выполнения НИР описаны ниже (подраздел 6.2).

Программная часть – компилятор gcc версии 10.3.0 для windows. Кроссплатформенный компилятор со свободно распространяемой лицензией. Фреймворк wxWidgets – свободно распространяемый фреймворк для реализации GUI. Поддерживает кроссплатформенность – программа легко портируется на ОС Linux. Дистрибутив платформы и инструкция по установке расположены прилагаемом FLASH накопителе.

6.2. Модификация прибора ИС-20СД – нанопроводного детектора в составе УНУ Авогадро

Для реализации п.5.1.1.1 ТЗ-Д разработаны и изготовлены платы Unit2 ver-2, Unit4ver-2, включающие в себя Сумматор 1, Умножитель, Сумматор 2, БП ver-2 и блок термостабилизации. Интеграция плат в измерительный блок НП-детектора отражено на рисунке 6.1.



Рисунок 6.1 – Модификация прибора ИС-20СД с помощью разработанных дополнительных плат – схема

6.2.1. Разработка и создание блока стабилизации температуры.

Стабилизация температуры происходит таким образом, что температура платы усилителей и НП ячейки выше температуры окружающей среды. Т.е. стабилизатор температуры работает только в режиме нагревания. Блок – схема и принципиальная схема стабилизатора приведены на рисунке 6.2 и 6.3. При понижении температуры ниже заданной опорным напряжением, напряжение на выходе «Датчик температуры» становится ниже опорного напряжения и включается нагреватель. При достижении заданной температуры нагреватель отключается.

Текущее значение температуры выводится на экран компьютера и отслеживается программой. Датчик температуры вырабатывает напряжение, пропорциональное температуре °C (для датчика LM 35 Vout=10mV*°C, поэтому, например, при температуре датчика 35°C его выходное напряжение Vout=0,350 V).



Рисунок 6.2 – Блок-схема стабилизатора температуры



Рисунок 6.3 – Принципиальная схема стабилизатора температуры
6.2.2. Разработка и создание схемы для установки сигнала равным нулю.

Из-за различий параметров комплектующих деталей прибора, значения Сигнала для разных каналов при Vsd=0 и Vg=0 могут иметь (и фактически имеют) ненулевые значения. Для обнуления сигнала в этом случае необходим Сумматор 1, который служит для приведения к нулю Сигнала при Vsd=0 и Vg=0. Суммирование осуществляется суммирующими усилителями на операционных усилителях. Принципиальная схема Сумматора и его блоков приведены на рисунках 6.5 и 6.6.



Рисунок 6.4 – Принципиальная схема Сумматора 1, для установки нуля канала измерения. Применяются микросхемы цифровых потенциометров AD 5206. Управление потенциометрами осуществляется микропроцессором ATmega 328P (плата Arduino NANO)



Рисунок 6.5 – Принципиальная схема управления шестью микросхемами потенциометров AD5206 микропроцессором ATmega 328P в составе блока сумматора

6.3. Разработка программного обеспечения

6.3.1. Создание среды программирования

Для создания среды программирования были выбраны инструменты со свободно распространяемыми лицензиями. Компилятор gcc версии 10.3.0 для windows. Кроссплатформенный компилятор со свободно распространяемой лицензией. Фреймворк wxWidgets – свободно распространяемый фреймворк для реализации GUI. Поддерживает кроссплатформенность – программа легко портируется на OC Linux. Дистрибутив среды программирования и инструкция по её установке расположены в каталоге /_distributive прилагаемого к настоящему документу FLASH накопителя.

6.3.2. Алгоритм обработки напряжения с нанопроводного детектора.

Алгоритм был разработан для согласования работы устройства, и подпрограммы, реализующие соответствующие функции. Обобщённая блок- схема программы приведена на рисунке 6.6. Каждому элементу блок-схемы соответствует своя подпрограмма. По состоянию на конец 2022 года были разработаны все требуемые подпрограммы и продемонстрирована их работоспособность, результаты этих работ описаны в разделах ниже.



Рисунок 6.6 – Блок-схема алгоритма обработки сигналов напряжения с нанопроводного детектора

6.3.3. Подпрограмма - программная оболочка

Управление программой осуществляется через программную оболочку. При этом запускается подпрограмма _distributive\Project0721\build\Debug\project0721.exe. Текст подпрограммы project0721.exe находится в папках _distributive\Project0721\include, _distributive\Project0721\src и _distributive\Project0721\res.

Установка параметров (Для реализации п.5.1.1.1-а ТЗ-Д)

Для установки параметров запускается подпрограмма _distributive\spod\build\Debug\spod.exe. Интерфейс подпограммы приведен на рисунке 6.7. Текст подпрограммы spod.exe находится в папках _distributive\spod\src, _distributive\spod\res.

🗉 Специальное программное обеспечение диагностики — 💷 🛛 🛛							
Начальный буфер залит							
Введите параметры							
Загрузить параметры из файла Загрузить параметры вручную							
Файл настроек: <настройки по-умолчанию>							
Самодиагностика системы Обновить							
1 Установленные параметры: 2 dvg=0.1 3 ig=13 4 igmax=2 5 imax=1 6 jmax=10 7 n1p=10 8 n2p=5 0 ±0=10							
Старт измерения							
Измерение тока затвора							
Установить Isd=0 Продолжить							
Регистрация SDG							

Рисунок 6.7 – Интерфейс подпрограммы для установки параметров

При нажатии кнопки «Загрузить параметры вручную» открывается окно для заполнения параметров (рисунок 6.8). Введённые параметры сохраняются в файле, из которого их можно загрузить, нажав кнопку «Загрузить из файла».

📧 Параметры	and a		×
Параметры нанопровода			^
Количество ячеек (imax) 1			
количество НП в ячейке (jmax) 10 🔆			
Максимальное напряжение на затворе (Vgmax), В 15	<u>.</u>		
Паспортное значение напряжения исток-сток (Vsdp), В о	.10	• •	
Максимально допустимое значение тока затвора (Igmax),	B 2.00	<u>, </u>	
Температура ячейки (Tmp1), С° 30 📩			
Отклонение Tmp1 от номинального значения (n1p), % 10			
Температура входных усилителей (Tmp2), С° 35 📩			
Отклонение Tmp2 от номинального значения (n2p), %	; <u>.</u>	1	
Параметры измерения			
Шаг изменения Vg, (ΔVg), В 0.02 💌			
Напряжение на затворе Vg, В 0.0			
Напряжение исток-сток (Vsd), В 0.00			J

Рисунок 6.8 – Окно загрузки параметров

6.3.4. Подпрограмма для самодиагностики прибора

реализации п.5.1.1.1-в ТЗ-Д был разработан блок Для ПО для самодиагностики детектора. Самодиагностика прибора начинается после нажатия «Начать измерения». При запускается кнопки ЭТОМ подпрограмма _distributive\Project0721\build\Debug\project0721.exe, которая анализирует значения питающих напряжений и температуру платы входных усилителей и корпуса нанопроводной ячейки. Текст подпрограммы project0721.exe находится в папках _distributive\Project0721\include, \distributive Project 0721 src И _distributive\Project0721\res. Дальнейшая работа программы возможна, если все значения в пределах допустимого (значения допустимого будут установлены в ИБМХ при тестировании ПО).

• Эксперимент	-		×
Проект			
Размещение проекта Browse dRate 0.000 + dCadr 0.000 +			
АЦП			
Частота (Гц, на канал) 100 🛉 Усиление 1 (+/- 10В) 🕶 Режим Однополюсный	-	*	
Кол-во нанопроводов (nw[n]) 10 📩 Канал затвора нанопровода (Vg/100) 11 🗐			
Выводы			
Напряжение затвора (Vg/100) 1279 Напряжение стои-исток (Vsd) 1386 Ток затвора (lg) 1493			
+2.5 B/2 1600 -2.5 B/2 1707 +2.5 B1/2 1815 -2.5/2 B1 1922 +5B/4 2026 -5B/4 2133			
-12 B/10 2242 -12 B/10 2348 +50 B/100 2456 -50 B/100 2562 Tmp1/4 2670 Tmp2/4 277	7		
Единици измерения: • Отсчеты АЦП С Вольты 🗏 Вольты по алгоритму 2 (n*1.253/1000)			
Параметры эксперимента			
Длительность эксперимента 0:00:03 👗 🗖 Непрерывно			
Комментарий к эксперименту			
🗆 Отобразить итоговые графики в одном окне			
Запуск Отмена			
D			
Время: 00:00:00			

Рисунок 6.9 — Отображение этапа контроля питающих напряжений и температуры

6.3.5. Подпрограмма для контроля тока затвора нанопроводных ячеек

Для реализации п.5.1.1.1-а ТЗ-Д был разработан блок ПО для контроля тока затвора, в результате запускается подпрограмма project0721.exe. Текст подпрограммы project0721.exe находится в папках _distributive\Project0721\include, _distributive\Project0721\src и _distributive\Project0721\res.

Для контроля тока затвора: устанавливается напряжение затвора на максимально допустимое значение Vg=Vgmax и проверяется ток затвора. Если ток затвора больше допустимого значения Igmax, то ячейка не используется.

6.3.6. Установка параметров измерения

Для установки параметров измерений запускается подпрограмма project0721.exe. Текст подпрограммы project0721.exe находится в папках _distributive\Project0721\include, _distributive\Project0721\src и _distributive\Project0721\res.

Для перехода к измерению сигнала в окне «Эксперимент» устанавливается значение в окнах «Частота (Гц на канал)», «Длительность эксперимента», «Количество нанопроводов», «Канал затвора» и нажимается кнопка «Запуск». Визуализируются гистограммы сигнала каждого канала.

6.3.7. Установка нулевого значения сигнала при Vg=0 и Vsd=0

Для реализации п.5.1.1.2-6 ТЗ-Д был разработан блок ПО – подпрограмма для установки нулевого сигнала при Vg=0 и Vsd=0. Микросхемы с потенциометрами впаяны в соответствующие каналы регистрации прибора (см. Таблица 6.1). Программное назначение потенциометров изменить невозможно. Для выполнения каждой из функций «Коррекция нуля входных усилителей», «Коэффициент усиления», «Добавление постоянной» используется две микросхемы с шестью потенциометрами в каждой микросхеме: шесть потенциометров одной микросхемы и четыре потенциометра второй микросхемы, т.е. 10 потенциометров для 10 каналов.

При этом запускается подпрограмма serialc. Текст подпрограммы serialc находится в папках _distributive\serialc\include, _distributive\serialc\res, _distributive\serialc\res,

Необходимые операции для установка нулевого значения сигнала при Vg=0 и Vsd=0 следующие:

7. устанавливаем Vg=0 и Vsd=0;

 настраиваем ноль выходного каскада усиления: устанавливаем коэффициенты усиления всех каналов равным нулю «Коэффициент усиления» =0 для всех каналов.
Эта операция позволяет заземлить входы выходных каскадов прибора, а поэтому и выходные сигналы должны быть равны нулю;

9. компенсируем выходной сигнал с помощью «Сумматора 2» подобрав соответствующее напряжение потенциометрами «Добавление постоянной».

10. устанавливаем «Коэффициент усиления» =1, и подбором потенциометров «Коррекция нуля входных усилителей», добиваемся, чтобы выходной сигнал был равен нулю;

11. сохраняем значения «Коррекция нуля входных усилителей» и «Добавление постоянной» в файл.

В Таблице 6.1 приведён пример установки значений потенциометров для получения нулевого Сигнала при Vsd=0 и Vg=0.

Cuchta												
Коррекция нуля входных			Коэффициент усиления			Добавление постоянной						
3-я	кана	<u>4-я</u>	канал	5-я	кан	6-я	ка	1-я	канал	2-я	канал	
мксх	Л	мксх.	Runtun	мкс	Rull	мксхем	Н	мксх	numun	мксх	Runan	
				x.		а						
20	1 (131}	30	7 (129)	40	1	50	7	00	7 (136)	10	1	
											(136)	
21	2 (127)	31	8 (128)	41	2	51	8	01	8 (136)	11	2	
											(138)	
22	3 (128)	32	9 (126)	42	3	52	9	02	9 (137)	12	3	
											(136)	
23	4 (130)	33	10 (130)	43	4	53	10	03	10 (136)	13	4	
											(142)	
24	5 (132)	34	НИ	44	5	54	НИ	04	ни	14	5	
											(136)	
25	6 (131)	35	НИ	45	6	55	ни	05	ни	15	6	
											(137)	

Таблица 6.1 – Пример установки значений потенциометров для получения нулевого Сигнала при Vsd=0 и Vg=0

*В скобках указано значение потенциометра для получения нулевого Сигнала при Vsd=0 и Vg=0 для ячейки с условным номером 3.1.

Подпрограмма serialc предназначена для загрузки, сохранения и повторной загрузки значений потенциометров, определяющих состояние каждого канала измерения. Управление значениями потенциометров осуществляется микропроцессором ATmega 328P (Плата Arduino NANO) (рисунок 6.10). Для сохранения состояния потенциометров в файл. после того, как элементами 3, 4 и 5 (см рисунок) будут установлены необходимые состояния, необходимо нажать на кнопку «сохранить». В диалоговом окне выбрать каталог и задать имя файла с расширением ini. Например, «test1.ini»



Рисунок 6.10 — Подпрограмма serialc для ввода, сохранения в файл и загрузки из файла значений цифровых потенциометров. Назначение элементов: (1) Окно контроля параметров и ошибок; (2) Окно выбора порта с подключенным устройством Arduino; (3) Номер микросхемы. Поддерживается множественный выбор; (4) Номер потенциометра в микросхеме. Поддерживается множественный выбор; (5) Значение, которое будет записано в выбранные микросхемы и потенциометры; (6) Кнопка отправки значений в Arduino и запоминания в таблице состояний; (7) Кнопка загрузки файла настроек; (8) Кнопка сохранения настроек состояний в файл; (9) Кнопка отправки таблицы состояний всех потенциометров всех микросхем в Arduino; (10) Таблица состояний (для контроля)

6.3.8. Регистрация сигнала

Для реализации п.5.1.1.2-б ТЗ-Д был разработан блок ПО – подпрограмма для регистрации сигнала с НП. Функция реализована в подпрограмме Project0721. Текст подпрограммы Project0721 находится в папках _distributive\Project0721\include, _distributive\Project0721\src и _distributive\Project0721\res. На момент составления отчетной документации показано, что подпрограмма Project0721 предназначена для регистрации, анализа, обработки и визуализации сигнала, полученного из прибора АЦП-ЦАП E14-440D. Однако существует несоответствие ТЗ-Д, которое заключается в следующем: не реализован вывод сигнала на экран в реальном времени и этот недостаток не позволяет контролировать измерение в его ходе. В текущем варианте подпрограммы сигнал выглядит в виде, приведенном на рисунке 6.11.

🗉 Гистограммы	- 0	Х
Репер: 897	2700.00000	
Сигнал: 108.000000 Сигнал: 217.000000	2591.000000	
Сигнал: 324.000000	2484.000000	
Сигнал: 540.000000	2375.00000	6.00
Сигнал: 650.000000	2267.00000	
Сигнал: 866.000000	2161.000000	
Сигнал: 1080.000000	2052.00000	
Сигнал: 1296.000000	1045.000000	5.00
Сигнал: 1403.000000	1945.000000	
Сигнал: 1619.000000 Сигнал: 1728.000000	1838.000000	
Сигнал: 1838.000000	1728.00000	
Сигнал: 2053.000000	1619.000000	4.00
Сигнал: 2161.000000	1511.000000	
Сигнал: 2375.000000	1405.000000	
Сигнал: 2591.000000	1296.000000	-
Curran. 2700.00000	1189.000000	3.00
	1080.000000	
	973.000000	
	866.000000	
	757.000000	2.00
	650.000000	
	540.000000	
	433.000000	
	324,000000	_100
	217,00000	
	108 00000	
	108.000000 X=89	7

Рисунок 6.11 – Отображение сигнала НП в разработанной подпрограмме специального ПО

6.3.9. Измерение сток затворных характеристики нанопроводов (СЗХ)

Для реализации п.5.1.1.2 ТЗ-Д был разработан блок ПО – подпрограмма для измерения СЗХ (англ. SDG- Souce- Draine – Gate). На момент составления отчета выявлены следующие несоответствия ТЗ-Д:

1. Нет автоматической регистрации C3X (п.5.1.1.2-г Т3-Д). Измерение НП должно происходить автоматически с заданным шагом изменения напряжения на затворе и заданном времени. Это не реализовано. Оператор вынужден измерять C3X в ручном режиме в режиме «Эксперимент» и вводить в п.18 в разделе «Тесты».

2. Расчётные значения коэффициентов усиления (КУ) не загружаются автоматически.

В текущей версии подпрограммы после измерения получаем значения C3X в виде текстового файла, пример приведен на рисунке 6.12. В подпрограмме

реализовано различные функции «сглаживания» полученных зависимостей СЗХ (рисунок 6.13). Сглаживание необходимо для определения точки перегиба графика СЗХ и нахождения оптимальной точки измерений (точка перегиба определяется с помощью математической функции производной). Данная функция сглаживания, предложенная разработчиками ПО в ходе выполнения НИР, необходима, так как реальный сигнал, регистрируемый с НП, зашумлен, растёт не монотонно, что приводит к тому, что производная имеет вид шума. Пример СЗХ после загрузки приведен на рисунке 6.14. Пример СЗХ до и после сглаживания приведен на рисунках 6.15 и 6.16.

C3X_	2022.03.16 - Блокно	т									- 🗆 ×
Файл Г	Правка Формат Ви	ид Справка									
ø	0,1416037	0,1355001	0,1733425	0,1831083	0,2697795	0,1355001	0,140383	0,1989776	0,1953155	0,1318379	9,765029E-02 ^
0,01	0,1367208	0,1355001	0,1782254	0,1770047	0,2758831	0,1342794	0,1355001	0,1989776	0,1965362	0,1281758	9,765029E-02
0,02	0,1379416	0,1379416	0,1757839	0,1733425	0,2710002	0,1293965	0,1379416	0,1940948	0,1904326	0,1342794	9,765029E-02
0,03	0,1355001	0,1330587	0,170901	0,1794461	0,2685588	0,1330587	0,1379416	0,1965362	0,192874	0,1318379	9,765029E-02
0,04	0,1355001	0,1342794	0,1757839	0,1745632	0,2722209	0,1318379	0,1330587	0,2001984	0,1892119	0,1281758	9,765029E-02
0,05	0,1367208	0,1379416	0,1733425	0,1733425	0,2685588	0,1269551	0,1367208	0,1940948	0,1892119	0,1330587	9,765029E-02
0,06	0,1391623	0,1318379	0,170901	0,1794461	0,2697795	0,1318379	0,1342794	0,1989776	0,1940948	0,1281758	9,765029E-02
0,07	0,1330587	0,1367208	0,1733425	0,1721218	0,2758831	0,1293965	0,1306172	0,1989776	0,1940948	0,1269551	9,765029E-02
0,08	0,1367208	0,1355001	0,170901	0,1757839	0,2685588	0,1293965	0,1379416	0,1940948	0,1892119	0,1330587	9,765029E-02
0,09	0,1367208	0,1318379	0,1721218	0,1733425	0,2673381	0,1367208	0,1355001	0,1989776	0,1953155	0,1269551	9,765029E-02
0,1	0,1330587	0,1367208	0,1794461	0,1721218	0,2685588	0,1293965	0,1330587	0,1965362	0,1953155	0,1281758	9,765029E-02
0,11	0,1379416	0,1355001	0,1696803	0,1745632	0,2673381	0,1318379	0,1367208	0,1953155	0,1904326	0,1318379	0,1025328
0,12	0,1379416	0,1318379	0,1721218	0,1782254	0,2697795	0,1342794	0,1367208	0,2001984	0,1965362	0,1281758	0,1025328
0,13	0,1355001	0,1379416	0,1782254	0,1733425	0,2710002	0,1306172	0,1342794	0,1989776	0,1940948	0,1281758	0,1025328
0,14	0,140383	0,1367208	0,1721218	0,1770047	0,2685588	0,1330587	0,140383	0,1965362	0,192874	0,1293965	0,1025328
0,15	0,1367208	0,1330587	0,170901	0,1794461	0,2710002	0,1293965	0,1342794	0,2014191	0,1953155	0,1269551	0,1074153
0,16	0,1379416	0,140383	0,1721218	0,1745632	0,2771038	0,1306172	0,1355001	0,1989776	0,1965362	0,1318379	0,1074153
0,17	0,140383	0,1367208	0,1721218	0,1806668	0,2697795	0,1318379	0,140383	0,1989776	0,1916533	0,1342794	0,1074153
0,18	0,1379416	0,1355001	0,1733425	0,1794461	0,2722209	0,1367208	0,1355001	0,2038605	0,1977569	0,1293965	0,1122978
0,19	0,1367208	0,1440452	0,1757839	0,1757839	0,2734417	0,1306172	0,1367208	0,1977569	0,1977569	0,1318379	0,1122978
0,2	0,1489281	0,1391623	0,1745632	0,1818875	0,2722209	0,1379416	0,1367208	0,2014191	0,1965362	0,1355001	0,1122978
0,21	0,140383	0,1391623	0,1794461	0,1806668	0,2771038	0,1391623	0,1367208	0,2026398	0,2050813	0,1330587	0,1171803
0,22	0,140383	0,140383	0,1806668	0,1794461	0,2771038	0,1355001	0,1416037	0,2014191	0,1965362	0,1355001	0,1171803
0,23	0,1440452	0,140383	0,1757839	0,184329	0,2722209	0,140383	0,1428244	0,2026398	0,1989776	0,1355001	0,1220629
0,24	0,1428244	0,140383	0,1794461	0,1831083	0,2771038	0,1416037	0,1391623	0,2026398	0,2038605	0,1355001	0,1220629
0,25	0,1452659	0,1416037	0,1818875	0,1806668	0,2783246	0,1379416	0,1416037	0,2014191	0,2001984	0,140383	0,1220629
0,26	0,1440452	0,1416037	0,1782254	0,1867704	0,2746624	0,1452659	0,1477073	0,2050813	0,2026398	0,1379416	0,1269454
0,27	0,1440452	0,1440452	0,1855497	0,184329	0,2795453	0,1428244	0,140383	0,2075227	0,2001984	0,1379416	0,1269454
0,28	0,1489281	0,1489281	0,184329	0,1867704	0,2783246	0,1391623	0,1477073	0,2038605	0,2026398	0,1440452	0,1269454
0,29	0,1538109	0,1440452	0,1818875	0,1916533	0,2771038	0,1477073	0,1489281	0,2075227	0,2038605	0,1416037	0,1318279
0,3	0,1464866	0,1477073	0,1879912	0,1867704	0,2868696	0,1440452	0,1428244	0,2099641	0,2099641	0,1391623	0,1318279
0,31	0,1525902	0,1501488	0,1867704	0,1879912	0,280766	0,1452659	0,1501488	0,2075227	0,2050813	0,1501488	0,1367104
0,32	0,1562524	0,1477073	0,184329	0,1904326	0,280766	0,1525902	0,1501488	0,2111849	0,2075227	0,1452659	0,1367104
0,33	0,1525902	0,1525902	0,1904326	0,1892119	0,2844282	0,1489281	0,1464866	0,2124056	0,2136263	0,1440452	0,1367104
0,34	0,1586938	0,1538109	0,1904326	0,192874	0,2819867	0,1501488	0,1538109	0,2087434	0,2087434	0,1525902	0,1415929 🗸
¢									Стр 1, стл	6 1 100% Windo	> ows (CRLF_UTF-8

Рисунок 6.12 – Пример результата измерений сток-затворных характеристик (C3X) нанопроводов в виде текстового файла



Рисунок 6.13 – Подпрограмма Project0721 с различными вариантами обработки сигнала



Рисунок 6.14 – Пример СЗХ в виде графиков



Рисунок 6.15 – Пример отражения результатов расчета производной для C3X без операции сглаживания



Рисунок 6.16 – Пример отражения результатов расчета производной для C3X со сглаживанием (по 10 точкам) и самой функции C3X

Анализ представленных в декабре отчетных материалов по Договору показали, что следующие пункты ТЗ-Д: 5.1.1.2-з, 5.1.1.3, 5.1.1.4, 5.1.1.5. 6, не реализованы, т.к. для их реализации необходима возможность вывода данных в реальном времени.

6.4. Изготовление дистрибутива программы и пакет программной документации

По результатам НИР от ООО «РИКО-мед» передан в ИБМХ дистрибутив среды программирования и программы на flash накопителе. Передана Программная документация на специально ПО для обработки данных, полученных с помощью молекулярного детектора- нанопроводного биосенсора в составе:

- 1. Инструкция пользователя ПО;
- 2. _distributive\Project0721\Readme.md
- 3. _distributive\Project0721\doc\Установка и сборка комплекта ПО.docx
- 4. _distributive\serialc\Readme.md
- 5. _distributive\spod\Readme.md

В соответствие с п.2.6 ПГ и п.5.7 ТЗ выполнена разработка специального ПО для обработки данных, полученных с помощью молекулярного детектора нанопроводного детектора. Незавершённость работ по разработке ПО на момент составления отчета за 2022 год не позволяет проверить соответствие ПО требованиям, указанным в п.6.1.5 ТЗ. Предоставлен пакет Программной документации на текущую версию программы: Текст программы, Описание применения, Пояснительная записка, Руководство оператора, Программа и методика испытаний (файлы в составе пакета отчетной документации с названием «Пункт_ПГ-2.6-ххх», где «ххх» название документа.).

Работы по пункту 2.6 плана-графика выполнены в полном объеме и соответствуют пунктам 5.7 и 7.1.2.2 технического задания. Соответствие результатов работ пункту 6.1.5 технического задания будет установлено на следующем этапе работ.

7. ИЗГОТОВЛЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ ЧИПОВ ДЛЯ НАНОПРОВОДНОГО ДЕТЕКТОРА, АДАПТИРОВАННЫХ ДЛЯ АНАЛИЗА БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ

Работы в рамках мероприятия выполнены по п 2.7 ПГ совместно с Институтом физики полупроводников им. А.В. Ржанова Сибирского отделения Российской академии наук (ИФП СО РАН) по Договору № 23/223/1066-22 на выполнение НИР (шифр «Биочип») от 29 апреля 2022 г. Соисполнителями ИФП СО РАН по Договору являлись АО "НЗПП Восток" (ИНН 5402546039). Цель выполнения НИР – определение путей создания нанопроводного детектора, на основе полупроводниковых чипов, адаптированных для анализа биологических образцов.

Назначение образцов – чипы для нанопроводного детектора, адаптированные для анализа биологических образцов, предназначенные для поиска клинически значимых белковых маркеров на новом уровне чувствительности биоанализа. Техническое задание на изготовление экспериментальных образцов чипов для нанопроводного детектора, адаптированных для анализа биологических образцов было разработано на первом этапе настоящего проекта. Разработанное ТЗ являлось основой Договора с ИФП СО РАН и далее по тексту настоящего раздела обозначено как ТЗ-Д. Необходимость проведения НИР обусловлено, прежде всего, необходимостью исследования путей повышения стабильности поверхности нанопроводных (или аналогичное название «наноленточных») сенсорных элементов в составе чипа. Другим направлением являлся поиск конструктивных решений для корпуса чипа, содержащего кристалл с наноструктурами, и микрожидкостного блока - ячейки, прокладки и крепежных элементов, позволяющий проводить анализ биологической жидкости.

Отчет ИФП СО РАН и их соисполнителей представлен в составе пакета отчетной документации (документ «Пункт_ПГ-2.7-ОтчетНИР-ИФП»). В отчете отражены основные этапы работ и полученные результаты, указано соответствие ТЗ-Д.

По итогам работы ИФП СО РАН в ИБМХ переданы 20 образцов печатных плат, содержащих основные элементы чипов для нанопроводного детектора – кристаллы с наноразмерными сенсорными элементами. Печатные платы были

предоставлены в сопровождении Паспорта чипов (согласно п.2.7 ПГ и пп5.21 и 7.1.31 ТЗ). Паспорта чипов предоставлены в составе отчетной документации – файл «Пункт_ПГ-2.7-Паспорт-НП-чипы». Фотоизображение примера полученной печатной платы представлено на рисунке 7.1.



Рисунок 7.1 – Фотоизображение а) печатной платы с кристаллом, содержащем наноразмерные сенсорные элементы, переданной от ИФП СО РАН в ИБМХ по итогам НИР; б) пластиковый контейнер с десятью печатными платами

При выполнении НИР в ИФП СО РАН возникло ряд трудностей, связанных, прежде всего, с нарушением логистических путей для поставок расходных материалов, реагентов и основного материала для изготовления чипов – кремниевых пластин надлежащего качества. Возникшие обстоятельства привели к задержке сдачи работ по Договору, о чем получено официальное письмо от ИФП СО РАН (копия письма направлена от ИБМХ в Минобрнауки РФ в установленные Соглашением сроки).

На момент предоставления отчетных материалов за 2022 год (январь 2023 года) согласно представленным отчетным материалам от ИФП СО РАН работы выполнены в полном объеме и разработанные чипы для нанопроводного детектора удовлетворяют требованиям ТЗ-Д и требованиям Соглашения ИБМХ в части п.6.1.3 ТЗ.

Согласно пункту 7.1.14 ТЗ был составлен Акт изготовления экспериментальных образцов чипов для нанопроводного детектора, адаптированных для анализа биологических образцов. Документ представлен в пакете отчетной документации – файл «Пункт ПГ-2.7-Акт-НП-чипы). Для

составления Акта сотрудниками ИБМХ проведена оценка поступивших в ИБМХ части чипов – печатных плат и анализ отчетной документации от ИФП СО РАН.

При оценке характеристик поступивших элементов на соответствие требованиям п.6.1.3 ТЗ установлено выполнение:

- объем аналитической ячейки, мл – 1,5 мл, не более (установлено на основе рисунка «Рисунок 1.14 – Чертеж фторопластовой кюветки» отчета ИФП СО РАН);

- способ крепления – съемный, без использования клеящих материалов (установлено на основе рисунка «Рисунок 1.15 – Фторопластовая кюветка, внешний вид» отчета ИФП СО РАН);

- количество нанопроводных сенсоров, штук – 10, не менее (установлено на основе визуальной оценки количества сенсорных элементов на кристалле в составе печатных плат, предоставленных в ИБМХ, а также на основе данных регистрации сигналов, представленных в отчете ИФП СО РАН).

Требование «время установки в нанопроводной детектор, мин – 5, не более» в отчетных материалах ИФП СО РАН не отражен и в настоящий момент не может быть проверен на соответствие в ИБМХ, т.к. пока не изготовлена необходимая оснастка для интеграции в систему измерительного блока НП-детектора. Далее оснастка будет изготовлена по чертежам, предоставленным ИФП СО РАН с возможными изменениями, предложенными в ИБМХ после проведения пилотных экспериментов. Т.о., выполнение указанного выше требования «время установки в нанопроводный детектор» будет отражено в отчете на следующем этапе работ.

Работы по пункту 2.7 плана-графика выполнены в полном объеме и соответствуют пунктам 5.21, 7.1.31 и 7.1.14 технического задания. Соответствие результатов всем подпунктам пункта 6.1.3 технического задание будет установлено на следующем этапе работ.

8. НАПРАВЛЕННЫЙ АНАЛИЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ, АССОЦИИРОВАННЫХ, СОГЛАСНО ЛИТЕРАТУРНЫМ ДАННЫМ, С РАЗВИТИЕМ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОПРОВОДНОГО ДЕТЕКТОРА

Для выполнения проекта согласно пп.5.22 ТЗ на текущем этапе и п.5.30 ТЗ на следующем этапе работ, проведен анализ литературных источников, с целью подбора РНК, ассоциированных онкологическими заболеваниями различной локализации, а именно с раком яичников, раком почки, раком мочевого пузыря и раком предстательной железы. Результаты, полученные на данном этапе, в дальнейшем будут полезны для совершенствования методологической базы, а также непосредственного проведения направленного анализа РНК, ассоциированных согласно литературным данным с развитием онкологических заболеваний, с использованием нанопроводного биосенсора.

В рамках выполнения работ по п.2.8 проведена экспериментальная работа по направленному анализу нуклеиновых кислот, ассоциированных с онкологическим заболеванием – раком предстательной железы.

В последние годы наблюдается обширный интерес к дифференциальной экспрессии микроРНК в физиологических и патологических состояниях, в том числе при онкологических и инфекционных заболеваниях. Этот интерес обусловлен тем, что в физиологических условиях микроРНК играют ключевую роль в контроле клеточной передачи сигналов и тканевого гомеостаза, действуя как механизм посттранскрипционой регуляции экспрессии генов. Координационная функция этих молекул позволяет избежать развития неконтролируемой клеточной пролиферации, регулирует дифференцировку клеток, а также обеспечивает тонкую регуляцию мРНК в ответ на обнаруживаемые в микроокружении клеток стимулы (например, эндокринные гормоны, хемокины и цитокины, стрессовые или инфекционные состояния и др.) [43,44].

Молекулы микроРНК непрерывно экспрессируются в пролиферирующих или покоящихся клетках, тем самым поддерживая динамический баланс между механизмами контролируемой клеточной пролиферации и апоптоза, который имеет ключевое значение для предотвращения развития и пролиферации потенциально злокачественных клеток [45]. Однако, когда такой жесткий контроль не устраняет

все нарушения в механизмах апоптоза и/или некроза, это может привести к развитию онкопатологии [46].

В некоторых работах было выявлено, что изменения в паттерне экспрессии микроРНК связаны с изменениями, наблюдаемыми в микроокружении тканей на ранних стадиях развития опухоли. Как правило, эти изменения протекают без какихлибо клинических проявлений или не могут быть обнаружены с помощью традиционных методов скрининга [47]. В связи с этим, использование микроРНК в качестве биомаркеров на ранних стадиях развития различных патологических состояний может позволить расширить стратегии, доступные для диагностики и лечения заболеваний, в частности онкологических.

МикроРНК представляют собой некодирующие РНК размером около 22 нуклеотидов, которые могут нацеливаться на более чем 60% белок-кодирующих генов [48]. Помимо этого, микроРНК обладают способностью регулировать экспрессию около одной трети генов в геноме человека [49]. Таким образом, микроРНК играют немаловажную роль онкогенезе и прогрессировании опухолей различной локализации.

8.1. Анализ литературы с целью поиска нуклеиновых кислот, ассоциированных с развитием онкологических заболеваний

Рак яичников, уровень смертности от которого является самым высоким среди всех женских гинекологических опухолей, не имеет специфических клинических проявлений на ранней стадии, в результате чего у большинства пациентов на момент постановки диагноза обнаруживаются метастазы и инвазия раковых клеток [50]. Было также выявлено, что профиль экспрессии микроРНК изменяется в зависимости от прогрессирования заболевания и гистотипа рака, например, микроРНК-200а и микроРНК-200b активируются при серозном раке яичников, в то время как подавляются при муцинозном раке [51]. Паттерн аберрантной экспрессии микроРНК также может быть мощным инструментом для диагностики рака яичников на самых ранних стадиях. Например, в работе Iorio et al. [52] сообщалось об аберрантной экспрессии микроРНК при раке яичников и было обнаружено, что микроРНК-141 и микроРНК-200a/b/с являются наиболее значительно сверхэкспрессированными. МикроРНК-200а и микроРНК-200с были сверхэкспрессированы во всех гистотипах микроРНК-200b микроРНК-141 рака яичников, тогда как И являются

эндометриоидными и серозно-специфичными. Все это указывает на возможность использования дифференциального профиля экспрессии микроРНК ЛЛЯ эффективного выявления рака яичников, в том числе на ранних стадиях его В таблице 8.1 представлены некоторые примеры микроРНК, развития. экспрессирующиеся при раке яичников.

Таблица 8.1 — Дифференциальная экспрессия микроРНК, ассоциированных с развитием рака яичников

Биологический	микроРНК	Профиль	Ссылка
образец		экспрессии	
Сыворотка	микроРНК-141, микроРНК-200а, микроРНК-200с, микроРНК-200b	Upregulated	[52]
Сыворотка	микроРНК-30а, микроРНК-26b, микроРНК-486, микроРНК-520с, микроРНК-628	Upregulated	[53]
Сыворотка	микроРНК-99а, микроРНК-100, микроРНК-125b, микроРНК-139, микроРНК-451, микроРНК-500a, микроРНК-1290, микроРНК-3131, микроРНК-3153	Upregulated	[54]
Плазма	микроРНК-21-5р, микроРНК-200с, микроРНК-221, микроРНК-484	Upregulated	[55]
Плазма	ма микроРНК-10а-5р, микроРНК-145-5р, микроРНК-205- 5р, микроРНК-328-3р, микроРНК-346		[56]
Плазма	микроРНК-141	Upregulated	[57]
Плазма	микроРНК-200а, микроРНК-200b, микроРНК-200с, микроРНК-429	Upregulated	[58]
Опухолевые ткани	микроРНК-29а, микроРНК-29с, микроРНК-99а, микроРНК-100, микроРНК-199а, микроРНК-221, микроРНК-296, микроРНК-494	Upregulated	[59]
Опухолевые ткани	микроРНК-18а, микроРНК-93, микроРНК-141, микроРНК-200, микроРНК-429	Upregulated	[60]
Опухолевые ткани	микроРНК-7, микроРНК-10а, микроРНК-15а, микроРНК-18а, микроРНК-20b, микроРНК-21, микроРНК-31, микроРНК-93, микроРНК-106а, микроРНК-141, микроРНК-146а, микроРНК- 155,микроРНК-182, микроРНК-200а, микроРНК-200b, микроРНК-200c, микроРНК-203, микроРНК-210	Upregulated	[61]

Почечно-клеточная карцинома (ПКР) является типичным злокачественным поражением почек, составляющим 3% всех злокачественных опухолей, с высокой частотой рецидивов и летальностью более 40% [62]. Приблизительно 20-30% пациентов с ПКР имеют метастазы на момент постановки диагноза, а еще у 30% пациентов, перенесших радикальное хирургическое вмешательство, метастазы развиваются во время последующего наблюдения [63]. Вероятность развития метастатического ПКР сильно коррелирует с клинической стадией, а также со степенью опухоли и гистологическими данными. Несмотря на широкое исследование генетических биомаркеров ПКР, эпигенетические биомаркеры, включая микроРНК, также привлекли значительное внимание из-за их биологической и клинической полезности в диагностике и лечении [64]. Было проведено довольно много исследований, отраженных в таблице 8.2, в которых измеряли профиль экспрессии микроРНК в различных биологических образцах при ПКР для определения патогенной роли этих транскриптов в развитии этого типа рака.

Таблица 8.2 — Дифференциальная экспрессия микроРНК, ассоциированных с развитием почечно-клеточного рака (ПКР)

Биологический	микроРНК	Профиль	Ссылка
образец		экспрессии	
Сыворотка	микроРНК-122-5р, микроРНК-206	Upregulated	[65]
Сыворотка	микроРНК-193а-3р, микроРНК-362, микроРНК-572	Upregulated	[66]
Сыворотка	микроРНК-210, микроРНК-378	Upregulated	[67]
Плазма	микроРНК-221, микроРНК-222	Upregulated	[68]
Плазма	микроРНК-210, микроРНК-218, микроРНК-1233	Upregulated	[69]
Опухолевые ткани	микроРНК-195-5р	Downregulated	[70]
Опухолевые ткани	микроРНК-195-3р	Upregulated	[71]
Опухолевые ткани	микроРНК-10а, микроРНК-182, микроРНК-221,	Upregulated	[72]
	микроРНК-221-5р, микроРНК-222, микроРНК-629-		
	5р, микроРНК-891b, микроРНК-1208, микроРНК-		
	1229		
Опухолевые ткани	микроРНК-16, микроРНК-155, микроРНК-210,	Upregulated	[73]
	микроРНК-224, микроРНК-452		
Опухолевые ткани	микроРНК-122, микроРНК-155, микроРНК-210,	Upregulated	[74]
	микроРНК-224		

Рак мочевого пузыря (РМП) считается одной из наиболее распространенных злокачественных опухолей человека со сложным патогенезом, включающим вариации экспрессии генов, деградацию белков и изменения сигнальных путей [75]. Частота рецидивов и прогрессирования РМП сохраняется в течение 5 лет, риск метастазирования высок, а прогноз неблагоприятен [76,77]. В настоящее время в ряде исследований показана корреляция между микроРНК и патогенезом РМП, часть из этих исследований представлена в таблице 8.3. Следует отметить, что экспрессия микроРНК различается в образцах крови, мочи и тканей, тогда как большинство исследований РМП в основном основано на образцах тканей [78]. Таким образом, эти молекулы могут быть использованы в качестве потенциальных биомаркеров в диагностике, прогнозировании и разработке новых стратегий лечения РМП.

Таблица 8.3 – Дифференциальная экспрессия микроРНК, ассоциированных с развитием рака мочего пузыря (РМП)

Биологический	микроРНК	Профиль	Ссылка
образец		экспрессии	
Сыворотка	микроРНК-9-5р, микроРНК-181b-5р, микроРНК- 183-5р	Upregulated	[79]
Сыворотка	кластер микроРНК-17-92 (микроРНК-17-5р, микроРНК-18а-5р, микроРНК-19а-3р, микроРНК- 20а-5р, микроРНК-19b-3р, микроРНК-92а-3р)	Upregulated	[80]
Сыворотка	микроРНК-29с-5р, микроРНК-30с-5р, микроРНК- 185-5р, микроРНК-200с-3р, микроРНК-663а, микроРНК-1270	Upregulated	[81]
Плазма	микроРНК-200b	Upregulated	[82]
Плазма	микроРНК-363, микроРНК-505, микроРНК-663b	Upregulated	[83]
Плазма	микроРНК-15b-5р, микроРНК-29b-3р, микроРНК- 590-5р	Upregulated	[84]
Опухолевые ткани	микроРНК-138, микроРНК-182, микроРНК-200b	Upregulated	[85]
Опухолевые ткани	микроРНК-590-3р	Downregulated	[86]
Опухолевые ткани	микроРНК-143, микроРНК-145	Upregulated	[87]
Опухолевые ткани	микроРНК-141b, микроРНК-205	Upregulated	[88]

(РПЖ) Рак предстательной железы является наиболее одним ИЗ распространенных типов рака у мужчин, уровень заболеваемости которым повышается с возрастом и во многих странах [89]. РПЖ является очень гетерогенной опухолью, которая может проявляться индолентно или очень агрессивно, обычно с метастазами в другие органы и кости, что приводит к высокой смертности [90]. Современные методы диагностики РПЖ могут привести к гипердиагностике и гипертерапии пациентов, подвергающихся, в связи с этим, хирургическому или фармакологическому лечению без реальной необходимости [91]. По этой причине, а также из-за молекулярной гетерогенности РПЖ необходимо идентифицировать альтернативные биомаркеры рака предстательной железы, такие как микроРНК, для ускорения и улучшения диагностики рака на ранней стадии его развития, а также чтобы ограничить чрезмерное лечение и обеспечить соответствующие стратегии лечения РПЖ. В таблице 8.4 приведены микроРНК, экспрессирующиеся при РПЖ в различных биологических образцах.

Таблица 8.4 — Дифференциальная экспрессия микроРНК, ассоциированных с развитием рака предстательной железы (РПЖ).

Биологический	микроРНК	Профиль	Ссылка
образец		экспрессии	
Сыворотка	микроРНК-17, микроРНК-20а, микроРНК-20b,	Upregulated	[92]
	микроРНК-106а		
Сыворотка	микроРНК-200с	Upregulated	[93]
Плазма	микроРНК-21, микроРНК-125b, микроРНК-126,	Upregulated	[94]
	микроРНК-141, микроРНК-143, микроРНК-375		
Плазма	микроРНК-20b-5р, микроРНК-96-5р, микроРНК-183-	Upregulated	[95]
	5р		
Опухолевые ткани	евые ткани микроРНК-221, микроРНК-222		[96]
Опухолевые ткани	микроРНК-191	Upregulated	[97]
Опухолевые ткани	микроРНК-18а	Upregulated	[98]
Опухолевые ткани	микроРНК-182	Upregulated	[99]
Опухолевые ткани	микроРНК-25-3р, микроРНК-93-5р, микроРНК-137,	Upregulated	[100]
	микроРНК-142-3р, микроРНК-150-5р, микроРНК-		
	375, микроРНК-489, микроРНК-494, микроРНК-575,		
	микроРНК-600, микроРНК-630, микроРНК-663а,		
	микроРНК-888-5р, микроРНК-1973		
Опухолевые ткани	микроРНК-9, микроРНК-141, микроРНК-200b,	Upregulated	[101]
	микроРНК-375, микроРНК-516а-3р		

Таким образом, в ходе анализа литературных источников были выявлены различные микроРНК, ассоциированные с онкологическими заболеваниями, такими как раком яичников, рак почек, раком мочевого пузыря и рак предстательной железы. Следует отметить, что выявленные микроРНК, как правило, имели повышенную экспрессию в различных биологических образцах (сыворотке и плазме крови, а также в опухолевых тканях), полученных от пациентов, страдающих исследуемой онкопатологией. Полученные на данном этапе результаты в дальнейшем будут полезны при проведении исследований по детекции микроРНК, ассоциированных с развитием онкологических заболеваний различной локализации, в биологических образцах с использованием нанопроводного биосенсора.

В ходе анализа были выявлены микроРНК, ассоциированные с раком яичников, раком почек, раком мочевого пузыря и раком предстательной железы, экспрессия которых как правило повышалась в биологических образцах, полученных от пациентов, страдающих от данных онкопатологий. Данные, полученные в результате обзора литературы, будут полезны как для проведения дальнейших исследований по выявлению микроРНК, ассоциированных с другими типами рака, так и для непосредственного проведения исследований по анализу содержания микроРНК в биологических образцах с использованием нанопроводного биосенсора.

8.2. Результаты направленного анализа нуклеиновых кислот, ассоциированных, согласно литературным данным, с развитием рака предстательной железы

В рамках проекта был проведен направленный анализ микроРНК-183 [102], микроРНК-346 [103], микроРНК-429 [104] И микроРНК-484 [105], ассоциированных, согласно литературным данным, с онкологическим заболеванием – раком предстательной железы (РПЖ), с помощью нанопроводного биосенсора. В исследовании с помощью нанопроводного биосенсора проводилось обнаружение пула из данных 4-х микроРНК в анализируемых растворах, содержащих РНК, выделенные из плазмы крови пациентов №5 и №44 с подтвержденным диагнозом РПЖ. В качестве контроля использовался раствор, содержащий РНК, выделенные из плазмы крови пациента №27 с кистой левой почки неонкологической природы. На рисунке 8.1 представлены результаты по детекции микроРНК, ассоциированных, согласно литературным данным, с раком предстательной железы, с помощью нанопроводного биосенсора.

Как видно из рисунка 8.1, при добавлении раствора, содержащего пул исследуемых микроРНК, выделенных из плазмы крови пациента с РПЖ, наблюдается снижение проводимости сенсорных нанопроводов биосенсора. Причем нанопровода с иммобилизованными оДНК-зондами к микроРНК-346 и микроРНК-484 (Рис. 8.1, b и d) позволили осуществить обнаружение микроРНК в образцах плазмы крови №5 и №44. При этом, от нанопроводов с иммобилизованным оДНКзондами к микроРНК-183 и микроРНК-429 был зарегистрирован сигнал только при анализе образца № 44 (Рисунок 8.1, а и с), что, вероятно, свидетельствует, об отсутствии в образце №5 данных микроРНК. В контрольных экспериментах при добавлении растворов, содержащих микроРНК, выделенные из плазмы крови пациента №27 с заболеванием неонкологической природы, сигнал изменялся незначительно или в противоположенную сторону, то есть наблюдалось увеличение проводимости нанопровода (Рис. 8.1, синие кривые). Таким образом, наблюдается хорошее совпадение результатов выявления повышенного уровня исследуемых микроРНК у пациентов, для которых клинически подтвержден диагноз – рак предстательной железы.



Рисунок 8.1 – Сенсограммы, полученные при обнаружении микроРНК с использованием нанопроводного биосенсора. Условия эксперимента: чип п-типа проводимости; нанопровода иммобилизованы оДНК-зондами, комплементарными к микроРНК-183 (а), микроРНК-346 (b), микроРНК-429 (с), микроРНК-484 (d); 1 мМ КФБ; Vg = 42 B; Vds = 0,1 B; объем 107 мкл; образцы №44 и №5, выделенные из плазмы крови пациента с диагнозом РПЖ (красная и зеленая линии, соответственно), контрольный образец №27, выделенный из плазмы пациента с кистой левой почки (синяя линия). Стрелками указано добавление микроРНК и отмывочного КФБ буфера

В результате данного исследования было показано, что нанопроводный биосенсор успешно позволяет проводить направленный анализ исследуемых биомаркеров онкологических заболеваний и выявлять повышенный уровень микроРНК-183, микроРНК-346, микроРНК-429 и микроРНК-484, ассоциированных, согласно литературным данным, с РПЖ, у пациентов с подтвержденным диагнозом РПЖ, по сравнению с пациентом с диагнозом киста почки неонкологической природы. При этом, наблюдался ожидаемый стандартный ответ в виде понижения уровня сигнала нанопровода п-типа на добавление отрицательно заряженной молекулы микроРНК в измерительную кювету нанопроводного биосенсора. Помимо этого, в исследовании продемонстрирована возможность нанопроводного

биосенсора осуществлять одновременную регистрацию нескольких микроРНК, экспрессия которых повышается при РПЖ, без использования дополнительных меток в режиме реального времени.

В рамках проекта проведен анализ литературных источников, с целью подбора РНК, ассоциированных с онкологическими заболеваниями различной локализации, а также с помощью нанопроводного биосенсора был проведен непосредственно направленный анализ микроРНК (микроРНК-183, микроРНК-346, микроРНК-429 и микроРНК-484), ассоциированных, согласно литературным данным, с РПЖ. Результаты экспериментальной работы готовятся к публикации.

Работы по пункту 2.8 плана-графика выполнены в полном объеме и соответствуют пункту 5.22 технического задания.

9. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ АНАЛИЗА ТРАНСКРИПТОМА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОПОРОВОГО ДЕТЕКТОРА

9.1. Разработка методики анализа транскриптома в биологических образцах с использованием нанопорового детектора

На предыдущем этапе работ была разработана схема анализа транскриптома в биологических образцах с использованием нанопорового детектора, предусматривающая подготовку и аннотацию биологических образцов, анализ транскрибируемой (РНК-секвенирование мРНК) и транслируемой на рибосомах частей транскриптома. Центральным методическим звеном разработанной схемы является использование нанопорового детектора УНУ «Авогадро», позволяющего получить длинные прочтения и охарактеризовать транскриптом с учетом модификаций и вариантов альтернативного сплайсинга.

Разработанная схема предусматривает использование нанопорового детектора для последовательного анализа транскриптома биологических образцов: от недифференцированных к дифференцированным клеткам (эмбриональные стволовые клетки, трансформированные клеточные линии, дифференцированная ткань) для выявления фундаментальных молекулярных механизмов, лежащих в основе усложнения композиции биологических объектов на уровне «геномтранскриптом-протеом». В рамках отчетного периода были проработаны методические вопросы реализации методики анализа транскриптома В биологических образцах с использованием нанопорового детектора УНУ «Авогадро» в рамках утвержденной ранее схемы работы.

Методика анализа транскриптома с использованием нанопорового детектора включает в себя четыре этапа: (1) экстракцию суммарной РНК (сРНК) из биологического материала, (2) выделение матричной РНК (мРНК), которая обеспечивает трансляцию генетической информации в белковые продукты, (3) приготовление библиотеки для секвенирования и (4) секвенирование библиотеки с использованием нанопорового детектора. Последний этап в значительной степени регламентируется инструкцией производителя нанопорового детектора, компании Oxford Nanopore Technologies. К существенным параметрам, которые может изменять пользователь, относятся выбор продолжительности секвенирования и

способ обработки первичных данных (непосредственно во время секвенирования или после его окончания). В разрабатываемом протоколе было выбрано время секвенирования 72 часа для получения максимально возможного объема первичных данных и обработка получаемых файлов в формате «off-line» (после окончания секвенирования) в силу того, что это снижает требования к характеристикам управляющего компьютера и соединения с интернет-ресурсами.

Для выполнения первого этапа могут быть использованы три подхода, основанные на различающихся технологиях очистки – (i) на экстракции сРНК с помощью водно-органической смеси с последующим осаждением РНК изопропанолом из водной фазы, (ii) на сорбции РНК на кремниевой мембране и (iii) на сорбции РНК на поверхности силиконизированных парамагнитных частиц. Чтобы установить, какой из подходов позволяет получать сРНК наилучшего качества и с наибольшим выходом, мы провели тестирование коммерческого peareнта TRIzolTM Reagent (Thermo Fisher Scientific) – подход (i), а также двух коммерческих наборов RNeasy Mini Kit (QIAGEN) и HighPrepTM Total RNA Plus Kit (MAGBIO) – подходы (ii) и (iii), соответственно. Во всех случаях выделение сРНК проводилось из одного образца клеток линии HepG2 общим количеством 10 млн, разделённого на три равные части (3,3 млн клеток в каждой). Все операции проводились в строгом соответствии с протоколами производителей реагента и наборов. Набор TRIzolTM Reagent представляет однофазный раствор фенола и гуанидин тиоцианата в водном буфере и дополнительно требует добавления хлороформа для выделения сРНК. В качестве оценки использовали количество РНК, полученное из 1 млн. клеток (выход сРНК), отношения оптического поглощения (OD) препаратов сРНК на 230, 260 и 280 нм – OD260/OD230 и OD260/OD280 (показатели чистоты препаратов PHK), и RIN (RNA Integrity Number, показатель степени нативности РНК, RIN=10 соответствует РНК наивысшего качества). Оптическое поглощение и концентрацию РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific), RIN – на биоанализаторе Agilent Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies). Полученные результаты приведены в таблице 9.1.

Таблица 9.1 – Результаты тестирования экстракции суммарной РНК из биологического материала с помощью коммерческого peareнma TRIzolTM Reagent и коммерческих наборов RNeasy Mini Kit и HighPrepTM Total RNA Plus Kit

		ion i op i onen		
Набор/Реагент	Выход РНК (мг на 1 млн	OD260/OD230	OD260/OD280	RIN
	клеток)			
TRIzol [™] Reagent	8,2	1,75	1,91	7,9
RNeasy Mini Kit	11,7	1,95	2,04	8,9
HighPrep [™] Total	7,1	1,88	1,98	8,5
RNA Plus Kit				

Общепринято, что отношения OD260/OD230 и OD260/OD280 не должны быть меньше 1,8. Как видно из таблицы, только наборы RNeasy Mini Kit и HighPrepTM Total RNA Plus Kit удовлетворяли этому требованию. Кроме того, они также характеризовались более высоким выходом PHK по сравнению с TRIzolTM Reagent. Среди наборов, набор RNeasy Mini Kit показал существенно более высокий выход PHK. Таким образом, экстракция сPHK с использованием именно этого набора была положена в основу разрабатываемой методики.

Следующим этапом является изоляция мРНК из сРНК. Как правило, в культивируемых клетках относительное количество мРНК лежит в пределах 2-5%. Её изоляция основана на том, что мРНК полиаденилирована и может связываться с магнитными частицами, несущими на своей поверхности зонд поли(dT). В рамках разработки методики были тестированы наборы магнитных частиц для изоляции мРНК двух производителей – DynabeadsTM mRNA Purification Kit производства Thermo Fisher Scientific и SileksMag-oligo(dT)30 производства российской компании Sileks. Оба набора обеспечивали получение мРНК из препаратов сРНК, однако набор SileksMag-oligo(dT)30 показывал более высокую вариабельность выхода мРНК: в случае DynabeadsTM mRNA Purification Kit относительный выход мРНК в трех независимых выделениях из одного образца сРНК клеток линии HepG2 лежал в пределах 3,2-3,8%, а в случае набора SileksMag-oligo(dT)30 – в пределах 2,3-3,6%. Как следствие, разрабатываемая методика предполагает использование набора DynabeadsTM mRNA Purification Kit.

Приготовление библиотек для секвенирования (третий этап) происходит с использованием набора Oxford Nanopore Technologies для приготовления библиотек, который содержит необходимые праймеры для синтеза комплементарной ДНК (кДНК), ДНК-адаптеры и препарат моторного белка. Синтез кДНК и лигирование ДНК-адаптеров может проводиться с использованием обратной транскриптазы и

ДНК-лигазы различных производителей. В рамках разработки протокола мы тестировали обратные транскриптазы SuperScript III производства Thermo Fisher Scientific и Mint производства российской компании Евроген. Кроме того, тестировались рекомбинантная Т4 ДНК-лигаза также производства компании Евроген и рекомбинантная Т4 ДНК-лигаза из набора NEBNext Quick Ligation Module производства New England Biolabs. Было проверено четыре комбинации «обратная транскриптаза – лигаза» (таблица 9.2). Эффективность работы комбинации ферментов оценивалась по суммарному выходу нуклеиновых кислот (выходу библиотеки) на флуориметре Qubit 4.0 с использованием набора «Qubit™ dsDNA HS Assay Kit» (Thermo Fisher Scientific). Каждая библиотека готовилась из 500 нг мРНК одного выделения. Результаты тестирования приведены в таблице 9.2.

Таблица 9.2 — Выход библиотеки для секвенирования (суммарное количество нуклеиновых кислот в нг) для различных комбинаций «обратная транскриптаза — T4 ДНК-лигаза»

Ферменты	Т4 ДНК-лигаза (Евроген)	NEB T4 DNA Ligase
SuperScript III	205	260
Mint	143	185

Хотя комбинация «SuperScript III – Т4 ДНК-лигаза (Евроген)» давала приемлемый выход библиотеки для секвенирования, комбинация «SuperScript III – NEB T4 DNA Ligase» показала значительно более высокий выход. Таким образом, в разработанной методике применяются обратная транскриптаза SuperScript III и лигаза NEB T4 DNA Ligase для получения библиотек для секвенирования.

Методика анализа транскриптома в биологических образцах с использованием нанопорового детектора представлена в Приложении Б «Методика анализа транскриптома в биологических образцах с использованием нанопорового детектора»

9.2. Анализ эпитранскриптома с использованием нанопорового детектора

Модифицированные нуклеотиды в составе молекул РНК формируют эпитранскриптом. Наличие модифицированных нуклеотидов необходимо учитывать при проведении анализа транскриптома, поскольку они структурно и функционально отличаются от немодифицированных аналогов. Некоторые из модификаций необходимы для функционирования РНК, в то время как другие служат в качестве динамических маркеров, регулирующих функционирование молекул РНК.

В настоящий момент обнаружено более 300 вариантов модификаций РНК. Для учета вклада эпитранскриптомных модификаций в результаты транскриптомного анализа, в рамках отчетного периода для выявления наиболее часто встречающихся модификаций и их описания был проведен мета-анализ результатов исследования эпитранскриптома, депонированных в виде научных публикаций в библитеке PubMed/MEDLINE.

Первая модификация РНК обнаружена в 1957 г., когда был выявлен «пятый нуклеотид», псевдоуридин [106]. К 1995 г. описаны 93 варианта модифицированных нуклеотидов, в основном, характерные для рРНК и тРНК. Знание точной частоты и функции большинства модификаций оставались неясными долгое время из-за ограничений доступной технологии анализа [107]. Появление технологий секвенирования следующего поколения (NGS) и жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (LC-MS/MS) позволило охарактеризовать более сотни различных модификаций во всех видах РНК [108].

В настоящее время широко известно, что модификации РНК значительно более многочисленны и распространены в клеточной РНК, чем предполагалось первоначально. Текущая версия базы данных модификаций РНК (MODOMICS), содержит чуть более 300 таких модификаций [109]. Эти модификации могут быть относительно простыми (например, присоединение метильной группы), или сложными, как в случае с 5-метоксикарбонилметил-2-тиуридином, который встраивается в субстрат РНК в ходе многоступенчатого ферментативного процесса [110].

Модификации РНК необходимы для корректного функционирования РНК различных видов, например, для правильной укладки, транскрипции, сплайсинга, трансляции, транспорта РНК и иммунных ответов. Большинство модификаций присутствуют в РНК в определенных положениях, тем не менее, некоторые модификации РНК являются динамическими и могут оказывать влияние на поведение молекул РНК во времени и в зависимости от молекулярного контекста [110]. Динамическое поведение уже связывают с важными клеточными процессами – например, реакцией на тепловой шок [111] или введение токсинов [112].

Модификации РНК тесно связаны с развитием заболеваний или патологических состояний [113]. При опухолевых заболеваниях дисбаланс уровней модификации РНК часто связан с более тяжелым прогнозом [114]. С другой стороны, недавний успех вакцин на основе мРНК против SARS-CoV-2 в основном связан с модификацией N1-метилпсевдоуридина, которая увеличивает эффективность трансляции вакцинной мРНК [115].

Исследование модификаций РНК – активно развивающееся направление, о чем свидетельствует стабильный рост количества статей за последние годы (рисунок 9.1). За последние годы наиболее часто исследовали модификацию N6метиладенозин, учитывая ее обилие в мРНК, установленную связь с раковыми процессами и наличие высокопроизводительных методов ее обнаружения, в том числе, с использованием нанопорового детектора.

В приложении (см. Таблицу в Приложении В) представлен список наиболее часто встречаемых модификаций РНК, которые могут быть выявлены при анализе транскриптома в биологических образцах.

Большинство модификаций характерны для тРНК (наиболее сильно модифицированном классе РНК — каждая молекула тРНК в среднем имеет 13 модификаций, многие из которых необходимы для правильного декодирования кодонов и прочной трансляции). рРНК также часто модифицируется, хотя и в меньшей степени, чем тРНК [116]. Так как тРНК и рРНК являются наиболее распространенными классами РНК, в них идентифицировано большинство известных модификаций [117]. Благодаря улучшениям в стратегиях обогащения и методах секвенирования многие из модификаций, которые считались характерными исключительно для рРНК и тРНК, а также другие новые модификации, теперь обнаруживаются в других классах РНК, включая мРНК [118,119] и длинные некодирующие РНК (IncRNA) [120]. Ниже суммирована информация о наиболее часто встречаемых типах модификаций РНК, которые могут быть детектированы с использованием нанопорового детектора.



Рисунок 9.1 — Количество опубликованных статей, связанных с конкретными модификациями РНК, в базе данных PubMed за год (а), общее количество (б)

N6-метиладенозин (m6A) является наиболее изученной модификацией [121]. m6A преобладает в эукариотической РНК, особенно в высших эукариотических клетках. Частицы m6A присутствуют в мРНК, тРНК, рРНК, микроРНК, мяРНК и днРНК [122]. Модификация m6A широко распространена в мРНК и необходима для регуляции сплайсинга РНК, трансляции, стабильности, транслокации и поддержания высокоуровневой структуры [122].

Впервые рельеф m6A в PHK был обнаружен с помощью NGS. В настоящее время m6A можно обнаружить несколькими методами, включая m6A-seq [123]. С развитием технологий секвенирования третьего поколения m6A можно обнаружить с помощью технологии Oxford Nanopore — секвенирования с использованием нанопорового детектора [124]. N6-метиладенозин играет роль в патогенезе многих заболеваний человека, включая ожирение, сердечную недостаточность и рак [125, 126]. Регуляторы m6A также могут служить потенциальной мишенью при создании лекарств [127].

Инозин (I) и 1-метилинозин (m1I). Изменение аденозина в инозин – основной путь модификаций РНК, который присутствует во всех областях жизни [128]. Инозин имеет другие правила гибридизации, чем аденозин; таким образом, изменение A-to-I может влиять на локальную структуру РНК и взаимодействия с другими молекулами РНК и белками. Инозин обнаружен в тРНК и мРНК, а также в других некодирующих РНК, таких как микроРНК [129]. В мРНК преобразование A-

to-I изменяет правила гибридизации, поскольку инозин интерпретируется тРНК и РНК-связывающими белками (RBPs) как гуанозин [130]. Необходимо отметить, изменение A-to-I часто затрагивает специфичные для мозга белки [131].

Стандартные протоколы NGS могут выявить места изменения A-to-I, поскольку инозин интерпретируется как гуанозин, и в конечном результате возникают несоответствия генома AG [129]. Недавно был представлен метод обнаружения инозинов в полноразмерных транскриптах с использованием нанопорового детектора [132].

Псевдоуридин (Ф) был первым модифицированным рибонуклеозидом, открытым в 1951 году, и является наиболее распространенным посттранскрипционно-модифицированным нуклеотидом В РНК [133]. Псевдоуридилирование является необратимым из-за превращения уридина (U) в псевдоуридин (Ψ), так как C-N гликозидная связь U изомеризуется в гораздо более инертную связь С-С в Ψ (псевдоуридин). Эта модификация может быть обнаружена различными методами NGS. Псевдоуридилирование связано с различными заболеваниями человека, включая множественный первичный рак [134, 135], митохондриальную миопатию, сидеробластную анемию и врожденный дискератоз.

7-метилгуанозин (m7G) — распространенная и хорошо известная модификация PHK, обнаруженная во многих организмов [136]. Ее распознавание связано, главным образом, с ее ролью в структуре кэпа эукариотической мPHK, характерной особенностью эукариотической мPHK, необходимой для правильной трансляции и уклонения от врожденной иммунной системы [137]. Недавно было предложено несколько высокопроизводительных методов, направленных на обнаружение модификаций m7G. Модификация m7G оказалась динамической, и ее функция связана с регуляцией трансляции [138].

Наибольшая доля модификаций РНК в первую очередь связана со структурной ролью в тРНК, где они поддерживают правильную укладку и стабильность транспортных молекул РНК, и желаемые параметры кодонантикодоновых взаимодействий. В настоящее время, среди существующих модификаций РНК, насчитывается приблизительно 300 вариантов, особое внимание уделено некоторым из них, таким как m6A, I, Ψ и m7G. Это обусловлено их высокой частотой встречаемости во всех доменах и последовательностях, широким спектром
выполняемых функций и несколькими вариантами относительно простых методов обнаружения, в том числе, с использованием нанопорового детектора. Методы, основанные на секвенировании, используются в основном для обнаружения модификаций других типов молекул РНК, в частности мРНК. В настоящее время разработаны протоколы для обработки данных, полученных с использованием как длинного секвенирования на основе нанопорового детектора, так и более традиционной технологии короткого чтения транскриптов.

Хотя функция для большинства модификаций РНК до сих пор неизвестна, показано, что в ряде случаев они играют ключевую роль в развитии ряда заболеваний и могут быть использованы в качестве терапевтических мишеней. В частности, изучение эпитранскриптома инициировало разработку мРНК-вакцин. Тем не менее, первые попытки не дошли до клиники, однако, мРНК-вакцины против COVID-19 показали свою высокую эффективность в предотвращении тяжелого течения заболевания [139, 140]. Такой успех будет стимулировать интерес к разработке лекарств на основе РНК. Кроме того, модуляторы модификации РНК могут служить потенциальными терапевтическими мишенями при терапии опухолевых заболеваний. В настоящее время эпитранскриптомные препараты продемонстрировали потенциал для повышения эффективности химиотерапии в доклинических исследованиях, и клинические испытания должны быть разработаны и проведены в будущем [141].

Результаты мета-анализа представлены в отчетной публикации по проекту [142].

9.3. Разработка нанопорового детектора для определения свойств отдельной молекулы

9.3.1. Энзимология в нанопоре: принципы метода

Важным шагом в исследовании каталитической активности и кинетических параметров ферментов является энзимология в нанопоре "in nanopore technology". Такой 3Д подход дает возможность анализировать единичные молекулы как собственно белков, так и субстратов или продуктов ферментативного катализа для оценки эффективности каталитического процесса. Специфичность ферментов как биологических катализаторов может быть объяснена теорией «ключ-замок» или

теорией индуцированного соответствия, предложенной Д. Кошландом. Уникальное свойство ферментов «подстраиваться» под субстрат особенно отчетливо может проявиться при включении фермента в нанопору соответствующего диаметра и измерения проводимости системы только для фермента и для фермента в присутствии субстрата (ингибитора, активатора, кофактора). Измерения физикохимических и каталитических свойств отдельных молекул значительно расширили понимание живых систем. В качестве нанопоры используют мембранные белкипорины и токсины, образующие поры с четко определенным ограниченным пространством для размещения одной молекулы. Биологическая нанопора действует как интерфейс биомолекулы для захвата И идентификации субстрата/ингибитора/активатора, и поэтому ее можно использовать в качестве сенсора одной молекулы. Сенсорным элементом при анализе каталитической активности ферментов с помощью нанопорового детектора является собственно нанопора, представляющая собой «ловушку» для белка-фермента, субстрата или продукта реакции. Для разработки такого подхода проведены подготовительные работы по анализу необходимых реактивов и комплектующих. Закуплены порообразующие белки для конструирования нанопор, необходимое оборудование для регистрации каталитической активности ферментов в нанопоре, проведен анализ литературных, данных опубликован обзор ПО сравнительному анализу каталитической активности в нанопоре и на электроде V.V. Shumyantseva et al., Enzymology On An Electrode And In A Nanopore: Analysis Algorithms, Enzyme Kinetics And Perspectives. BioNanoScience, 2022. DOI: 10.1007/s12668-022-01037-2 (Q3) (12, 1341-1355)

9.3.2. Разработка мембранного модуля нанопорового детектора

Для развития инструментальной составляющей УНУ Авогадро в части молекулярного детектора на основе нанопоры ведется работа по созданию нанопорового детектора, предназначенного для анализа свойств единичных молекул белков. В текущем году выполнены работы по двум основным направлениям.

Первым направлением является оценка возможности формирования и оценка возможности использования липидной мембраны для возможности регистрации взаимодействия липидного слоя с белками. В качестве такого белка был выбран мембранный белок цитохром b5 полноразмерный (d-b5) и его водорастворимая

трункированная форма (t-b5). Также исследовано влияние водорастворимого белка бычий сывороточный альбумин на проводимость мембраны. В качестве мембраны была использована мембрана диаметром 1 мм.

Вторым направлением является исследование возможности создания липидной мембраны меньшего диаметра, вплоть до 50 мкм, которая далее будет использоваться в экспериментах по встраиванию единичной белковой нанопоры в липидный слой.

В рамках первого направления проведено исследование влияния водорастворимого белка альбумина и мембранного белка цитохром b5 на целостность биологической мембраны из дифитонаила. Для этого использовался электрохимический метод определения электрической проводимости мембраны. Было показано, что альбумин вызывает деструкцию мембраны, в то время, как цитохром d-b5 не оказывает существенного влияния на целостность мембраны. Было показано, что присутствие цитохрома d-b5 в растворе альбумина приводит к уменьшению деструктивного влияния альбумина на целостность мембраны. Также показано, что t-b5 не оказывает влияние на мембрану.

Взаимодействие фосфолипидных мембран с белками имеет важное значение для определения физико-химических свойств мембраны, таких как ее стабильность, текучесть, проницаемость. Известно, что альбумин имеет важное значение и является компонентом плазмы, который играет важную роль в увеличении мембранной permeability. Альбумин имеет свернутую структуру в водных растворах или компактную структуру, окруженную гидратной оболочкой [143]. Известно, что молекулы альбумина сильно адсорбируются на фосфатидилхолиновых липосомах благодаря гидрофобным взаимодействиям [143] при этом энтропия возрастает. Отметим также, что белок плазмы альбумин является кандидатом эндотелиального поверхностного слоя для компонентов, происходящих из крови. [144]. Важная его функция заключается в том, что он может адгезироваться на поверхности клеток эндотелия и возможно показывает на небольшую отрицательную кооперативность или на гетерогенную популяцию сайтов связывания с разной степенью сродства. Вследствие вышеуказанных причин альбумин может сильно влиять на конфигурацию липидного слоя и необходимо исследовать действие альбумина на стабильность и проницаемость мембраны и на распределение электрических зарядов

по мембране.

Известно также, что цитохром b5 является внутриклеточным мембранным белком, который своим мембранным фрагментом заякоривается в мембране. Этот белок играет важную роль в ревализации электронного транспорта при функционировании мембранных цитохром P450 содержащих систем как один из важных партнеров [145]. Поэтому одной из задач является изучение влияния и этого белка на целостность мембраны и ее проницаемость для ионов.

Учитывая вышеизложенное, было исследовано взаимное влияния альбумина и цитохрома b5 на их возможность изменять проницаемость мембран. Эксперимент включал изучение влияния отдельно альбумина, цитохрома b5 и совместно обоих белков. В качестве модели была использована мембрана.

Схема установки, использованная в эксперименте, приведена на рисунке 9.2.



Рисунок 9.2 – Схема установки, использованная для исследования влияния белков на свойства мембраны. Где 1 – аналоговый электронный блок, 2 –цифровой электронный блок, 3 – персональный компьютер (ПК) с установленным программным обеспечением, 4 и 5 – микроскоп и ячейка с порой, 6 – первичная клетка Фарадея с шумоподавлением на антивибрационном столе

Раствор для формирования мембраны содержал дифитонаил в химически чистом декане в концентрации 30 мг/мл. Перед каждым экспериментом вертикальную стенку тефлоновой кюветы покрывали тонким слоем высушенного мембранообразующего раствора. 1.2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (дифитонаил) использовали для формирования плоских двухслойных липидных

мембран (BLM) в декане. Мембраны были сформированы на круглом отверстии площадью 1 мм2 в вертикальной стенке тефлоновой кюветы, как описано в [146], при комнатной температуре (21±1)°С. Перед экспериментами бислой характеризовали путем измерения сопротивления и емкости мембраны. Для оценки удельной емкости мембраны с помощью микроскопа определяли площадь мембраны, образованной на отверстии.

Бислои дифинаила характеризуются высоким электрическим сопротивлением и электрической стабильностью, что является необходимым условием для экспериментов, в которых сигнал, связанный с проводимостью ионного канала, обычно находится в диапазоне единиц пикоампер [147]. Таким образом, мембранные системы, содержащие дифинаил, характеризуются подходящими электрическими свойствами и очень низкой проницаемостью для ионов и воды].

Схема эксперимента была следующей: после формирования мембраны проводили контрольные измерения в течение ~15 мин, затем в цис-камеру (объем 2,5 мл) добавляли 10 мкл соответствующего белка с концентрацией 2 *10⁻⁶M в PBSD, и соответствующий объем раствора PBSD в транскамеру (объем 2,5 мл), чтобы исключить падение давления.

Ток через мембрану измеряли с помощью Ag-AgCl электродов, подключенных к усилителю VA-10X (NPI Electronics GmbH, Tamm, Германия) с сопротивлением обратной связи 5 Гом и константой интегрирования 20 мс. Колебания тока через мембрану регистрировали на компьютере с частотой 1 кГц с использованием 16-разрядного АЦП (E14-440, L-Card, Москва, Россия).

Ток, полученный в экспериментах при постоянном напряжении на мембране, содержал импульсы, которые указывали на повреждение целостности мембраны.

Было показано, что альбумин понижает целостность мембраны, в то время как цитохром d-b5 не показывает особенного влияния. В смеси этих белков было показано, что способность альбумина понижать целостность мембраны уменьшается. Для чистого раствора t-b5 не наблюдалось изменение целостности мембраны.

Далее была разработана методика для создания липидных мембран меньшего диаметра, пригодных для производства нанопорового детектора на базе более доступного липида – азолектина. В рамках работы был создан стенд для изучения

биологических мембран горизонтального расположения. Стенд содержит:

- антивибрационный стол;

- Axopatch 200B;
- оптический микроскоп Motic;

- ячейка для формирования мембраны горизонтального расположения, схема которой представлена на рисунке 9.3;

- экранирующий корпус;

- источник бесперебойного питания.



Рисунок 9.3 – Схема ячейки с горизонтальным расположением мембраны

Ячейка имеет отверстие диаметром 0,5 мм, в котором формируется липидный Ha отрабатывается слой азолектина. стенде техника нанесения липида. Достоинством такого расположения является возможность одновременного визуального наблюдения за формированием мембраны и измерением электрической емкости. Соотнесение площади мембраны и ее емкости позволяет косвенно оценить ее качество. Полученные числовые значения близки к теоретическим и составляют величину от 0,5 до 0,8 мкф/см2. Недостатком ячейки является наличие пузырьков, а также трудность смены раствора. Максимальное время жизни липидного бислоя не превышало 30 минут. Поэтому, далее был изготовлен стенд с вертикальным расположением биологической мембраны разделяющей cis и trans камеры.



Рисунок 9.4- Ячейка с вертикальным расположением мембраны и электронный блок

На рисунке 9.4 представлена ячейка с вертикальным расположением мембраны, содержащая:

- фторопластовую ячейку с двумя камерами, разделенными фторопластовой пленкой толщиной 50 мкм, с отверстием в центре;

– электронный блок, для измерения токов в наноамперном диапазоне и измерения емкости мембраны;

- металлический экранирующий кейс.

Управление работой прибора происходит с помощью программы на языке структурного программирования LabView. Электронный блок специально изготовлен для этих целей и функционально заменяет Axopatch 200B.

На рисунке 9.5 представлена передняя панель виртуального прибора для регистрации емкости сформированной мембраны и значения тока, проходящего через мембрану. Виртуальный прибор позволяет гибко менять условия эксперимента, выбирать условия фильтрации и сохранять данные для последующей обработки. Стенд планируется дооснастить видеокамерой. Компактное расположение ячейки и прибора позволяет разместить его в небольшой металлический корпус, что существенно упрощает борьбу с электромагнитными помехами. В ячейке предусмотрена смена фторопластовой перегородки.



Рисунок 9.5 – Передняя панель виртуального прибора

Для эксперимента была изготовлена серия фторопластовых мембран, в которых лазером проделаны отверстия диаметром 200, 100 и 50 мкм. Переход к отверстиям малого диаметра позволяет снизить емкость мембраны, и как следствие, снизить собственные шумы и расширить полосу пропускания. Однако установлено, вертикальное расположение мембраны в сочетании с малым диаметром отверстия усложняет технику нанесения липида при формировании бислоя.

На следующем этапе планируется провести исследование мембраны вертикального расположения при трех диаметрах исполнения 200, 100 и 50 мкм, выявления их характеристик для дальнейшего использования при создании нанопорового детектора

9.4. Первичные данные, депонированные в SRA (NCBI), перечень идентифицированных мРНК с указанием количества прочтений

9.4.1. Результаты анализа транскриптома клеточной линии Huh7 с использованием нанопорового детектора

Разработанная в рамках отчетного периода Методика анализа транскриптома биологических образцов с использованием нанопорового детектора была применена для анализа транскриптома клеточной линии Huh7 (линия клеток печени человека (гепатокарцинома). Первичные данные – результаты транскриптомного анализа в

формате fastq – были депонированы в базу SRA (NCBI), идентификатор эксперимента PRJNA89357, перечень идентифицированных мPHK с указанием количества прочтений в форме электронной таблицы выложен на странице проекта на сайте ИБМХ (https://www.ibmc.msk.ru/articles/075-15-2021-933).

На Рисунке 9.6 приведен пример экранной формы электронной таблицы с результатами транскриптомного анализа. Данные представлены в геноцентричном формате, где ENSG – идентификатор гена, GeneName – название гена, ENST – идентификатор транскрипта, TransName – название транскрипта, TPM (Transcripts per million) число транскриптов на миллион картированных прочтений, _1, _2, _3 – номер технического повтора эксперимента.

ENSG	GeneName	ENST	TransName	TPM_1	TPM_2	TPM_3
ENSG000000003.15	TSPAN6	ENST00000373020.9	TSPAN6-201	123,5716	137,7603	141,38
		ENST00000612152.4	TSPAN6-204	5,686595	7,273938	8,25721
ENSG000000005.6	TNMD	ENST00000373031.5	TNMD-201	0,903903	0	0
ENSG0000000419.14	DPM1	ENST00000371582.8	DPM1-201	23,33126	0	59,10564
		ENST00000371588.10	DPM1-203	26,49379	49,13854	0
ENSG0000000457.14	SCYL3	ENST00000367771.11	SCYL3-202	6,432862	9,114145	9,23524
		ENST00000367772.8	SCYL3-203	1,408268	0	0
ENSG0000000460.17	C1orf112	ENST00000359326.9	C1orf112-202	10,00113	0	0
		ENST00000472795.5	C1orf112-206	0	0	0,631186
		ENST00000496973.5	C1orf112-208	0	0,653333	0
ENSG0000000971.17	CFH	ENST00000367429.9	CFH-202	0	6,233192	0
		ENST00000630130.2	CFH-206	13,79051	11,10666	0
		ENST00000695969.1	CFH-208	1,807807	0	0
		ENST0000695970.1	CFH-209	0	0	1,96528
		ENST00000695971.1	CFH-210	5,551768	0	0
		ENST0000695976.1	CFH-215	0	2,553886	6,818958
		ENST00000695979.1	CFH-218	0	0	11,15414
		ENST0000695987.1	CFH-224	7,903172	0	2,245933
		ENST0000696027.1	CFH-235	0	3,897113	0

Рисунок 9.6 – Пример экранной формы таблицы данных с результатами анализа клеточной линии Huh7 – перечнем идентифицированных мРНК с указанием количества прочтений (Transcripts per million (TPM) – число транскриптов на миллион картированных прочтений)

Результаты транскриптомного анализа с использованием нанопорового детектора УНУ «Авогадро» содержат информацию об уровне экспрессии сплайсвариантов для каждого гена: одному идентификатору ENSG может соответствовать более одного идентификатора ENST, каждый из которых кодирует отдельную сплайс-форму. Всего в эксперименте получены ненулевые значения TPM для 13 387 генов. Суммарно хотя бы в одном техническом повторе детектировано более 25 тыс. сплайс-вариантов, с максимальным зарегистрированным значением TPM 12 303,4 (ген FTL, кодирует легкую цепь ферритина).

На Рисунке 9.7 представлены гистограммы распределения количества генов

(а) и транскриптов (б), для которых были детектированы транскрипты с ненулевым уровнем ТРМ. Наибольшее количество детектированных сплайс-форм характеризует уровень экспрессии >=0.1 ТРМ. Существенная доля сплайс-форм обнаружена с уровнем ТРМ, превышающим уровень 10, что свидетельствует о существенной представленности соответствующих транскриптов.



Рисунок 9.7 – Распределение числа генов (а) и транскриптов (б), детектированных в образце клеточной линии Huh7 с использованием нанопорового детектора УНУ «Авогадро»

9.4.2. Сопоставление результатов анализа транскриптома с данными транслятома и протеома того же образца

Согласно утвержденной в прошлом году схеме (см. Раздел 9 – Разработка схемы анализа транскриптома в биологических образцах с использованием нанопорового детектора), анализ молекулярной композиции биологических объектов на уровне «ДНК (геном)- мРНК(транскриптом)-белок (протеом)» предполагает наличие «золотого стандарта» для оценки полноты проведения молекулярной инвентаризации в биологических образцах. В качестве «стандарта» было предложено использовать транслятом – совокупность транслируемых (т.е. тех, с которых на рибосомах синтезируется белок) мРНК.

В этом году выполнен пилотный эксперимент по сопоставлению результатов анализа транскриптома, транслятома и протеома одного образца. Для примера выбран образец клеток линии гепатобластомы HepG2 (Коллекция-2-cell-HepG2), исследованный с применением разработанной методики анализа транскриптома в биологических образцах с использованием нанопорового детектора УНУ протеомного «Авогадро» с результатами И транслятомного (RiboSeq) профилирования. В биологическом смысле постановка этого эксперимента позволит количественно оценить в геноцентричном режиме соответствие между результатами молекулярного профилирования на различных уровнях реализации генетической информации (транскриптомном, транслятомном и протеомном) и обосновать выбор «золотого стандарта» для проведения протеомного профилирования биологических образцов.

Узким местом протеомики является то, что сложно выявить причину, по которой белок не идентифицируется в образце: это может быть как биохимическая причина – белок-кодирующий ген не транслируется в конкретном типе биологического материала в определенных условиях, так и техническая – белок транслируется, но в количестве, недостаточном для детекции современными аналитическими методами вследствие их недостаточной чувствительности [148].

Одним из вариантов решения задачи повышения чувствительности является направленный поиск только тех белков, которые транслируются в образце [149]. В сравнении с транслятомом, транскриптом выглядит не очень информативно, поскольку показана транскрипция почти 100% генов [150], что означает реализацию почти всех белок-кодирующих генов на уровне мРНК. Очевидно, что дальнейшая дифференцировка происходит на одном из двух уровней – транслятомном или протеомном. Даже заведомо присутствующие в образце белки не могут быть детектированы классическими методами протеомного анализа в случае, если присутствуют в образце в концентрации менее 10⁻¹²M [151]. Исследование транслятома базируется на обработке транскриптов РНКазами, вследствие чего в образце остаются только те транскрипты, которые находятся в комплексе с рибосомами, т. е. с большей вероятностью могут транслироваться в белки.

Постановка эксперимента анализа транслятома методом RiboSeq проходила в два этапа для выбора оптимальных параметров выполнения методики

экспериментального выделения фракции мРНК, связанной с рибосомами. Каждый из этапов включал выделение одной (первый этап) или двух областей (второй этап) на геле и последующее секвенирование (секвенирование выполнялось специалистами ООО «ГЕНОАНАЛИТИКА»).

На первом этапе вырезали область на геле, которая ограничивалась ДНКолигонуклеотидами длиной 25 и 35 нуклеотидов (синтезированы компанией «Евроген», Россия). Фактически это занизило размер РНК, отобранной для анализа, поскольку оказалось, что ДНК-олигонуклеотиды имеют более высокую электрофоретическую подвижность в сравнении с РНК-олигонуклеотидами в этой области размеров (Рисунок 9.8, результаты секвенирования и описание результатов первого этапа анализа транслятома представлено далее).

На втором этапе вырезали две области на геле. Одна из них была ограничена РНК-олигонуклеотидами длиной 25 и 35 нуклеотидов (образец "bottom" (btm). РНКолигонуклеотиды синтезированы компанией «Синтол» (Россия). Эта область соответствует по электрофоретической подвижности ДНК-маркерам длиной 30 и 40 нуклеотидов (использовался коммерческий набор ДНК-маркеров "20/100 Oligo Length Standards" производства IDT). Одновременно была вырезана также и лежащая выше нее область, ограниченная ДНК-маркерами длиной 40 и 45 нуклеотидов (образец "top").

На первом этапе проводили для одного и того же образца (вырезанного из геля участка) как транскриптомное, так и транслятомное профилирование. Для транскриптомного профилирования осуществляли подготовку трех мРНК библиотек и ИХ дальнейшее высокопроизводительное секвенирование ПО технологии SBS на приборе Illumina HiSeq с парноконцевым прочтением длиной не менее 100 п.о., с гарантированным получением не менее 30 млн. ридов в каждом случае. Для транслятомного профилирования осуществляли подготовку трех мРНК библиотек (мРНК-футпринты) И ИХ дальнейшее высокопроизводительное секвенирование по технологии SBS на приборе Illumina HiSeq с полным одноконцевым прочтением последовательностей мРНК-футпринтов длиной от 25 до 35 п.о., с гарантированным получением не менее 50 млн. ридов в каждом случае.



Рисунок 9.8 – (а) Электрофоретическая очистка рибосомных футпринтов для транлатома на технологической платформе секвенирования Illumina. *Денатурирующий 12% полиакриламидный гель: буфер трис-борат-ЭДТА; окраска* геля флуоресцентным красителем SYBR Green I. Слева от геля указаны размеры ДНК-олигонуклеотидов в нуклеотидах (нт) для электрофоретической дорожки 1, справа – размеры (нт) ДНК-маркеров коммерческого набора «20/100 Oligo Length Standards» (IDT, США) на электрофоретической дорожке 2. Электрофоретическая дорожка 3 – препарат РНК, содержащий рибосомные футпринты. Участок геля, вырезанный для элюции фрагментов РНК, показан на геле прямоугольником. (б) Сравнительный анализ электрофоретической подвижности ДНК- и РНКолигонуклеотидов. Дорожки 1 и 2 – РНК-олигонуклеотиды длиной 25 и 35 нт, соответственно; дорожка 3 – ДНК-маркеры коммерческого набора «20/100 Oligo Length Standards»; дорожки 4 и 5 – ДНК-олигонуклеотиды длиной 25 и 35 нт, электрофореза соответственно. Условия как на рисунке (A).*(B)* Электрофоретическая очистка рибосомных футпринтов для секвенирования транслятома на технологической платформе Illumina. Дорожка 1 – ДНК-маркеры коммерческого набора «20/100 Oligo Length Standards» (слева указаны размеры в нт); дорожки 2 и 3 – препарат РНК, содержащий рибосомные футпринты. Участки геля, вырезанные для элюции фрагментов РНК, показаны на рисунке прямоугольниками. Верхние участки ("top") соотносятся с размерами ДНКмаркеров от 40 до 45 нт, нижние участки ("bottom") – с размерами от 30 до 40 нт. Размер ДНК-маркеров 30-40 нт соответствует длине РНК-фрагментов 25-35 нт. Условия электрофореза как на как на рисунке (A)

Проведение пробоподготовки, параметры транскриптомного и транслятомного секвенирования и анализа данных

Тотальная РНК использовалась для получения полиА фракции при помощи олигоТ магнитных шариков Dynabeads® mRNAPurificationKit (Ambion) согласно инструкции к набору. Далее из полиА РНК были приготовлены библиотеки для массового параллельного секвенирования при помощи набора NEBNext® mRNALibraryPrepReagentSet (NEB) согласно инструкции к набору. Концентрация библиотек была в пределах 2-4 нг\мкл, что удовлетворяет рекомендации Illumina. Концентрации определяли при помощи набора Qubit dsDNA HS Assay Kit – (Thermo Fisher Scientific) на приборе Qbit 2.0. Распределение длин фрагментов библиотеки оценивали при помощи набора Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent) методом микроэлектрофореза. Секвенирование проводили на приборе HiSeq1500 (Illumina) с генерацией не менее 30 млн. коротких парноконцевых чтений длинной 100 нуклеотидов для каждого образца. Доля дуплицированных прочтений в среднем примерно 21%. Величина GC-состава в среднем для всех полученных образцов равнялась 51%, что соответствует качественному результату РНК-секвенирования (Таблица 9.3.).

Для приготовления библиотек транслятома использовали набор NEBNext® Small RNA Library Prep Set for Illumina® (NEB) согласно инструкции. Проводили лигирование 5' PHK адаптера, отжиг на него комплиментарного дезоксиолигонуклеотида, лигирование 3' PHK адаптера, обратную транскрипцию и, при помощи ПЦР, получали готовую библиотеку. Концентрацию библиотек определяли при помощи набора Qubit dsDNA HS Assay Kit – (Thermo Fisher Scientific) на приборе Qbit 2.0 и была в диапозоне 4-5 нг\мкл. Pacпределение длин фрагментов библиотеки проводили при помощи набора Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent) методом микроэлектрофореза. Секвенирование проводили на приборе HiSeq1500 (Illumina) с генерацией не менее 50 млн. коротких чтений длинной 50 нуклеотидов для каждого образца. Доля дуплицированных прочтений в среднем примерно 90%. Величина GC-состава в среднем для всех полученных образцов равнялась 52%, что соответствует качественному результату PHK-секвенирования (Таблица 9.3.).

Таблица 9.3. – Перечень характеристик полученных исходных транскриптомных и транслятомных данных, выполненных с помощью технологии Illumina. R1-R3 – код технических повторов транслятомного анализа, T1-T3 – транскриптомного анализа

Название образца	Число исходных чтений	Доля дуплицированных чтений	GC состав
miRNA_R1	59378187	90	52
miRNA_R2	54124442	90	53
miRNA_R3	60142516	90	52
T1	32767094	22	51
T2	30195323	21,5	51
T3	31228666	20	51

При выполнении секвенирования параметры прибора HiSeq1500 (Illumina) составили: плотность кластеров составила 650 К/mm2. Кластеров, удовлетворяющих внутреннему контролю качества прибора – 93±3%. Величина Q30 равна 92% (quality score – предсказатель вероятности ошибки при чтении оснований). Нормальный процент Q30, установленный производителем, составляет ≥85%.

Для получения перечня транскрибируемых генов с указанием уровня экспрессии (TPM) в каждом техн. повторе, полученного при транскриптомном и транслятомном секвенировании были выполнено следующее:

1) Качество полученных ридов проверяли с помощью программы FastQC.

2) Адаптеры удалялись с помощью программы cutadapt (v3.1) с параметрами –trim-n -n 5 -m 14.

3) Программой STAR (версия 2.7.9а) риды картировались на геном hg38 с параметром --outFilterMismatchNmax 3.

4) Подсчет ТРМ был осуществлен программой ТРМCalculator с параметрами -q 10 (минимальное качество картирования рида – 10) -е (позволяет получить ТРМ как для генов, так и для транскриптов).

5) Транскрипты/гены считали экспрессированными в том случае, если значение ТРМ>0 отличалось от нуля.

Перечень транскрибируемых генов с указанием уровня экспрессии (TPM) в каждом техническом повторе, полученном при транскриптомном и транслятомном секвенировании

Суммарно была выявлена экспрессия 36 057 генов при транскриптомном

секвенировании, среди которых 17694 относятся к белок-кодирующими генам (БКГ) согласно базе данных UniProt. В случае транслятома была выявлена экспрессия 35 282 генов, среди которых 18 264 относятся к белок-кодирующими генам (БКГ), согласно базе данных UniProt.

Перечень выявленных генов с их уровнем экспрессии в каждом техническом повторе (а также усреднение) в виде таблицы доступен по ссылке (https://disk.yandex.ru/d/40kCLRUn37NR1w).

На втором этапе для транслятомного профилирования были подготовлены три мРНК библиотеки (мРНК-футпринты) и их дальнейшее высокопроизводительное секвенирование по технологии SBS на приборе Illumina HiSeq 1500 с полным одноконцевым прочтением последовательностей мРНК-футпринтов длиной от 25 до 35 п.о., с гарантированным получением не менее 75 млн. ридов в каждом случае. Протокол проведения пробоподготовки и анализа данных для транслятомного секвенирование использовали тот же, что был использован на первом этапе. Секвенирование проводили на приборе HiSeq1500 (Illumina) с генерацией не менее 50 млн. коротких чтений длинной 50 нуклеотидов для каждого образца (Таблица 9.4.).

Таблица 9.4 — Количество чтений, полученных для каждого предоставленного образцаю Btm1, btm2 – технические повторы

Название образца	Число исходных чтений	
Rad_btm1	132145103	
Rad_btm2	77598500	

Использовали результаты транскриптомного, транслятомного и протеомного анализа клеточной линии HepG2, суммированные в Таблице 9.5. Результаты сопоставляли для белок-кодирующих генов (БКГ) хромосомы 18 человека (хр18, n= 275) и БКГ всего экзома (n=20401, согласно UniProt Release 2022_04).

Уровень	Выборка	Количество генов	
-	-	[детектированных с уровнем сигнала >0]	
Транскриптом	[хромосома18]	275/238	
	[экзом]	20041/16961	
Транслятом	[хромосома18]	275/17543	
	[экзом]	20041/246	
Протеом	[хромосома18]	275/102	
	[экзом]	20041/7542	

Таблица 9.5 – Результаты мультиомного анализа – транскриптомного, транслятомного и протеомного профилирования клеток линии HepG2

Результаты транслятомного профилирования, полученные в рамках данного проекта, сопоставили с результатами RiboSeq анализа других научных групп. Из работы [152] загрузили и проанализировали данные транскриптомного и транслятомного профилирования клеточных линии HeLa (клетки раковой опухоли шейки матки), HBE (бронхиальный эпителий), A549 (аденокарцинома легкого), H1299 (рак легкого). Результаты сравнивали по виду распределения количества белок-кодирующих генов, для которых детектированы транскрипты и трансляты с уровнем экспрессии выше заданного порога (RPKM/FPKM). Результаты представлены на Рисунке 9.9 отдельно для генов хромосомы 18 человека и для всего экзома.

Полученные распределения были сопоставлены с аналогичными данными для клеточной линии HepG2. Результаты первого и второго этапа (различия в области геля, из которой проводился забор материала для секвенирования, см. описание выше) представлены в форме накопительных гистограмм распределения (Рисунок 9.10).



Рисунок 9.9 – Накопительные гистограммы распределения количества белоккодирующих генов, для которых детектированы транскрипты (синий) и трансляты (оранжевый) с уровнем экспрессии выше заданного порога (RPKM). Данные из работы [152]



Рисунок 9.10 — Накопительные гистограммы распределения количества белоккодирующих генов, для которых в клеточной линии HepG2 в рамках отчетного периода детектированы транскрипты (синий) и трансляты (оранжевый) с уровнем экспрессии выше заданного порога (R(F)PKM) на первом (верхняя строка) и втором (нижняя строка) этапах анализа транслятома

9.10 Рисунки 9.9 И обосновывают целесообразность проведения экспериментальному транслятомного секвенирования согласно протоколу, втором этапе. Полученные на первом этапе предложенному на данные секвенирования не соответствуют ожидаемым – большинство фрагментов (предполагаемых транслятов) зарегистрировано с очень незначительным уровнем экспрессии (менее 0,1 RPKM). Кроме того, получено большое количество коротких (менее 20 пн) фрагментов, что свидетельствует о необходимости корректного выбора полосы геля для вырезания и последующего секвенирования. Именно поэтому была проведена вторая часть эксперимента, с другими маркерами, позволяющая вырезать фрагменты длиной 25-35 пн (ожидаемый транслятом). Альтернативным подходом является полисомное профилирование.

На рисунке 9.11 представлена зависимость уровня экспрессии транслята (ТРМ) от уровня экспрессии транскрипта (ТРМ) для одного и того же белоккодирующего гена. На Рисунке (а) представлены данные по БКГ хромосомы 18 человека, (б) – всего экзома. Видно, что количественной зависимости нет (R2= 0,02 и 0,1, соответственно). Полученные данные свидетельствуют об отсутствии корреляции между уровнем экспрессии транскрипта и соответствующего ему транслята в проведенном эксперименте.



Рисунок 9. 11 – Зависимость уровня экспрессии транслята (Lg(TrLt, TPM) от уровня экспрессии соответствующего ему транскрипта (Lg(TrCr, TPM). По результатам анализа БКГ (а) хромосоомы 18 (б) БКГ всего экзома человека для клеточной линии HepG2

На Рисунке 9.12 приведены диаграммы Венна, отражающие пересечение перечней БКГ, для которых детектированы продукты на транскриптомном, транслятомном и протеомном уровнях. Наибольшее пересечение наблюдается между результатами транскриптомного и транслятомного анализа.

Для количественного представления сходства массивов данных было решено использовать в качестве метрики индекс Танимото [153]. В Таблицах 9.6 и 9.7 представлены значения индекса Танимото, рассчитанные для результатов транскриптомного, транслятомного и протеомного профилирования клеточной линии HepG2. Чем выше значение индекса Танимото, тем больше пересекаются соответсвующие перечни БКГ.

Максимальное значение (0,92/0,90 для экзома) индекс Танимото достигает при сопоставлении списков БКГ, для которых в одном образце детектированы транскрипты и трансляты. Перечни детектированных траснкриптов и белков совпадают существенно меньше – значение индекса Танимото составляет 0.33 (0,31 для экзома), что почти совпадает с данными сопоставления транслятома и протеома.



Рисунок 9.12 — Диаграммы Венна, отражающие пересечение перечней БКГ, для которых детектированы продукты на транскриптомном, транслятомном и протеомном уровнях. По результатам анализа БКГ (а) хромосомы 18 (б) всего экзома человека (ТРМ>0)

Таблица 9.6 – Значения индекса Танимото для наборов мультиомных данных (хромосома 18, n=275, TPM>0)

	Транскриптом	Транслятом	Протеом
Транскриптом	1	0,92	0,33
Транслятом	0,92	1	0,32
Протеом	0,33	0,32	1

Таблица 9.7 - Значения индекса Танимото для наборов мультиомных данных (экзом, n=20401, TPM>0)

	Транскриптом	Транслятом	Протеом
Транскриптом	1	0,90	0,32
Транслятом	0,90	1	0,31
Протеом	0,32	0,31	1a

С использованием предложенной на предыдущем этапе работ схемы анализа транскриптома впервые получен полный транскриптом, транслятом и протеом для хромосомы человека (Рисунок 9.13). Анализ выполнен на примере хромосомы 18, выбранной в качестве объекта исследования российской части проекта «Протеом человека». Результаты проведенного пилотного эксперимента показали, что

дифференцировка продуктов экспрессии генов происходит на протеомном, а не на транслятомном уровне.



Рисунок 9.13 — Геноцентричная визуализация результатов мультиомного анализа белок-кодирующих генов хромосомы 18 человека (образец клеток линии HepG2)

Предложен способ создания с использованием детекторов УНУ «Авогадро» полного геноцентричного молекулярного «портрета» образца, включающего информацию о транскриптомном, транслятомном и прототеомном уровнях реализации закодированной в геноме информации. Предложенный способ раскрывает молекулярные события в геноцентричном масштабе. Тем не менее, транскриптомное И транслятомное профилирования с использованием нанопорового детектора УНУ «Авогадро» позволяют описывать биологические процессы с учетом отдельных сплайс-форм. Результаты анализа данных нанопорового секвенирования клеточной линии Huh7 в контексте сплайс-вариантов представлены в разделе данного отчета на примере сплайс-форм фармакогенов (16).

Работы по пункту 2.9 плана-графика выполнены в полном объеме и соответствуют пунктам 5.23, 6.1.12 и 7.1.24 технического задания.

10. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДЕТЕКЦИИ БЕЛКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕОБРАТИМОГО СВЯЗЫВАНИЯ НА ПОВЕРХНОСТИ АСМ-ЧИПА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ

10.1. АСМ-визуализация поверхности после необратимого связывания белков из биологического образца – сыворотки крови

Для разработки методик, в соответствии с п.2.10 ПГ, был выбран биологический образец – сыворотка здорового добровольца (номер 22_250915, 1994 год рождения). Инкубация АСМ-чипа, функционализированного кросслинкером SuccBB (см раздел 2 Отчета), проходила при ультрафиолетовом облучении с использованием установки UVP Crosslinker CL 3000-L.

Использован следующий лизайн эксперимента. АСМ-чип, функционализированный кросслинкером SuccBB, помещался в 1 мл разбавленного в 102 раз раствора биологического образца и инкубировался в течение 1 часа при УФ-облучении (~ 365 нм). По окончании инкубации первый АСМ-чип проходил стадию трехэтапной отмывки, а в тот же раствор погружался следующий 12 функционализированный АСМ-чип. Всего было выполнено таких последовательных погружений. Дополнительно 1 мл разбавленного в 102 раз раствора биологического образца был взят для контрольных экспериментов, где последовательно инкубировались 3 АСМ-чипа, каждый в течение 3-х часов при следующих параметрах: 1) не функционализированный кросслинкером АСМ-чип инкубировался в разбавленной сыворотке под действием УФ-облучения; 2) активированный кросслинкером SuccBB ACM-чип инкубировался в разбавленной отсутствие УФ-облучения; 3) не функционализированный сыворотке В кросслинкером АСМ-чип инкубировался в разбавленной сыворотке в отсутствие УФ-облучения.

Примеры некоторых ACM-изображений, полученных в ходе рабочих экспериментов, представлены на рисунке 10.1.



Рисунок 10.1 – Типичные АСМ-изображения (слева), полученные в рабочих экспериментах по «обеднению» разбавленной сыворотки здорового добровольца посредством неспецифического связывания белков с поверхностью АСМ-чипов, функционализированных кросслинкером SuccBB (а – 1-е погружение; б – 2-е погружение; в – 5-е погружение; г – 12-е погружение). Сканы 5*5 мкм2, 256*256 точек. Режим АСМ-сканирования – полуконтактный

Как видно из рисунка 10.1, во всех случаях на поверхности визуализируется слой объектов, высота которого незначительно уменьшается от ~6 нм (1-е погружение) до ~4 нм (12-е погружение).

На рисунке 10.2 представлено ACM-изображение, полученное для участка поверхности ACM-чипа, используемого в 12-ом погружение, при сканировании в контактном режиме.



Рисунок 10.2 – ACM-изображение поверхности ACM-чипа, используемого при 12ом погружении, полученное при сканировании в контактном режиме (слева) и соответствующее сечение (справа)

Как видно из рисунка 10.2, при сканировании в контактном режиме высота слоя объектов, визуализированных на поверхности после 12-го погружения в разбавленную сыворотку, также составляет ~4 нм (по данным сечения line 175).

Результаты контрольных экспериментов представлены на рисунке 10.3.



Рисунок 10.3 – АСМ-изображения поверхности АСМ-чипа (слева) и соответствующие сечения (справа) в случае контрольных экспериментов: а) не функционализированный кросслинкером АСМ-чип инкубировался в разбавленной сыворотке под действием УФ-облучения; б) активированный кросслинкером SuccBB ACM-чип инкубировался в разбавленной сыворотке в отсутствие УФ-облучения; в) не функционализированный кросслинкером АСМ-чип инкубировался в разбавленной сыворотке в отсутствие УФ-облучения; в) не функционализированный кросслинкером АСМ-чип инкубировался в разбавленной сыворотке в отсутствие УФ-облучения

Как видно из рисунка 10.3, во всех контрольных экспериментах, независимо от условий, визуализируется слой объектов, высотой ~ 5-7 нм.

Полученные результаты могут свидетельствовать об иммобилизации в виде мультислоев, причем в случае рабочих экспериментов первый иммобилизованный слой, вероятно, ковалентно закрепляется на поверхности и служит основой для формирования последующих слоев белка, но уже с преобладанием физической адсорбции. В контрольных же экспериментах наблюдается сходная картина формирования мультислоев различных белков, в основе которого лежит физическая адсорбция как на поверхности АСМ-чипа, так и на слоях белков. Так, в работе [154] проводилась адсорбционная иммобилизация BSA при разных pH на поверхность слюды. Было показано, что при pH=3 молекулы BSA адсорбируются преимущественно в виде монослоя с высотой 0.7 нм. При pH=6 наблюдается многослойная адсорбция, которая подразумевает, ЧТО последующие слои адсорбируются на монослое. Авторы объясняют это длиннодействующим стерическим взаимодействием, которое превосходит эллектростатические силы отталкивания между белком и поверхностью.

После этапа ACM-сканирования все ACM-чипы были переданы на MC-анализ в целях идентификации белков, а также для уточнения полученных результатов (результаты представлены в разделе 10 настоящего Отчета).

Контрольные и рабочие эксперименты по «обеднению» разбавленной сыворотки посредством неспецифического связывания белков с поверхностью функционализированных АСМ-чипов поставили перед нами ряд задач, требующих решения на дальнейших этапах работы. Решения этих задач могут реализовываться по двум направлениям: 1) повышение эффективности процедуры отмывки АСМ-чипов после иммобилизации белков от физически адсорбировавшихся частиц; 2) увеличение степени разбавления исходного биологического образца.

При разработке методик, соответствующих пунктам 2.10 ПГ, мы уточнили, что разведение исходного биологического образца в 102 раз применимо, если перед сотрудником стоит задача визуализировать иммобилизованные белки в виде мультислоев, в случае задачи по визуализации иммобилизованных белков в виде единичных объектов необходимо повысить степень разбавления исходного биологического образца.

10.2. МС-анализ образцов после необратимого связывания белков из биологического образца – сыворотки крови

Для того чтобы провести молекулярное профилирование протеомного состава биологических образцов с ACM-чипа на масс-спектрометре подбирались условия пробоподготовки основанные на Методике детекции белков с использованием необратимого связывания на поверхности ACM-чипа в модельных растворах, которая была разработана на первом этапе проекта. Также использованы результаты работ, описанные в разделе 3, так как концентрация BSA на ACM-чипе примерно равна концентрации HSA в сыворотке человека, то начальные этапы проведения гидролиза были схожи.

Трипсинолиз белковых объектов проводили непосредственно в объеме раствора, чтобы в горизонтальном положении жидкость покрывала слюду, как было сделано при разработке протокола с модельным белком. Данная конфигурация показала лучший результат при идентификации пептидов для смыва с АСМ-чипа.

Для того чтобы чип был погружен в раствор с трипсином полностью, использовали 10 мкл трипсина с концентраций 0,18 г/л, 20 мкл ТЕАВ (50 мМ), 600 мкл деионизованной воды. Для эффективного перемешивания раствора пробирка размещалась в вортексе на 1 минуту (установка MIX 4) и на 1 минуту на центрифугу при prm 9000 об/мин.

Инкубация ACM-чипа происходила 18 часов в термошейкере (Thermo mixer comfort, Eppendorf) при температуре 40 0С при 850 оборотах в горизонтальном положении, образцы были накрыты фольгой, для сохранения тепла. Далее образцы центрифугировались в течение 10 минут (prm 9000 об/мин) и повторно размещались в вортексе на 10 минут – режим встряхивания (MIX 5), и на 10 минут – режим центрифугирования (prm 9000 об/мин).

Отмывка поверхности ACM-чипов растворителем проводилась с двух сторон для максимальной элюции пептидов с поверхности.

Рабочий раствор матрицы для МС-анализа готовился растворением навески DHB 40 мг в 1 мл в 50% ACN и 0,7% TFA. Подбор состава матрицы осуществлен на первом этапе работ, результаты описаны в отчете за 2021 год. Раствор матрицы выдерживался в ультразвуковой ванне в течение 10 минут до полного растворения навески (визуальная оценка).

Для остановки реакции гидролиза использовалось 100 мкл 0,1% муравьиной кислоты. Далее образцы высушивались в концентраторе SpeedVac Ependorf.

10.2.1. MALDI-MC-анализ

Масс-спектрометрический анализ проводился с использованием массспектрометра AutoFlex III TOF (Bruker Daltonik GmbH, Бремен, Германия), оснащенным азотным лазером с длиной волны эмиссии 337 нм. Калибровку массспектрометра проводили с использованием пептидного раствора 10⁻⁷ М BSA для положительном ионном в режиме. Зарегистрированный масс-спектр был от 660 до 4000 m/z при времени задержки импульса 200 нс. МС-анализу подвергались триптические смеси пептидов с поверхности АСМ-чипов и растворы сывороток.

Масс-спектрометрический анализ был проведен для следующих образцов: 1. смывы с поверхности АСМ-чипа – в результате 12 погружений АСМ-чипов в анализируемый раствор получено 12 образцов;

2. объединенный (пулированый) образец – смешанные 12 образцов из пункта 1);

3. контрольные образцы – образцы смывов с поверхности ACM-чипов, использованных в контрольных эксперимента (см раздел 10.1);

4. неразведенная сыворотка, которая использовалась в АСМ-анализе.

Так как наличие солей каждом образце понижает чувствительность детекции масс-спектрометра, перед каждым из 3х повторов на мишень наносилась калиброванная смесь пептидов 10⁻⁷ М BSA. Калибровка перед измерением образцов смывов с ACM-чипа происходила в режиме Quadratic для 6-8 точек для смеси пептидов 10⁻⁷ М BSA. Количество точек и режим выбирались экспериментально для растворов гидролизованного белка 10⁻⁷ М BSA в соответствии с рекомендациями производителя для данного режима.

Полученные масс-спектры были откалиброваны в программе FlexControl (Bruker Daltonik GmbH, Бремен, Германия), (внешняя калибровка) и FlexAnalysis 2.0 (внутренняя калибровка), для калибровки использовали как минимум 2 пика автолиза трипсина 842.509 и 2211.104 в режиме Linear (по рекомендации производителя Bruker Daltonik GmbH) и в режиме Quadratic при внутренней калибровке по 3 и более пикам HSA.

Далее была составлена пептидная карта HSA (человеческий сывороточный

альбумин), для поиска нужного белка был использован сервис UniProt (https://www.uniprot.org). Для составления пептидной карты при анализе смывов с ACM-чипа был использован сервис ProteinProspector (https://prospector.ucsf.edu) v 6.4.2. Для расщепления трипсином допускалось 2 пропущенных сайта, возможные модификации: Oxidation (M) [16] и Deamidation [155], также в качестве фермента Trypsin/P , то есть допускается возможность, что трипсин режет связь между лизином и аргинином, даже если после аргинина стоит пролин, и для образцов претерпевших алкилирование и восстановление был выбран карбамидометилцистеин в качестве фиксированной модификации [156].

Для нахождения количества идентифицированных пиков в каждом образце был использован шаблон, разработанный при анализе белка модельном растворе в программе Excel Microsoft Office. Результаты, полученные в программе FlexAnalysis, были сопоставлены пептидной картой HSA с помощью шаблона в программе Excel Microsoft Office в пределах 100 ppm. Пептиды, найденные с помощью пептидной карты, анализировались на кератин человеческий 1 и 2 типа, пики для этого белка и удалялись из обработки.

10.2.2. Панорамный анализ

Масс-спектрометрической панорамный анализ был проведен на чувствительном приборе Q ExactiveTM HF Hybrid Quadrupole-OrbitrapTM, Thermo Fisher Scientific, Rockwell, IL, USA), который позволяет проводить панорамный поиск белков и используется в рутинном анализе [157]

Пептиды для каждого образца были разделены с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ, Ultimate 3000 Nano LC System, Thermo Scientific, Rockwell, IL, USA) на колонке C18 длиной 15 см с внутренним диаметром 75 мкм (Acclaim® PepMapTM RSLC, Thermo Fisher Scientific, Rockwell, IL, USA).

Пептиды элюировали градиентом от 5–35% буфера В (80% ацетонитрила, 0,1% муравьиной кислоты) в течение 115 мин при скорости потока 0,3 мкл–1 мин. Общее время работы, включая 90 мин для достижения 99% буфера В, 10 мин промывки 99% буфером В и 15 мин повторного уравновешивания буфером А (0,1% муравьиной кислоты).

Масс-спектрометрические измерения проводили по методике, изложенной в

работе [158]. Анализ проводили с помощью масс-спектрометра Q Exactive HF (массспектрометр Q ExactiveTM HF Hybrid Quadrupole-OrbitrapTM, Thermo Fisher Scientific, Rockwell, IL, USA). Масс-спектры получали с разрешением 60 000 (MC) и 15 000 (MC/MC) в диапазоне m/z 400–1500 (MC) и 200–2000 (MC/MC).

Для каждого смыва с АСМ-чипа и для гидролизованных сывороток измеряли не менее трех технических циклов. Полученные при помощи масс-спектрометра файлы формата RAW анализировали программой MaxQuant (версия 1.5.5.1, Юрген Кокс, Институт биохимии им. Макса Планка, Мартинсрид, Германия) [158] со встроенной поисковой системой Andromeda [159].

Карбамидометилирование цистеинов было установлено как фиксированная модификация, а ацетилирование N-конца белка, а также окисление метионинов было установлено как переменная модификация для поиска пептидов. Максимальное отклонение массы 5 ppm было разрешено для идентификации прекурсора, а 20 ppm были установлены в качестве допустимого отклонения для идентификации фрагментов. Для расщепления трипсином допускалось 2 пропущенных сайта.

Поиск значимых белков с помощью метода PeptideMassFingerprint и с помощью панорамного анализа показал набор значимых белков. Белки, идентифицированные в анализе, принадлежат к разным группам белков и покрывают почти все известные функциональные группы. Результаты работы на данном этапе исследований использованы для разработки Методики детекции белков с использованием необратимого связывания на поверхности АСМ-чипа в биологических образцах. Данный документ разработан в соответствии с п.2.10 ПГ, п.5.24 ТЗ и п 7.1.25 ТЗ и представлен в виде отдельного документа в составе отчетной документации (название документа «Пункт-2.10-ПГ-Методика АСМ»).

Разработанные на данном этапе работ по п. 2.10 ПГ «Методика детекции белков с использованием необратимого связывания на поверхности АСМ-чипа в биологических образцах» и по п. 2.3 ПГ «Методика детекции белков С использованием необратимого связывания на поверхности АСМ-чипа И последующим масс-спектрометрическим анализом в биологических образцах» основой, являются методической которая была использована на этапе экспериментальной работы по молекулярному профилированию протеомного состава биологических образцов (коллекция К1) с использованием молекулярного

детектора АСМ в комбинации с масс-спектрометрическим анализом (результаты работы описаны далее в разделе 11).

Работы по пункту 2.10 плана-графика выполнены в полном объеме и соответствуют пунктам 5.24 и 7.1.25 технического задания.

11. МОЛЕКУЛЯРНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ПРОТЕОМНОГО СОСТАВА БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ (КОЛЛЕКЦИЯ К1) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДЕТЕКТОРА АСМ В КОМБИНАЦИИ С МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ АНАЛИЗОМ

11.1. АСМ-визуализация поверхности после необратимого связывания белков из биологического образца – плазмы крови

Проведены эксперименты, необходимые для реализации молекулярного профилирования протеомного состава биологических образцов (коллекция К1) с использованием молекулярного детектора АСМ в комбинации с массспектрометрическим анализом (п. 2.11 ПГ).

Эксперименты включали В себя стадию инкубации АСМ-чипа с SuccBB функционализированной кросслинкером поверхностью В растворе биологического образца из коллекции К1 под действием УФ-облучения, согласно описанию, в Методиках из соответствующий пунктов данного отчета (раздел 3 и 10). В качестве биологического образца была взята ЭДТА плазма мужчины-добровольца возрастом 45 лет ((п/п 26; группа 1; индекс случая: CIDp520007735).

Для рабочих экспериментов исходный образец плазмы подвергался разведению в 102, 104 и 106 раз. Контрольные эксперименты проводились также для каждой степени разведения: 1) функционализированный SuccBB ACM-чип инкубировался в 1 мл раствора биологического образца соответствующей степени разведения (контроль 1); 2) не функционализированный SuccBB ACM-чип (на поверхности только слой АПТЭС) инкубировался в 1 мл раствора биологического образца соответствующей степени разбавления под действием УФ-облучения (контроль 2).

Результаты ACM-сканирования поверхности ACM-чипов для рабочего и контрольных экспериментов при разведении исходного образца ЭДТА плазмы в 102 раз представлены на рисунке 11.1.



Рисунок 11.1 – Типичные ACM-изображения поверхности ACM-чипов для рабочего и контрольных экспериментов (слева) и соответствующие сечения (справа): а) функционалзированный SuccBB ACM-чип после инкубации в 1 мл разбавленного в 102 раз раствора биологического образца коллекции K1 под действием УФоблучения (рабочий эксперимент); б) функционализированный SuccBB ACM-чип после инкубации в 1 мл разбавленного в 102 раз раствора биологического образца коллекции K1 без УФ-облучения (контроль 1); в) не функционализированный SuccBB ACM-чип (на поверхности только слой АПТЭС) после инкубации в 1 мл разбавленного в 102 раз раствора биологического образца коллекции K1 под действием УФ-облучения (контроль 2)

Как видно из рисунка, при разбавлении исходного биологического образца плазмы ЭДТА в 102 раз, сохраняется тенденция образования мультислоев как в рабочем, так и в контрольных экспериментах, что согласуется с данными, полученными ранее для сыворотки (раздел 10). В случае рабочего эксперимента высота визуализированного на поверхности АСМ-чипа мультислоя может достигать до 6 нм, в случае контроля 1 и контроля 2 – до 6 нм и 3 нм, соответственно.

Результаты ACM-сканирования поверхности ACM-чипов для рабочего и контрольных экспериментов при разведении исходного образца ЭДТА плазмы в 104 раз представлены на рисунке 11.2.

Как видно из рисунка 11.2, при разбавлении исходного биологического образца плазмы ЭДТА в 104 раз, в случае рабочего эксперимента на поверхности АСМ-чипа визуализируется значительное количество компактных объектов, высоты которых составляют до 6 нм (рисунок 11.2, а). В случае контроля 1, на поверхности также визуализируются компактные объекты с высотами до 6 нм, но в меньшем количестве (рисунок 11.2, б). В случае контроля 2 подобные объекты практически отсутствуют (рисунок, в).

Результаты ACM-сканирования поверхности ACM-чипов для рабочего и контрольных экспериментов при разведении исходного образца ЭДТА плазмы в 106 раз представлены на рисунке 11.3.



Рисунок 11.2 – Типичные ACM-изображения поверхности ACM-чипов для рабочего и контрольных экспериментов (слева) и соответствующие сечения (справа): а) функционалзированный SuccBB ACM-чип после инкубации в 1 мл разбавленного в 102 раз раствора биологического образца коллекции K1 под действием УФоблучения (рабочий эксперимент); б) функционализированный SuccBB ACM-чип после инкубации в 1 мл разбавленного в 102 раз раствора биологического образца коллекции K1 без УФ-облучения (контроль 1); в) не функционализированный SuccBB ACM-чип (на поверхности только слой АПТЭС) после инкубации в 1 мл разбавленного в 102 раз раствора биологического образца К1 под действием УФ-облучения (контроль 2)


Рисунок 11.3 – Типичные ACM-изображения поверхности ACM-чипов для рабочего и контрольных экспериментов (слева) и соответствующие сечения (справа): а) функционалзированный SuccBB ACM-чип после инкубации в 1 мл разбавленного в 102 раз раствора биологического образца коллекции K1 под действием УФоблучения (рабочий эксперимент); б) функционализированный SuccBB ACM-чип после инкубации в 1 мл разбавленного в 102 раз раствора биологического образца коллекции K1 без УФ-облучения (контроль 1); в) не функционализированный SuccBB ACM-чип (на поверхности только слой АПТЭС) после инкубации в 1 мл разбавленного в 102 раз раствора биологического образца коллекции K1 под действием УФ-облучения (контроль 2)

Как видно из рисунка 11.3, при разбавлении исходного биологического образца плазмы ЭДТА в 106 раз, в случае рабочего эксперимента на поверхности АСМ-чипа визуализируются как компактные объекты с высотами до 5 нм, так и фрагменты слоя с высотами ~2 нм. В случае контроля 1 и контроля 2, на поверхности АСМ-чипа также визуализируются компактные объекты с высотами 1,5 – 3 нм и фрагменты слоя с высотами 1 – 2 нм.

Таким образом, по полученным предварительно результатам наиболее привлекательными являются разведения исходного образца плазмы в 104 и 106 раз, так как они позволяют добиться визуализации единичных объектов и обособленных фрагментов слоя. Однако, для уточнения результатов необходимо большее количество повторов данного эксперимента. Все АСМ-чипы после стадии АСМсканирования передавались далее на МС-анализ для идентификации белков.

11.2. Результаты МС-анализа образцов- смывов с поверхности АСМ-чипов после инкубации в биологическом образце

Для проведения молекулярного профилирования протеомного состава биологических образцов выловленных на ACM-чип был проведен MALDI-MC с использованием масс-спектрометра AutoFlex III TOF анализ и панорамный анализ с помощью масс-спектрометра Q Exactive HF. Данные с масс-спектрометров были обработаны с помощью биоинформатического анализа. Для данных полученных от масс-спектрометра AutoFlex III TOF, были найдены пептиды белка HSA с помощью шаблона основанном на методе PeptideMassFingerprint в таблице Excel, был выполнен поиск значимых белков с помощью метода PeptideMassFingerprint с использованием сервиса Mascot. Для панорамного анализа, выполненного с помощью масс-спектрометра Q Exactive HF, результаты были обработаны в программе Perseus. В работе, для стадии MC-анализа, использованы образцы ACMчипов описанные выше в разделе 10.1 и в разделе 11.1.

11.2.1. Количественный анализ пептидов HSA при MALDI-MC-анализе

Анализ полученных данных был проведен с точки зрения количества идентифицированных пептидов для белка HSA для 12 погружений последовательно, для смеси из 12 погружений, для 3 контролей, а также для сывороток: после 12 погружений АСМ-чипа, после 3 погружений АСМ-чипа, для свежеприготовленной сыворотки, и свежеприготовленной сыворотки, прошедшей алкилирования и



Рисунок 11.4 – Гистограмма, отображающая результаты MALDI-MC-анализа для растворов и смывов с поверхности ACM-чипов. По оси X отложены названия образцов. Цифры 1-12 -порядок погружений, смесь 12 –пулированая смесь из образцов смывов после всех погружений, K1 – смыв с контрольного ACM-чипа 1, K2смыв с контрольного с ACM-чипа 2; K3 – смыв контрольного с ACM-чипа 3; «Сыворотка после 12 погружений» -сыворотка использованная для 12-ти погружений–прошедшая гидролиз; «сыворотка после 3 погружений» – сыворотка использованная для 2 тогружений ACM-чипа прошедшая гидролиз; «сыворотка е сыворотка использованная сыворотка без погружений ACM-чипа, прошедшая гидролиз; акиворотка без погружений ACM-чипа, прошедшая гидролиз; акиворотка без погружений ACM-чипа, прошедшая использованная сыворотка сыворотка без погружений ACM-чипа, прошедшая исполиз; акиворотка использованная сыворотка без погружений ACM-чипа, прошедшая исполиз; акиворотка сыворотка без погружений ACM-чипа, прошедшая исполиз; акиворотка без погружений ACM-чипа, прошедшая исполиз; акиворотка исполиз исполиз исполиз исполиз и и последующий и и последующи и последующи и и последующи и последии и последующи и и п

Количественный анализ пептидов показал, что свежеприготовленная сыворотка, прошедшая алкилирование и восстановление и последующий гидролиз, имеет на 10 пиков HSA больше, чем свежеприготовленная сыворотка, прошедшая только гидролиз. Это может означать то, что пробоподготовка включающая стадию алкилирования и восстановления, предполагает восстановление остатков цистеина – разрыв S-S-связей из-за чего белок должен развернуться и количество свободных сайтов для гидролиза должно увеличиться [9,160].

Для 1-12 погружения АСМ-чипа видно, что количество найденных пептидов отвечает равномерному распределению. Для того чтобы уменьшить количество пептидов, принадлежащих альбумину, найденного в биологических образцах, нужно провести большее количество погружений.

11.2.2. Результаты поиска значимых белков с помощью метода PeptideMassFingerprint

11.2.2.1. Результаты МС-анализа образцов, полученных после погружения АСМчипа в сыворотку

Для каждого из 12 погружений, а также для смеси 12 погружений был проведен анализ полученных данных с точки зрения количества идентифицированных пептидов методом PeptideMassFingerprint. Виртуальный гидролиз трипсином всех белков был сделан в базе данных Peptide Mass Fingerprint (Mascot Daemon, Matrix Science, London, UK).

Для каждого погружения и смеси результаты поиска самых высокоинтенсивных белков с помощью метода PeptideMassFingerprint представлены в таблице 11.1. В таблице в столбцах Белок 1- Белок 2- Белок 3 отражена информация о трех наиболее высоко представленных в исследуемом образце белках.

Таблица 11.1 – Результаты метода PeptideMassFingerprint для каждого смыва с АСМ-чипа для каждого погружения, смеси и контроля (К1 – смыв с контрольного с *АСМ-чипа для 1 погружения без фотокросслинкера SuccBB, при UV (T=25 оС в 1 мл* разбавленной сыворотки), К2- смыв с контрольного с АСМ-чипа 2 погружения при использовании фотокросслинкера SuccBB, без UV, КЗ – смыв контрольного с АСМчипа без фотокросслинкера SuccBB без UV). Столбцы Белок 1, Белок 2, Белок 3 состоят из полного названия, кодировки Uniprot, массы в кДА, и количество найденных пиков для каждого белка, а также краткого описания функций данного

000000000000			
Погружение	Белок 1	Белок 2	Белок 3
1	Albumin	Folliculin-interacting	Filamin A-interacting
	ALBU HUMAN	protein 2	protein 1-like
	Macca:69321	FNIP2 HUMAN Macca:	FIL1L HUMAN
	Кол-во пиков: 16	122038	Macca:130301
		Кол-во пиков: 23	Кол-во пиков: 29
2	Motile sperm domain-	Histone H3.1	Histone H3.2
	containing protein 2	H31 HUMAN	H32 HUMAN
	MSPD2 HUMAN Macca:	Macca: 15394	Macca: 15379
	59708	Кол-во пиков: 2	Кол-во пиков: 2
	Кол-во пиков: 4		
3	Zinc finger protein 394	Transcription elongation	Pleckstrin homology
	ZN394_HUMAN	factor A protein-like 8	domain-containing family
	Macca: 64216	TCAL8_HUMAN Macca:	O member 1
	Кол-во пиков: 6	13608	PKHO1_HUMAN
		Кол-во пиков: 6	Macca: 46209
			Кол-во пиков: 4.
4	Albumin	Echinoderm microtubule-	Glutaminefructose-6-
	ALBU_HUMAN Macca:	associated protein-like6	phosphate aminotransferase
	69321	EMAL6_HUMAN	[isomerizing]
	Кол-во пиков: 20	Macca:217761	GFPT2_HUMAN
		Кол-во пиков: 35.	Macca: 76882
			Кол-во пиков: 21
5	Zinc finger protein 384	ERO1-like protein alpha	F-box DNA helicase 1
	ZN384_HUMAN Macca:	ERO1A_HUMAN Macca:	FBH1_HUMAN
	63179	54358	Macca: 117611
	Кол-во пиков: 7	Кол-во пиков: 6	Кол-во пиков: 10
6	Zinc finger protein 467	Molybdopterin synthase	Albumin
	ZN467_HUMAN Macca:	sulfur carrier subunit	ALBU_HUMAN
	65083	MOC2A_HUMAN Macca:	Macca: 69321
	Кол-во пиков: 8	9749	Кол-во пиков: 10
		Кол-во пиков: 3	
7	Solute carrier family 12	Translocating chain-	BTB/POZ domain-
	member 7	associated membrane	containing protein
	S12A7_HUMAN	protein 1-like	KCTD1_HUMAN
	Macca: 119029	1TR1L1_HUMAN	Macca: 29386
		Macca:42135	Кол-во пиков: 8
		Кол-во пиков: 7	
8	Albumin	60S ribosomal protein L3-	DNA damage-inducible
_	ALBU HUMAN Macca:	like RL3L HUMAN	transcript 3 protein
	69321	Macca: 46267	DDIT3 HUMAN Macca:
	Кол-во пиков: 22	Кол-во пиков: 14	19163
			Кол-во пиков: 7

белка из базы данных Uniprot

Погружение	Белок 1	Белок 2	Белок 3
9	Albumin	Molybdopterin synthase	Cilia- and flagella-
	ALBU_HUMAN	sulfur carrier subunit	associated protein 141
	Macca:69321	MOC2A_HUMAN	CP141_ĤUMAN
	Кол-во пиков: 6	Macca:9749	Macca: 12123
		Кол-во пиков: 3	Кол-во пиков: 4
10	Albumin	Serine protease 33	Immunoglobulin iota chain
	ALBU_HUMAN Macca:	PRS33_HUMAN	VPREB_HUMAN
	69321	Macca:29768	Macca: 16594
	Кол-во пиков: 13	Кол-во пиков: 5	Кол-во пиков: 4
11	Protein SPT2 homolog	Albumin	Molybdopterin synthase
	SPT2_HUMAN Macca:	ALBU_HUMAN Macca:	sulfur carrier subunit
	75553	69321	MOC2A_HUMAN Macca:
	Кол-во пиков: 8	Кол-во пиков: 7	9749
			Кол-во пиков: 3
12	Albumin	Nuclear nucleic acid-	Transcriptional activator
	ALBU_HUMAN Macca:	binding protein C1D	protein Pur-alpha
	69321	C1D_HUMAN Macca:	PURA_HUMAN Macca:
	Кол-во пиков: 16	16009 Кол-вопиков: 5	34889
			Кол-во пиков: 7
К1	Epidermal growth factor	T cell receptor beta	Mitochondrial pyruvate
	receptor kinase substrate 8-	variable14	carrier 1-like protein
	like protein	TVB14_HUMAN Macca:	MPC1L_HUMAN Macca:
	2ES8L2_HUMAN Macca:	12872	15128
	80570	Кол-во пиков: 4	Кол-во пиков: 4
	Кол-во пиков: 11		
К2	Albumin	Ski-like protein	Coiled-coil domain-
	ALBU_HUMAN Macca:	SKIL_HUMAN Macca:	containing protein 66
	69321	76927	CCD66_HUMAN
	Кол-во пиков: 25	Кол-во пиков: 21	Масса:109343 Кол-
			вопиков: 32
К3	Albumin	Molybdopterin synthase	DAN domain family
	ALBU_HUMAN Macca:	sulfur carrier subunit	member 5
	69321	MOC2A_HUMAN Macca:	DAND5_HUMAN Macca:
	Кол-во пиков: 13	9749	20166
		Кол-во пиков: 3	Кол-во пиков: 4

Как видно из таблицы 11.1, самый часто встречаемый и высокоинтенсивный белок – это HSA.

Пример МС-спектров для случаев 1-го, 12-го погружения, а также смеси из 12-ти образцов представлены на рисунке 11.5. Как видно из рисунка 11.5, спектр для образца после 12-го погружения имеет меньше пиков, чем спектр образца после 1-го погружение, однако спектр смеси из образцов из 12-ти погружений имеет большее количество пептидов, чем образец после последнего 12-го погружение.



Рисунок 11.5 – MALDI-спектры смыва с ACM-чипа при разных погружениях в сыворотку, а) – 1-ое погружение, б) – 12-ое погружение, с) – смесь образцов после 12-ти погружений (пулированый образец)

11.2.2.2. Результаты МС-анализа образцов -сывороток, разбавленные образцы которых были использованы для погружения АСМ-чипа

Для гидролизованных сывороток был также проведен анализ полученных данных с точки зрения количества идентифицированных пептидов методом PeptideMassFingerprint. (MascotDaemon, MatrixScience, London, UK). Результаты поиска с помощью метода PeptideMassFingerprint для показаны в таблице 11.2, в столбцах которой приведены сведения от трех наиболее представленных в образцах белках.

Пример полученных MC-спектров представлены на рисунке 11.6. Как видно из рисунка 11.6, MC анализ оказался более эффективен для идентификации белков в сыворотке, прошедшей стадию алкилирования и восстановления, так как спектр является более интенсивным и насыщенным пептидами.

Таблица 11.2 – Результаты метода PeptideMassFingerprint для анализа сыворотки, после этапов алкилирования и восстановления, и последующего гидролиза, и сыворотки, только после этапа гидролиза. Столбцы Белок 1, Белок 2, Белок 3 состоят из полного названия, кодировки Uniprot, массы в кДА, и количество найденных пиков для каждого белка

Сыворотка	Белок 1	Белок 2	Белок 3
Алкилирование и	Albumin	Transcriptional	DNA topoisomerase
восстановление,	ALBU_HUMAN Macca:	activator protein Pur-	2-beta
гидролиз	71317	beta	TOP2B_HUMAN
_	Кол-во пиков: 25	PURB_HUMAN	Macca: 184122
		Macca:33392	Кол-вопиков: 25
		Кол-во пиков: 9	
Гидролиз	Albumin	ADP-ribosylation	HAUS augmin-like
_	ALBU_HUMAN	factor-related protein 1	complex subunit
	Macca: 69321	ARFRP_HUMAN	HAUS5_HUMAN
	Кол-во пиков: 15	Macca:22599	Масса:71638 Кол-
		Кол-вопиков: 7	вопиков: 14



Рисунок 11.6 — MALDI-спектры для образцов сыворотки, претерпевшей алкилирование и восстановление и последующий гидролиз — а), и для сыворотки, прошедшей только гидролиз — б).

11.2.3. Результаты профилирования с помощью панорамного МС-анализа

Для биоинформатического анализа данных полученных с помощью программы MaxQuant, для каждого смыва с ACM-чипа (12 погружений и 3 контроля), для смеси из 12 образцов, а также для 2 гидролизованных сывороток (с этапом алкилирования и восстановления, и без данного этапа) был проведен анализ полученных с помощью программы Perseus, версия 2.0.6.0

(«Мах Planck Institute of Biochemistry», Германия) [161]. Для каждого погружения сравнивались данные масс-спектрометрического анализа на основании площади под пиком родительского иона с вычислением величины LFQ с помощью встроенного алгоритма[162,163].

По результатам протеомного профилирования смывов с ACM-чипов были идентифицированы 110 и 24 белка для гидролизованных сывороток белков как минимум по 2 протеотипическим пептидам.

11.2.3.1. Результаты МС-анализа образцов, полученных после погружения АСМчипа в сыворотку

По результатам протеомного профилирования для случая после первого погружения было найдено 62 белка, а для последнего, 12, погружения – 102 белка.

На рисунке 11.7 с помощью таблицы корреляции демонстрируются различия в результатах MC-анализа образцов, полученных после погружения ACM-чипа в образец разбавленной сыворотки. Анализируется интенсивность и представленность (наличие/отсутствие) белка в образце. Каждый белок представлен квадратным маркером на графиках. Как видно из таблицы наименьшие значения коэффициента Пирсона наблюдаются в случае образцов, полученных после первых трех погружений, что свидетельствует об отличии данных, полученных в этих случаях от данных, полученных для других образцов. На основании полученных данных можно предположить сходство белковых составов в образцах, начиная со случая 4-го погружения.

На рисунке 11.8 представлен график зависимости полученных данных для образцов после 1-го и 12-го погружения. По оси Y указана интенсивность найденных белков в случае 12-го погружении, по оси X – в случае 1-го погружения АСМ-чипа в раствор разбавленной сыворотки.



Рисунок 11.7 — Таблица корреляции интенсивности (LFQ) найденных белков для образцов -смывов с поверхности АСМ-чипов после 12-ти погружений в образец разбавленной сыворотки. Номерами обозначены погружения АСМ-чипа в сыворотку. Для каждой зависимости проведен коэффициент корреляции Пирсона (сиреневый шрифт)



Рисунок 11.8 – Зависимость интенсивности (LFQ) идентифицированных белков в образцах смывов с поверхности АСМ-чипов после 1-го и 12-го погружения. Коэффициент корреляции Пирсона определён как 0,35, что свидетельствует об отсутствии прямой зависимости между данными для разных образцов

На рисунке 11.9 представлен график зависимости полученных данных для образцов после 10-го и 12-го погружения. По оси Y указана интенсивность найденных белков в случае 12-го погружении, по оси X – в случае 10-го погружения АСМ-чипа в раствор разбавленной сыворотки.



Рисунок 11.9 – Зависимость интенсивности (LFQ) идентифицированных белков в образцах смывов с поверхности ACM-чипов после 10-го и 12-го погружения. Коэффициент корреляции Пирсона определён как 0,95, что свидетельствует о приближении к прямой зависимости между данными для разных образцов

Как видно из рисунков 11.8 и 11.9, по мере увеличения количества погружений в разбавленную сыворотку различных АСМ-чипов, корреляция данных МС-профилирования между образцами возрастает. Данные по составу (три наиболее высоко представленных белка) представлены в таблице 11.3

Таблица 11.3 – Результаты панорамного анализа образцов- смывов с АСМ-чипа после 1-го, 2-го, 3-го и 12-го погружения, а также образцов – разбавленной сыворотки, которая была использована для погружения, и пулированого образца- смеси смывов с поверхности после всех погружений. Столбцы Белок 1, Белок 2, Белок 3 отражают сведения о белках, представленных в образцах по максимальной интенсивности пиков в спектре, сведения состоят из полного названия, кодировки Uniprot, массы в кДА

Погружения	Белок 1	Белок 2	Белок 3
1	Hemoglobin subunit beta HBB_HUMAN	Gelsolin	Complement C3
	Macca:15.998	GELS_HUMAN	CO3_HUMAN
	Участвует в транспорте кислорода от	Macca:85.698	Macca: 187.148
	легких к различным периферическим	Регулируемый кальцием, актин-модулирующий	СЗ играет центральную роль в
	тканям.	белок, который связывается с положительными	активации системы комплемента.
		(колючими) концами актиновых мономеров или	
		филаментов.	
2	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	Complement C3	Kininogen-1
	IGHG1_HUMAN	CO3_HUMAN	KNG1_HUMAN
	Macca:36.106	Macca: 187.148	Macca:71.957
	Константный участок тяжелых цепей	СЗ играет центральную роль в активации системы	Кининогены являются ингибиторами
	иммуноглобулина. Иммуноглобулины,		цистеиновых протеаз. HMW-кининоген
	также известные как антитела,		играет важную роль в свертывании
	представляют собой связанные с		крови.
	мембраной или секретируемые		
	гликопротеины, продуцируемые В-		
	лимфоцитами.		
2	0 1 402		T 1111
3	Complement C3	Gelsolin	Immunoglobulin heavy constant gamma I
	CO3_HUMAN	GELS_HUMAN	IGHGI_HUMAN Magagy26,106
	Macca: 187.148	Macca:85.098	
	СЗ играет центральную роль в	Регулируемый кальцием, актин-модулирующий	Константный участок тяжелых цепей
	активации системы	оелок, которыи связывается с положительными	иммуноглооулина. иммуноглооулины,
		(колючими) концами актиновых мономеров или	также известные как антитела,
		филаментов.	представляют сооои связанные с
			меморанои или секретируемые
			гликопротеины, продуцируемые В-
			лимфоцитами.

Погружения	Белок 1	Белок 2	Белок 3
12	Complement C3	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	Serotransferrin TRFE_HUMAN
	CO3_HUMAN	IGHG1_HUMAN	Macca:77.050
	Macca: 187.148	Macca:36.106	Трансферрины – это
	СЗ играет центральную роль в	Константный участок тяжелых цепей	железосвязывающие транспортные
	активации системы	иммуноглобулина. Иммуноглобулины, также	белки, которые могут связывать два
		известные как антитела, представляют собой	иона Fe3+ в ассоциации со связыванием
		связанные с мембраной или секретируемые	аниона, обычно бикарбоната.
		гликопротеины, продуцируемые В-лимфоцитами.	-
		В-лимфоцитами.	
Смесь 12	Kininogen-1	Platelet basic protein	Complement C3
	KNG1_HUMAN	CXCL7_HUMAN	CO3_HUMAN
	Macca:71.957	Macca:13.894	Macca: 187.148
	Кининогены являются ингибиторами	LA-PF4 стимулирует синтез ДНК, митоз, гликолиз,	СЗ играет центральную роль в
	цистеиновых протеаз. HMW-кининоген	внутриклеточное накопление цАМФ, секрецию	активации системы
	играет важную роль в свертывании	простагландина Е2 и синтез гиалуроновой кислоты	
	крови.	и сульфатированного гликозаминогликана. Он	
		также стимулирует образование и секрецию	
		активатора плазминогена синовиальными клетками	
		человека. NAP-2 является лигандом для CXCR1 и	
		CXCR2, a NAP-2, NAP-273, NAP-274, NAP-2(1-66)	
		и наиболее активный NAP-2(1-63) являются	
		хемоаттрактантами и активаторами нейтрофилов.	
		TC-1 и TC-2 представляют собой	
		антибактериальные белки, высвобождаемые in vitro	
		из активированных альфа-гранул тромбоцитов.	
		СТАР-III (1-81) более эффективно, чем СТАР-III,	
		десенсибилизирует активацию нейтрофилов,	
		индуцированную хемокинами.	

Результаты MC-анализа контрольных образцов в сравнении с результатами анализа пулированого образца, резюмированы в таблице 11.4 и 11.5.

Таблица 11.4 – Количество найденных белков в пулированом образце – смесь смывов с поверхности ACM-чипов после 12-ти погружений, образец K1 – смыв с контрольного ACM-чипа 1 (погружение чипа с неактивированной поверхностью, инкубация при UV облучении); образец K2- смыв с контрольного с ACM-чипа 2 (погружение чипа с активированной поверхностью, инкубация без облучения; образец K3 – смыв с контрольного с ACM-чипа (поверхность чипа не активирована, инкубация без облучения). «+» в ячейке отражает наличие белков в количестве, приведенном в колонке «Количество найденных белков»

Пулированный образец	K1*	K2*	K3*	Количество найденных белков
+	+	+	+	101
+	+		+	5
+	+	+		1
	+	+	+	2
+		+	+	1

К1* – Контрольный эксперимент: 1 мл разбавленной сыворотки сыворотки; 1-ое погружение для слюды; разбавленная в 100 раз сыворотка в буфере PBSD на силанизированную слюду; инкубация 3 часа при UV при T=25 оС в 1 мл раствора сыворотки; отмывка в 3 стадии с Emg 913.

K2* – Контрольный эксперимент: 1 мл разбавленной сыворотки; 2-ое погружение для слюды ; разбавленная в 100 раз сыворотка в буфере PBSD на силанизированную слюду, активированную фотокросслинкером SuccBB; инкубация 1 час без UV при T=25 оС; отмывка в 3 стадии с Emg 913.

К3* – Контрольный эксперимент: 3-ое погружение для слюды в 1 мл разбавленной в
100 раз сыворотки; силанизированная слюда с неактивированной поверхностью; инкубация
1 час без UV при T=25 оС ; отмывка в 3 стадии с Emg 913.

Таблица 11.5 – Коэффициент Пирсона, посчитанный для результатов МС-анализа контрольных образцов и пулированого образца – смеси из смывов с поверхности ACM-чипов после 12-ти погружений

	K1	К2	К3
Пулированый образец	0,86	0,86	0,90

Из таблицы 11.5, видно, что между результатами, полученными для контрольных образцов и результатами анализа пулированого образца есть прямая корреляция. Однако, в образце К1 не найден белок – Histone H2A type 1-B/E

(H2A1B_HUMAN), в образце К2 не найдены белки – Glycogen synthase kinase-3 alpha (GSK3A_HUMAN), Cystatin-A(CYTA_HUMAN), Ubiquitin-60S ribosomal protein L40 (RL40_HUMAN), Alpha-enolase (ENOA_HUMAN), S10A7_HUMAN (Protein S100-A7). В образце К3 – Immunoglobulin kappa variable 3-20 (KV320_HUMAN). Полученные данные свидетельствуют о высокой степени сорбции белков на поверхность АСМ-чипов и необходимости повышения эффективности отмывки поверхности в процессе АСМ-анализа или необходимости увеличения степени разведения биологического образца, используемого для АСМ-анализа.

11.2.3.2. Результаты МС-анализа разбавленных образцов сывороток, используемых для погружения АСМ-чипа

Полученные данные протеомного профилирования для сыворотки, претерпевшей алкилирование и восстановление, и последующий гидролиз, и для сыворотки, прошедшей только гидролиз были обработаны с помощью программы Perseus. На рисунке 11.10 представлены результаты биоинформатического анализа результатов MC-анализа сывороток с различной пробоподготовкой.

serum



Рисунок 11.10 — Тепловая диаграмма, отражающая разницу в полученных результатах MC-профилирования в зависимости от этапов пробоподготовки. Serum — белки, найденные в образце сыворотки после проведении гидролиза и Serum alkil — белки, найденные в образце сыворотки после проведения алкилирования и восстановления, и последующего гидролиза

Тепловая диаграмма, представленная на рис. 11.10, строится в программе Perseus на основании математического алгоритма, используя сходство профиля экспрессии белков и направление изменения их содержания (увеличение или уменьшение). Белки, содержание которых увеличивается и уменьшается у двух образцов варьируются по цвету в зависимости от интенсивности. Светло-зеленый цвет показывает минимальную интенсивность белка, красный – максимальную. Интенсивность вычислялась на основании площади под пиком родительского иона с вычислением величины LFQ.

Данные, представленные на диаграмме, демонстрируют, что интенсивность найденных белков сильно отличается, что говорит о их разном содержании в образцах.

В таблице 11.6 представлены о трех белках, найденные в каждом образце сыворотки в максимальном количестве, результаты получены с помощью программы Perseus.

Согласно результатам пилотных экспериментов по реализации молекулярного профилирования протеомного состава биологических образцов (коллекция К1) с использованием молекулярного детектора АСМ в комбинации с масс-спектрометрическим анализом (п. 2.11 ПГ), показано, что комбинированный подход АСМ/МС с применением чипов с функционализированной поверхностью может быть использован для определения протеомного состава биологических образцов. Показана высокая вариабельность результатов в зависимости от этапов пробоподготовки, в том числе, от количества погружений АСМ-чипов в разбавленный биологический образец. На следующем этапе работ будет выполнена экспериментальная серия работ по установлению воспроизводимости результатов в зависимости от количества погружений и определено оптимально возможное.

Таблица 11.6 – Результаты панорамного МС-профилирования для сыворотки, претерпевшей алкилирование и восстановление, и последующий гидролиз, и сыворотки, прошедшей только гидролиз. Столбцы Белок 1, Белок 2, Белок 3 отражают сведения о белках, представленных в образцах по максимальной интенсивности пиков в спектре, сведения состоят из полного названия, кодировки Uniprot, массы в кДА, а также краткого описания функций данного белка из базы данных Uniprot

Сыворотка	Белок 1	Белок 2	Белок 3
Алкилирование	Histone H2A type 2-B	Hemoglobin subunit alpha	Hemoglobin subunit
И	H2A2B_HUMAN	HBA_HUMAN	beta
восстановление,	Macca: 13.995	Macca: 15.258	HBB_HUMAN
гидролиз	Основной компонент	Участвует в транспорте	Macca:
	нуклеосомы. Играют	кислорода от легких к	15.998
	центральную роль в	различным периферическим	Участвует в
	регуляции	тканям.	транспорте кислорода
	транскрипции,		от легких к
	репарации ДНК,		различным
	репликации ДНК и		периферическим
	стабильности		тканям
	хромосом.		
Гидролиз	Apolipoprotein A-I	Serotransferrin	Immunoglobulin heavy
	APOA1_HUMAN	TRFE_HUMAN	constant gamma 1
	Macca: 30,778	Macca: 77,050	IGHG1_HUMAN
	Участвует в обратном	Трансферрины	Macca:36.106
	транспорте	представляют собой	Секретируемые
	холестерина из тканей	железосвязывающие	иммуноглобулины
	в печень для	транспортные белки,	опосредуют
	экскреции,	которые могут связывать	эффекторную фазу
	способствуя оттоку	два иона Fe3+ в ассоциации	гуморального
	холестерина из тканей	со связыванием аниона,	иммунитета, что
	и действуя в качестве	обычно бикарбоната. Он	приводит к
	кофактора для	отвечает за	элиминации
	лецитинхолестерин-	транспортировку железа от	связанных антигенов.
	ацилтрансферазы	мест всасывания и	
	(ЛХАТ).	деградации гема к местам	
		хранения и утилизации.	

По результатам протеомного профилирования смывов с АСМ-чипов были идентифицированы 110 белков, при этом в сыворотках обнаружено только 24 белка, белки идентифицированы как минимум по 2 протеотипическим пептидам. Результаты свидетельствует о высокой способности функционализированной поверхности АСМ-чипов связывать белки. Однако также высокое количество белков зарегистрировано для контрольных образцов – чипов с функционализированной поверхностью инкубированных в образце без облучения. Таким образом необходимо совершенствования методики анализа в части повышения эффективности отмывки поверхности или необходимости увеличения степени разведения биологического образца, используемого для ACM-анализа. Данные работы будут выполнены на следующем этапе работ.

Согласно п.4.9 ТЗ и п.2.11 ПГ результаты молекулярного профилирования протеомного состава биологического образца (коллекция К1) с использованием молекулярного детектора АСМ в комбинации с масс-спектрометрическим анализом – первичные данные; депонированы в PRIDE http://www.ebi.ac.uk/pride. Название проекта и идентификационный номер:

Project Name: Proteomic profiling of a biological sample (human serum) derived from the surface of the AFM chip

Project accession: PXD039712

Работы по пункту 2.11 плана-графика выполнены в полном объеме и соответствуют пунктам 4.9 и 5.25 технического задания.

12. МОЛЕКУЛЯРНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ПРОТЕОМНОГО СОСТАВА БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ (КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ, ОБРАЗЦЫ ТКАНИ) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО ДЕТЕКТОРА

В рамках работ по п. 2.12 ПГ и в соответствие с п.5.26 ТЗ на данном этапе проекта проведено молекулярное профилирование биологических образцов и разработана «Стандартная операционная процедура молекулярного профилирования протеомного состава биологического образца с использованием масс-спектрометрического детектора» (СОП представлен в составе пакета отчетной документации, документ «Пункт ПГ-2.12-СОП Протеомика»). СОП позволяет проведение определения белкового состава и биоинформатической обработки полученных данных при масс-спектрометрическом анализе комплексных биологических образцов.

Результаты разработки СОП и ее описание использованы для подготовки статьи, опубликованной в рамках проекта (Shkrigunov T, Pogodin P, Zgoda V, Larina O, Kisrieva Y, Klimenko M, Latyshkevich O, Klimenko P, Lisitsa A, Petushkova N. Protocol for Increasing the Sensitivity of MS-Based Protein Detection in Human Chorionic Villi. Curr Issues Mol Biol. 2022 May 9;44(5):2069-2088. doi: 10.3390/cimb44050140.). В публикации показано, что для достижения высокой чувствительности в обнаружении белков важно анализировать разные ткани и использовать эффективные подходы экстракции и обработки белкового материала. Протокол подготовки пробы включает очистку от SDS в ходе короткой процедуры электрофореза в концентрирующем геле, без разделения белков по массам. Таким образом, белки концентрировались в одной полосе, которая затем целиком подвергалась процедуре трипсинолиза в геле. Полученная смесь пептидов являлась объектом ЖХ-МС/МС анализа. Статистически значимые результаты работы основаны на сравнении шести наборов данных: три протокола пробоподготовки были апробированы на двух типах ткани ворсин хориона (полученные при плановых или обусловленных замершей беременностью абортах). Протокол пробоподготовки образцов 1DE-гель протеомных с помощью концентрирования является перспективным подходом в исследованиях низкопредставленной части протеома человека.

Также с использованием разработанной методики были проведены исследования внеклеточных везикул (ВнВ) аденокарциномы легкого. Применяя методы направленной масс-спектрометрии, с использованием пептидов, меченых стабильными изотопами (SIS), была проведена количественная оценка 28 белков, ассоциированных с ВнВ (протеомных сигнатур), включая общепринятые маркеры ВнВ – CD9, CD63, CD81, CD82 и HSPA8 –в образцах плазмы 34 больных раком легких и 23 здоровых добровольцев. В результате SRM анализа, с использованием SIS в плазме крови больных РЛ и здоровых добровольцев выявлено и измерено содержание 7 из 28 искомых белков: FN1, TLN1, TUBA4A, HSPA8, ITGB3, TSG101 и PACSIN2. Таким образом, в данной части работы получена протеомная сигнатура ВнВ аденокарциномы легкого, компоненты которой позволяют отличить образцы пациентов с РЛ и здоровых доноров.

Полученные результаты протеомики аденокарциномы легкого нашли продолжение в исследованиях для поиска лекарств, против немелкоклеточного рака лёгкого. BIBR1532 – избирательный эффективный неконкурентный ингибитор теломеразы ненуклеозидной природы. Показано, что производные BIBR1532, продемонстрировали ингибирующее действие на теломеразу; значения их IC50 достигали 0,3 мкМ и, следовательно, являются перспективным соединением, которое может стать основой лекарства против рака лёгкого [164].

Основную роль в метаболизме описанного выше лекарственного средства и других ксенобиотиков в организме человека играет ансамбль цитохромов Р450. С целью определения общесистемного действия повышения содержания цитохрома P450 2E1 (СҮР2Е1) был исследован ряд белок-белковых взаимодействий (интерактом) в микросомах печени человека (МПЧ) с использованием массспектрометрии химических сшивок (CXMS). Показано, что применение нового подхода CXMS позволило выявить высокоаффинные белок-белковые взаимодействия индуцируемого алкоголем белка СУР2Е1 в микросомах печени человека. Были обнаружены димерные и тримерные комплексы СҮР2Е1 с другими ферментами, метаболизирующими лекарственные средства. Среди связывающихся партнеров СҮР2Е1 присутствуют: цитохромы Р450 2A6, 2C8, 3A4, 4A11 и 4F2, UDPглюкуронозилтрансферазы (UGTs) 1А и 2В, дегидрогеназа жирных альдегидов (ALDH3A2), эпоксидгидролаза 1 (EPHX1), дисульфидоксидаза 1а (ERO1L) и

рибофорин II (RPN2). Полученные результаты показывают перспективность разработанного подхода CXMS и подтверждают концепцию тесной функциональной интеграции в системе метаболизма лекарственных средств у человека посредством белок-белковых взаимодействий составляющих ферментов Результаты работы опубликованы в стате Davydov DR, Dangi B, Yue G, Ahire DS, Prasad B, Zgoda VG. Exploring the Interactome of Cytochrome P450 2E1 in Human Liver Microsomes with Chemical Crosslinking Mass Spectrometry. Biomolecules. 2022 Jan 22;12(2):185. doi:10.3390/biom12020185.

белок-белкового Подчеркивая важность вышеописанной темы взаимодействия была проведена работа по литературному исследованию профилирования интерактома белков из лизата биоматериала в составе стабильных молекулярных комплексов. Целью данной работы было обновление текущего состояния и перспектив мульти-"омикс" подходов к профилированию белков, участвующих в образовании стабильных комплексов. Это исследование нашло отражение в обзоре, опубликованном в рамках проекта Mezentsev Y, Ershov P, Yablokov E, Kaluzhskiy L, Kupriyanov K, Gnedenko O, Ivanov A. Protein Interactome Profiling of Stable Molecular Complexes in Biomaterial Lysate. Int J Mol Sci. 2022 Dec 10;23(24):15697. doi:10.3390/ijms232415697.

По итогам работ в рамках отчетного периода в части молекулярное профилирование биологических образцов, были проанализированы результаты по количественному анализу белков в биологических образцах различного типа. Результаты обработки опубликованных данных и сведений из информационных ресурсов в области протеомики представлены в виде таблицы с указанием значений абсолютного количественного содержания белков. Для сравнения приведены примеры изменения содержания этих же белков у пациентов с диагностированными онкологическими и неврологическими заболеваниями. Сформированный перечень белков с указаниями абсолютных концентраций и значений межиндивидуальной вариабельности в плазме крови здоровых людей может быть основой для выбора белков для создания панелей и мониторинга состояния здоровья человека. В этом случае отклонение персональных показателей от параметров здорового человека может быть сигналом для корректировки образа жизни. В статье приводятся аннотации для отобранных белков по различным источникам, а также рекомендован

алгоритм для отбора и приоритизации белков для включения в диагностические панели (Новикова, Ключникова et al «Протеом белков плазмы крови для медицины: мета-анализ результатов количественных измерений методами целевой массспектрометрии содержания белков в крови здорового человека» in press).

12.1. Протокол для повышения чувствительности масс-спектрометрической идентификации белков в ворсинах хориона человека

В настояшее время достигнуты значительные успехи в массспектрометрической идентификации "дифференциально регулируемых" белков, а также новых белков, биомаркеров, белковых модификаций и полиморфизмов в различных тканях человека. Однако решены не все проблемы анализа и характеристики низкопредставленных белков, в том числе "missing" белков, собой генетические последовательности, представляющие ДЛЯ которых подтвержден белковый продукт. Согласно экспериментально не данным международного проекта HUPO (Human Proteome Project), 1343 "missing" белка не проаннотированы в терминах функций: для них не проведены экспериментальные исследовательские работы или прогностические биоинформатические анализы. Трудность обнаружения "missing" белков может быть связана не только с их низким содержанием во многих тканях, но и с их экспрессией лишь в нескольких типах клеток организма человека. Для исследования "missing" белков коллективы экспертов рекомендуют проводить "таргетный" протеомный анализ большого количества тканей разной природы. Для увеличения вероятности идентификации "missing" белков требуется особое внимание на всех этапах таргетной протеомики: при подготовке образцов, экстракции белков, трипсинолизе и биоинформатическом анализе.

В ряду интактных тканей человека, плацента может быть ценна для исследования низкопредставленной части протеома. Хорион — это плодная часть плаценты, которая образована трофобластами. Функция плаценты состоит в соединении развивающиющегося плода и организма матери. Плацента имеет богатый профиль экспрессии генов; по этому показателю сопоставима с семенниками, которые признаны перспективным источником сведений о "missing" белках

Пробоподготовка, а особенно выделение белка из плотной ткани для

последующего масс-спектрометрического анализа, является важным этапом обнаружения и идентификации низкопредставленных и "missing" белков. Эффективная экстракция белков не всегда проста. Выбор метода экстракции зависит от типа ткани, количества и физических свойств экстрагируемых белков. Исторически сложилось так, что физический лизис (механическое разрушение, обработка ультразвуком, циклы замораживания/оттаивания) является методом выбора для извлечения клеточного содержимого. Главная трудность подхода заключается в том, что разработанные протоколы трудно воспроизвести из-за вариабельности инструментов в разных лабораториях. В последние годы методы экстракции с применением детергентов стали стандартным этапом протеомной пробоподготовки, поскольку они обладают как лизирующими, так И солюбилизирующими свойствами. Хотя лизис клеток с помощью детергента и является альтернативой физическому разрушению клеточных мембран, методики часто используются в сопряжении. В это же время выбор детергента подходящего для протеомных исследований является сложной задачей. Нет идеального и универсального детергента; результаты экспериментов могут различаться в рамках одной методики пробоподготовки, в зависимости от природы обрабатываемой ткани.

Высокие концентрации (0,5-4%) детергентов (например, додецилсульфата натрия, SDS) или хаотропных агентов (таких как мочевина) часто используются для наиболее эффективной солюбилизации белков биологических тканей. Однако применение таких реагентов может ингибировать активность трипсина, подавлять ионизацию LC-ESI-MS, создавать большое количество ионов, которые потенциально могут мешать масс-спектрометрическому анализу. Состав экстракционного буфера может иметь основополагающее для всего эксперимента значение. Устранение детергента масс-спектрометрического важно ДЛЯ профилирования протеома, поэтому процедура очистки должна быть включена в пробоподготовку. Для удаления детергентов из белковых или триптических растворов используются: осаждение ацетоном, центрифуги для обессоливания, ультрафильтрация, фильтры с отсечкой по молекулярной массе. Перечисленные методы имеют свои ограничения, которые обусловлены значительными временными затратами, трудоемкостью методик, использованием органических

растворителей.

Разработка быстрых аналитических методов подготовки биообразцов может стать ценным вкладом в исследование протеома, поскольку уменьшение затрачиваемого времени позволит увеличить пропускную способность методик.

Чтобы охарактеризовать протеом ворсин хориона человека с помощью ЖХ-MC/MC, были проанализированы экстракты на основе мочевины, а также SDS с 1DE-гель концентрированием. Трипсинолиз в геле обычно характеризуется большим количеством идентификаций для плаценты человека. Тем не менее, обработка мочевиной является проверенным и часто используемым методом экстракции в протеомных исследований плаценты. Данное исследование было направлено на определение того, приводит ли солюбилизация на основе SDS, сопряженная с 1DE-гель концентрированием и трипсинолизом в геле, к воспроизводимой и чувствительной идентификации и квантификации белков ворсин хориона, полученных во время аборта в первом триместре (7-12 недели) при нормальной (плановый аборт) и замершей (плод не развивается нормально или погибает, но плацента и ткани эмбриона находятся в матке) беременностях.

Для анализа протеома ворсин хориона человека была использована солюбилизация с SDS (2% или 4%). Изображение ворсин хориона и их расположение в матке представлено на Рисунке 12.1.

Для очистки от SDS был использован метод укороченного SDS-PAGE: процедура электрофореза прекращалась, когда белки собирались на одной полосе в концентрирующем геле (4%T); не проводилось фракционирование в разделяющем геле (12%T). Для метода было предложено название "1DE-гель концентрирование" (Рисунок 12.2). Некоторые белки могли отсутствовать в списке идентификаций изза несоответствия молекулярных масс (MM), которые были зарегистрированы массспектрометрией, и MM в разрешающем электрофоретическом геле. Белки ворсин хориона человека, содержащие SDS, наносили в три параллельных лунки, по 50 мкг. Электрофорез проводили в течение 40–50 мин при 50 В и прекращали, когда бромфеноловый синий переходил в разделяющий гель. В результате получалась одна белковая полоса для каждой лунки геля. Полученные полосы белков использовалась для трипсинолиза в геле и анализа ЖХ-МС/МС.



Рисунок 12.1. Изображение матки при беременности (А) и фотография ворсин хориона человека (Б)



Рисунок 12.2 – Схема процедуры 1DE-гель концентрирования. Образцы ворсин хориона человека солюбилизировали в буфере на основе 2% или 4% SDS, а затем обрабатывали ультразвуком. Полученные белковые экстракты наносили на полиакриламидный концентрирующий гель (4%T) (в трех техповторах, по 50 мкг белка в лунку). Электрофорез (50 В, 45 мин) прекращали до перехода бромфенолового синего в разделяющий гель. Единичную белковую полосу с каждой полосы геля целиком вырезали и расщепляли трипсином. Полученную смесь пептидов использовали для анализа ЖХ-МС/МС

Наряду с экстракцией предложенным методом пробоподготовки, проводился лизис мочевиной — это проверенная и часто используемая для исследований протеома плаценты методика. Таким образом, проводилась сравнительная оценка вариабельности и воспроизводимости результатов метода 1DE-гель концентрирования. Биоматериал ворсин хориона планового аборта и замершей беременности был проанализирован с целью исследования пригодности ткани

хориона для выявления низкопредставленных белков, возможности использования укороченного SDS-PAGE для очистки от SDS (2% или 4%). Масс-спектры регистрировали в двух/трех технических повторах. Полученные данные ЖХ– МС/МС были отфильтрованы по критерию совпадения спектров: файл MGF не использовался, если значение спектрального критерия было меньше (5931 ± 1116). Было отобрано 40 MGF файлов для последующей биоинформатической обработки. Эти файлы были импортированы на платформу SearchGUI , протеомный поиск был выполнен с алгоритмами X!Tandem и MS-GF+. Интерпретация результатов проводилась с помощью PeptideShaker. Используя образцы ворсин хориона планового аборта и замершей беременности, удалось идентифицировать около 10% специфичных для плаценты белков.

Согласно базе данных Gene Ontology, среди записей Isuccessful, 32 белка (Таблица S2) вовлечены в процесс беременности. Наибольшее количество этих белков обнаружены в образцах хориона планового аборта, обработанных 2% и 4% SDS: 24 и 15 белков соответственно. Использование мочевин содержащего буфера позволило обнаружить 2 белка. При замершей беременности выявлено 26 белков, ассоциированных с беременностью: 22 и 13 из них были идентифицированы протоколами с 2% и 4% SDS соответственно; экстракция на основе мочевины позволила идентифицировать 7 белков.

Мы использовали графики UpSet для сравнения шести наборов данных, ворсинах хориона разной природы основанных на И трех протоколах пробоподготовки, а также для выявления степени сходства между списками белков Ireliably и Qreliably (Рисунок 12.3). Диаграммы Эйлера-Венна являются одними из самых старых и популярных способов визуализаций наборов данных, но они применимы не более чем для четырех наборов данных. Увеличение количества наборов затрудняет восприятие связей между наборами данных; диаграммы Эйлера-Вена не всегда подходят для "омиксных" данных. Графики UpSet широко используются для визуализации до 30 наборов. UpSet состоит из гистограммы и таблицы. Наборы данных располагаются в строках таблицы. Заполненные ячейки таблицы показывают, какие наборы являются частями пересечения, а соответствующие столбцы гистограммы отображают количество общих белков. Одиночные заполненные ячейки и соответствующие столбцы гистограммы

показывают количество уникальных белков в каждом наборе данных. Высота столбцов на Рисунке 12.3 указывает на то, что общих белков между наборами немного. Значительное количество белков было идентифицировано и квантифициовано только в одном из наборов данных, то есть в одном из сочетаний процедуры подготовки и природы ворсин хориона. Для данных планового аборта большинство уникальных белков было обнаружено в наборах, основанных на пробоподготовки с экстракцией с SDS и процедурой 1DE-гель концентрирования.

Авторами была предложена процедура 1DE-гель концентрирования (укороченный SDS-PAGE) для анализа протеома ворсин хориона человека. Поскольку каждый биологический образец наносился одновременно в три параллельные лунки, мы провели оценку вариабельности идентификации и квантификации белков.

Следующим шагом была оценка значимости различий между вариабельностью идентификации/квантификации белков, достигнутой с помощью Протокола 1 и Протокола 2. Для сравнительного статистического анализа вариабельности мы выбрали наборы 2 и 5 (буфер, содержащий 4% SDS), а также 3 и 6 (мочевина). Эти наборы имели равное количество биологических образцов и техповторов, отражали результаты масс-спектрометрических измерений белков ворсин хориона при плановых абортах и замершей беременности (биологические повторы) и были обработаны с использованием Протокола 1 и Протокола 2. Поскольку данные не были нормально распределены и содержали менее 30 наблюдений, был использован непараметрический критерий Уилкоксона

Уровень значимости был определен как p = 0,05. Статистика критерия Вилкоксона (W) равнялась 13 (p = 0,485) и 7 (p = 0,090) в случаях изменчивости идентификации и количественного определения соответственно (критическое значение W = 5). Поскольку рассчитанные значения р превышали заданный уровень значимости, не было статистически значимой разницы в вариабельности между результатами Протокола 1 и Протокола 2. Таким образом, в наших экспериментальных условиях воспроизводимость идентификации и квантификации белка, достигнутая с помощью Протокола пробоподготовки 1, соответствовала значениям часто используемого подхода на основе мочевины (Протокол 2). Несмотря на упрощение классического протокола SDS-PAGE, процедура 1DE-гель

концентрирования сохраняет достаточное количество характеристик

вариабельности идентификации и квалификации белка.



Рисунок 12.3 – График UpSet, показывающий количество общих белков (пересечений) между шестью наборами данных о хорионе человека. Верхняя панель — пересечения надежно идентифицированных (Ireliably) белков; нижняя панель — пересечения достоверно количественно (Qreliably) белков. Наборы данных представлены в виде их номеров в строках таблицы.



Рисунок 12.4 – Танглограммы сравнения распределения "Набор_Образец_Техповтор" и иерархического дерева кластеризации по вариабельности. Иерархическая кластеризация была выполнена по значениям вариабельности для Isuccessful (A) и Qreliably (B) списков белков. Отдельные кластеры окрашены в разные цвета. Ветви, которые различаются между двумя деревьями, показаны пунктирными линиями.

Исследование редких органов, тканей или типов клеток может быть перспективным подходом в анализе протеома человека для обнаружения низкопредставленных и "missing" белков. По транскриптомным данным, 3,5% экспрессируется протеома человека В таких низких концентрациях В плаценте/трофобласте, что аналитическое оборудование — во многих случаях массспектрометры — не может его обнаружить. Таким образом, мы полагаем, что ворсинки хориона могут служить одним из типов тканей человека для обнаружения и идентификации таких белков.

Согласно данным Human Protein Atlas, в нашем анализе данных были квалифицированы низкопредставленные белки, в том числе те, что ранее не были обнаружены с помощью масс-спектрометрии трофобластов. Например, использование 2% SDS-содержащего буфера для экстракции белков хориона планового аборта (датасет 1) выявило белок альфа-L-фукозидазы ткани (FUCA1). Белок FUCA1 был идентифицирован двумя специфическими для белка пептидами; обычно этого достаточно, чтобы подтвердить присутствие белка в образце. FUCA1 может играть важную роль в адгезии клеток при прикреплении и отслоении плодных оболочек. Его активность в плаценте возрастает в период эмбриогенеза, наиболее

высока в гестационную фазу 11–12 недель, а затем значительно снижается к концу беременности.

Экстракция на основе SDS для образцов замершей беременности позволила обнаружить гиалуронан и белок протеогликановой связи 1 (HAPLN1). HAPLN1 был идентифицирован двумя белок-специфичными пептидами: природным 200GGLDWCNAGWLSDGSVQYPITKPR (24 аминокислот) и природным +синтетическим 261FYYLIHPTK (9 аминокислот). HAPLN1 необходим для образования агрегатов протеогликанов хряща и имеет широкий спектр биологических функций, включая дифференцировку хондроцитов и развитие сердца. Отсутствие HAPLN1 у гомозиготных мышей приводило к перинатальной летальности, сопровождающейся тяжелой хондродисплазией и пороками развития сердца.

Результаты работы показали, что для достижения высокой чувствительности в обнаружении "missing" белков важно анализировать разные ткани и использовать эффективные подходы экстракции и обработки белкового материала. В работе описан протеомный протокол на основе "1DE-гель концентрирования", разработанный для идентификации низкопредставленных белков ворсин хориона человека. Протокол включает очистку от SDS в ходе короткой процедуры электрофореза в концентрирующем геле, без разделения белков по массам. Таким образом, белки концентрировались в одной полосе, которая затем целиком подвергалась процедуре трипсинолиза в геле. Полученная смесь пептидов являлась объектом ЖХ-МС/МС анализа. Статистически значимые результаты работы основаны на сравнении шести наборов данных: три протокола пробоподготовки были апробированы на двух типах ткани ворсин хориона (полученные при плановых или обусловленных замершей беременностью абортах). Для протокола 1DE-гель концентрирования отмечено наиболее широкое протемное покрытие: идентифицированы 15 низкопредставленных белков, некоторые из них не были ранее обнаружены с помощью масс-спектрометрии трофобластов. Обнаружен "missing" белок PSG7 кодируемый на хромосоме 19 человека. Протокол пробоподготовки протеомных образцов с помощью 1DE-гель концентрирования является перспективным подходом в исследованиях низкопредставленной части протеома человека.

12.2. Исследование внеклеточных везикул аденокарциномы легкого

По данным всемирной организации здравоохранения, рак легких занимает заболеваний первое место среди причин смерти от онкологических (https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cancer). В последние годы благодаря переходу от химиотерапии к применению таргетных препаратов и иммунотерапии достигнут значительный прогресс в лечении этого заболевания. В то же время эффективность таргетной терапии сильно зависит от молекулярногенетических особенностей опухоли. Таким образом, в области молекулярной онкологии существует острая потребность в поиске эффективных маркеров для определения тактики лечения и прогнозирования исхода заболевания.

Внеклеточные везикулы (ВнВ) выделяются всеми живыми клетками, в биологические жидкости организма, при этом опухолевые клетки секретируют их особенно эффективно. Термин ВнВ описывает очень гетерогенную популяцию секретируемых мембранных частиц, которые отличаются по своему размеру и молекулярному содержимому.

Протеомный состав внеклеточных везикул характеризует продуцирующие их клетки, поэтому они являются источником потенциальных биологических маркёров злокачественных опухолей. Более того, они выделяются в кровоток. Поскольку кровь является наиболее доступным клиническим материалом, исследование протеомного состава ВнВ важно для разработки новых подходов к диагностике в концепции жидкой биопсии.

Последние достижения В области масс-спектрометрии позволяют обнаруживать и количественно определять тысячи белков в клетках, тканях и биологических жидкостях. В качестве мощного аналитического инструмента массспектрометрический анализ использовался для раскрытия фундаментальной роли ВнВ в развитии рака, например, в модуляции микроокружения опухоли и содействии метастазированию. Протеомика на основе масс-спектрометрии также полезна ДЛЯ изучения ВнВ как источника диагностических факторов, прогностических маркеров (тяжесть исхода) и прогностических маркеров (например, ответ на лечение).

В данной работе, применяя методы направленной масс-спектрометрии, с использованием пептидов, меченых стабильными изотопами (SIS), была проведена

количественная оценка 28 белков, ассоциированных с ВнВ (протеомных сигнатур), включая общепринятые маркеры ВнВ – CD9, CD63, CD81, CD82 и HSPA8 – в образцах везикул, выделенных из клеточных линий аденокарциномы легкого NCI-H23 и A549. Кроме того, была проведена оценка содержания этих маркеров в образцах плазмы 34 больных раком легких и 23 здоровых добровольцев и определен набор белков, характерный для ВнВ аденокарциномы легкого, состоящий из 7 белков – специфичная протеомная сигнатура.

На основании данных протеомного профилирования ВнВ и цельноклеточных лизатов (ЦЛ) клеточных линий рака легкого, полученных ранее, мы выбрали набор из 28 белков, уровни которых были значимо выше в образцах ВнВ, по сравнению с образцами ЦЛ.

Эти белки были объединены в несколько групп: общепринятые маркеры ВнВ (CD82, CD81, CD9, CD63 и HSPA8), универсальные маркеры ВнВ (CDC42, CNP, FN1, GNAI2, HSPG2, ITGB1, ITGB3, MVP, SLC2A1, TLN1 и TUBA4A).), тканеспецифические маркеры рака легкого (EPS15, GPRC5A и TSG101) и маркеры, специфичные для клеточных линий (клеточная линия A549: ITGA3, PACSIN2, PDCD6IP, PTGFRN и RACGAP1; клеточная линия NCI-H23: ICAM1, MFGE8 и SDC4). Для этих белков были синтезированы 36 протеотипических пептидов, однозначно картируемых на 28 белков, меченных стабильными изотопами (SIS).

В результате анализа SRM, с использованием SIS, 34 из 36 пептидов, которые были картированы на 27 белков, были обнаружены и измерены в образцах BнB и ЦЛ, полученных для клеточных линий A549 и NCI-H23 (рисунок 12.5). Сигнал SRM для пептидов общепринятого маркера CD82 (SSFISVLQTSSSSLR и GEEDNSLSVR), не обнаружен.

Обнаруженное содержание белка находилось в диапазоне почти трех порядков. Наибольший уровень в образцах ЦЛ имел белок HSPA8 в обеих клеточных линиях: $104,4 \pm 22,8$ фмоль/г (A549) и $114,4 \pm 39,7$ фмоль/г (NCI-H23) общего белка в образце, а наименьшую – маркер TSG101: $0,140\pm0,028$ фмоль/г (A549) и $0,127\pm0,026$ фмоль/г (NCI-H23). Кроме того, в образцах ВнВ, полученных из обеих клеточных линий, максимальным было содержание белка GPRC5A, на уровне $4,5 \pm 0,05$ фмоль/г (A549) и $2,5 \pm 1,3$ фмоль/г (NCI-H23), а минимальным, для клеточной линии A549 – содержание белка лактатгерина – MFGE8 ($0,05 \pm 0,01$

фмоль/г), и для клеточной линии NCI-H23 – основного белка гепарансульфатного протеогликана (HSPG2), специфичного для базальной мембраны (0,06 ± 0,07 фмоль/г).



Рисунок 12.5 – Содержание 34 пептидов, однозначно картированных на 27 белков, ассоциированных с ВнВ, измеренных в образцах ВнВ и ЦЛ клеточных линий А549 и NCI-H23; По оси Y – log10 содержания пептида в фмоль/мкг общего пептида

В результате анализа SRM, с использованием SIS, мы определили содержание белков, связанных с BhB, в плазме крови, полученной от 34 пациентов с РЛ и 23 здоровых добровольцев. Информация о пациенте представлена в Таблице 12.1.

	Пациенты с	Пациенты с	Здоровые доноры
	аденокарциномой	плоскоклеточным раком	
	легкого	легкого	
Общее количество	23	11	23
Возраст	46-77	46-73	23-42
Мужчины	15	9	10
Женщины	8	2	13
Стадия 1, 1А и 1b	10	3	-
Стадия 2, 2A и 2b	4	3	-
Стадия 3, 3А и 3b	6	4	_
Стадия 4	3	1	-

Таблица 12.1 – Описание пациентов и здоровых доноров

В результате анализа SRM, с использованием SIS в плазме крови больных РЛ и здоровых добровольцев выявлено 7 из 28 искомых белков: фибронектин (FN1), талин-1 (TLN1), Цепь тубулина альфа-4А (TUBA4A), родственный белок теплового шока 71 кДа (HSPA8), интегрин бета-3 (ITGB3), белок 101 гена предрасположенности к опухолям (TSG101) и белок 2 субстрата протеинкиназы С и казеинкиназы (PACSIN2). Совокупность белков FN1, TLN1, TUBA4A, HSPA8, ITGB3, TSG101 и PACSIN2 была названа протеомной сигнатурой ВнВ (рисунок 12.6).

В то время как фибронектин был обнаружен во всех исследованных образцах, PACSIN2 был обнаружен только в девяти образцах РЛ (шесть пациентов с АКЛ и три – с плоскоклеточным раком легкого). Содержание фибронектина было максимальным и составляло $0,8 \pm 0,3$ и $1,1 \pm 0,4$ мкМ в плазме крови пациентов с РЛ и контрольной группы здоровых доноров соответственно. Кроме того, TSG101 и PACSIN2 были обнаружены в плазме крови пациентов с РЛ на уровне – $1,6 \pm 1,5$ и $2,2 \pm 1,5$ нМ соответственно. Таким образом, протеомная сигнатура ВнВ охватывает динамический диапазон почти в три порядка.

Существенной разницы в содержании FN1 при сравнении образцов здоровых добровольцев (1,1 \pm 0,4 мкмМ) и пациентов с РЛ (0,8 \pm 0,3 мкмМ) обнаружено не было (рис. 12.7 а).

Талин-1 также был обнаружен во всех образцах больных РЛ (N = 34) и в 22 из 23 образцов здоровых добровольцев. Содержание TLN1 было значительно выше (p-value <0,001) в плазме крови пациентов с РЛ (47 ± 41 нМ), чем у здоровых доноров (2,5 ± 1,1 нМ) (рис. 3c). Кроме того, уровень TLN1 был почти в три раза выше (p-value = 0,00114) у пациентов с ПРЛ (84,4 ± 27,4 нМ), чем у пациентов с АКЛ (29,5 ± 12,2 нМ) (рис. 12.6 с).

Белок ТUBA4A был измерен в 18 образцах пациентов с ПРЛ (10,4 \pm 4,2 нМ) и 11 образцах пациентов с АКЛ (9,5 \pm 3,9 нМ) и был обнаружен в двух образцах здоровых добровольцев (2,8 \pm 1,0 нМ). Между пациентами с РЛ и здоровым контролем наблюдалась разница как в частоте обнаружения TUBA4A (29 из 34 РЛ против 2 из 23 здорового контроля), так и уровнях белка (разница в 3,5 раза; p-value <0,001)) (рис. 12.7 b).

Белки HSPA8, TSG101, ITGB3 и PACSIN2 были обнаружены и измерены только в образцах пациентов с РЛ. Содержание HSPA8 было примерно одинаковым для двух гистологических подтипов рака легкого ($39,1 \pm 16,8$ нМ в образцах АКЛ (N = 15) против 34,6 ± 15,2 нМ в образцах ПРЛ (N = 11). Содержание белка TSG101, который был детектирован в 13 образцах АКЛ ($0,8 \pm 0,2$ нМ) и пяти образцах ПРЛ ($3,8 \pm 1,5$ нМ), было значительно выше у пациентов с ПРЛ (значение p = 0,00539). Белок ITGB3 был обнаружен в 10 из 11 образцов ПРЛ на уровне $32,5 \pm 7,9$ нМ и

только в 3 из 23 образцов АКЛ на уровне 11,9 \pm 10,9 нМ. Наконец, белок PACSIN2 мы детектировали в шести образцах АКЛ и в трех образцах ПРЛ в почти эквимолярных концентрациях 2,1 \pm 0,6 и 2,3 \pm 0,3 нМ соответственно (рис. 12.6 d– f).

Компоненты протеомной сигнатуры ВнВ составляют паттерн экспрессии, на основе которого была построена матрица расстояний, отражающая степень сходства между экспериментальными образцами. По компонентам протеомной сигнатуры ВнВ четко формируются кластеры пациентов с РЛ и контрольных образцов. Более того, наблюдаются значительные различия между образцами АКЛ и ПРЛ, которые представляют собой разные гистологические подтипы РЛ.

При сравнении пациентов на ранней и поздней стадиях мы не обнаружили существенных различий. Однако, матрица расстояний для пациентов на ранней стадии (рисунок 12.7 A и B) и здорового контроля показала два кластера – пациентов с РЛ и здоровых добровольцев (рис. 12.7).

Кроме того, уровень TLN1, был в 19 раз (p-value <0,01) выше в выборках пациентов с ранней стадией РЛ (1, 1А и 1В) по сравнению с контрольной выборкой. Более того, частота обнаружения и содержание TUBA4A были выше в образцах РЛ на ранней стадии (средний уровень 10,9 нМ, N = 13), чем в контрольных образцах (средний уровень 2,8 нМ, N = 2). Наконец, белок HSPA8 был обнаружен и количественно определен только в образцах пациентов с ранней стадией РЛ (средний уровень 33 нМ; N = 11). Несмотря на существенные различия, при интерпретации результатов следует учитывать небольшой размер выборки пациентов с ранней стадией РЛ (N = 13).


Рисунок 12.6 – Результаты измерений протеомной сигнатуры ВнВ методом SRM с использованием SIS: (a) FN1; (b) TUBA4A; (c) TLN1; (d) HSPA8; (e) TSG101; (f) ITGB3; и (g) PACSIN2 в плазме крови, полученной от пациентов с аденокарциномой легкого (LAC, N = 23), плоскоклеточным раком легкого (SqC, N = 11) и здоровыми добровольцами (HV, N = 23). Распределение содержания белка показано в виде диаграммы, если содержание белка было измерено не менее чем в 5 образцах на группу. Концентрация белка указана в нМ.. (h) Процент образцов, в котором были обнаружены белки, связанные с ВнВ



Рисунок 12.7 — Матрица расстояний, показывающая сходства экспериментальной выборки на основе экспрессии компонентов протеомной сигнатуры BHB: FN1, TLN1, TUBA4A, HSPA8, ITGB3, TSG101 и PASCIN2 для пациентов с ранней стадией (1, 1A и 1B) РЛ (N = 13) и здоровых добровольцев (HK, N = 23)

Чтобы выяснить биологическую функцию протеомной сигнатуры ВнВ, мы провели поиск потенциальных белок-белковых взаимодействий с помощью базы данных STRING. Анализ показал, что компоненты протеомной сигнатуры ВнВ, обнаруженные в плазме крови пациентов с РЛ (FN1, TLN1, TUBA4A, HSPA8, TSG101, ITGB3 и PACSIN2), образуют два потенциальных комплекса: FN1-ITGB3-TLN1 и HSPA8-PACSIN2. Функционально компоненты протеомной сигнатуры ВнВ вовлечены в фокальную адгезию (KEGG), сигнальный путь Rap1 (KEGG) и везикулярно-опосредованный транспорт (биологические процессы, GO).

Чтобы выяснить связь уровней экспрессии и выживаемости пациентов, мы использовали онлайн-платформу UALCAN и данные об уровнях экспрессии транскриптов для пациентов с РЛ, полученные из Атласа ракового генома (TCGA). Из семи компонентов протеомной сигнатуры ВнВ высокие уровни экспрессии TUBA4A и TSG101 были связаны с плохой выживаемостью. Более того, уровни транскриптов TUBA4A были значительно повышены у пациентов с РЛ, по сравнению со здоровым контролем, тогда как уровни транскриптов TSG101 изменились незначительно (рисунок 12.8).



Рисунок 12.8 — Связь уровней экспрессии TUBA4A и TSG10 с выживаемостью пациентов с РЛ, рассчитанная на платформе UALCAN. Уровни экспрессии транскриптов TUBA4A (a) и TSG101 (b) для пациентов с РЛ, полученные из Атласа ракового генома (TCGA). Уровни экспрессии транскриптов показаны в целевых транскриптах на миллион молекул РНК в образце RNA-seq. Вероятность выживания, связанная с высокой или низкой/средней экспрессией TUBA4A (c) и TSG10 (d)

Внеклеточные везикулы (ВнВ) – это мембранные пузырьки, которые имеют белковый состав клетки-предшественника и циркулируют в биологических жидкостях организма, получение которых менее инвазивно и безопасно, чем биопсия ткани. Таким образом, изучение протеомного состава ВнВ важно для разработки новых подходов к диагностике в концепции жидкой биопсии.

В данной работе, применяя методы направленной масс-спектрометрии, с использованием пептидов, меченых стабильными изотопами (SIS), была проведена количественная оценка 28 белков, ассоциированных с ВнВ (протеомных сигнатур), включая общепринятые маркеры ВнВ – CD9, CD63, CD81, CD82 и HSPA8 – в образцах везикул, выделенных из клеточных линий аденокарциномы легкого NCI-H23 и A549. Кроме того, была проведена оценка содержания этих маркеров в образцах плазмы 34 больных раком легких и 23 здоровых добровольцев.

Для получения образцов ВнВ, проводили культивирование клеточных линий NCI-H23 и A549, и отбирали среду культивирования. Затем, применяя метод дифференциального ультрацентрифугирования с использованием сахарозной подушки, выделяли ВнВ. Для каждой клеточной линии образцы ВнВ были получены в трех повторах. Образцы цельной плазмы были получены от 34 пациентов с немелкоклеточным раком легкого (23 пациента с аденокарциномой легкого, 11 – с плоскоклеточным раком легкого) и 23 здоровых доноров. Пробоподготовка образцов к масс-спектрометрическому анализу включала восстановление и алкилирование остатков цистеина и дальнейший ферментативный гидролиз белков трипсином. Далее образцы исследовали методом направленного массспектрометрического анализа – SRM (мониторинг выбранных реакций) в микропотоковом режиме с использованием TSQ Quantiva, с применением предварительно синтезированных SIS-стандартов. Результаты были проанализированы и визуализированы с использованием программного обеспечения Skyline MacCoss Lab (версия 4.1.0).

В результате анализа SRM, с использованием SIS, в образцах ВнВ и ЦЛ, полученных для клеточных линий A549 и NCI-H23, были обнаружены и измерены 34 из 36 пептидов, которые были картированы на 27 белков. Значения содержание белка находилось в диапазоне почти трех порядков.

В результате анализа SRM, с использованием SIS в плазме крови больных РЛ и здоровых добровольцев выявлено и измерено содержание 7 из 28 искомых белков: FN1, TLN1, TUBA4A, HSPA8, ITGB3, TSG101 и PACSIN2.

Таким образом, получена протеомная сигнатура ВнВ аденокарциномы легкого, компоненты которой позволяют отличить образцы пациентов с РЛ и здоровых доноров.

12.3. Разработка, синтез, молекулярная динамика и биологическая оценка действия новых родственных BIBR1532 аналогов, нацеленных на теломеразу, против немелкоклеточного рака лёгкого

Теломеры – это уникальные структуры, составленные из некодирующих гексануклеотидных тандемных повторов 5'-(TTAGGG)n-3', среди которых 4-12 тысяч пар оснований образуют двойную спираль, а следующие 50-400 нуклеотидов

– однонитевую ДНК на конце эукариотических хромосом. Теломеры играют ключевую роль в репликации и пролиферации большинства соматических клеток: при каждом делении они значительно укорачиваются. После примерно пятидесяти делений (то есть при достижении предела Хейфлика) теломеры становятся слишком короткими для принятия конфигурации Т-петли и активируется сигнальный путь ответа на повреждения ДНК. Таким образом теломеры функционируют как митотические часы, наделяя клетки конечным числом делений и ограничивающая рост опухолевых клеток.

Теломераза – это рибонуклеиновый комплекс, имеющий две составляющие: каталитическая субъединица hTERT (human telomerase reverse transcriptase, обратная транскриптаза человеческой теломеразы) и матрица PHK hTERC (human telomerase RNA component, РНК-компонент человеческой теломеразы). Теломераза ответственна за поддержание постоянной длины теломер и за целостность хромосом постоянно делящихся клеток. Хоть теломераза не активна в большинстве человеческих соматических клеток, в раковых клетках теломеры восстанавливаются за счёт активации теломеразы или альтернативных способов удлинения теломер (ALT). Интересно, что 85-90% раковых заболеваний человека сопровождаются активацией теломеразы, что поддерживает длину хромосомных концов постоянной при делении клеток, то есть приводит к неограниченной пролиферации и иммортализации опухолевых клеток.

Рак лёгкого второй по встречаемости в мире; он является ведущей причиной смертности от рака. На немелкоклеточный рак лёгкого приходится около 84% всех случаев рака лёгкого, из которых в 80% наблюдается теломеразная активность. В сложных случаях опухоль может появиться повторно из-за неоднородности рака и приобретённой сопротивляемости. Таким образом, сейчас крайне необходимо разработать новые подходы, способные вылечивать от резистентных опухолей, чтобы обеспечить пациентов долгой и верной ремиссией. Исходя из этого, ингибиторы теломеразы могут применяться в качестве адъювантной терапии, чтобы предотвратить разрастание остаточных клеток рака.

BIBR1532 – избирательный эффективный неконкурентный ингибитор теломеразы ненуклеозидной природы, связывающийся с аллостерическим сайтом связывания hTERT. Он укорачивает теломеры, нарушает пролиферацию клеток и

клеточному старению в зависимости от дозы in vitro.

К сожалению, BIBR1532 демонстрирует плохую фармакокинетику и мало поглощается клетками, что препятствует продвижению препарата с доклинических к клиническим испытаниям. Более того, оптимизация BIBR1532 посредством синтеза различных производных не была удовлетворительной. Цель данного исследования – синтезировать новые родственные BIBR1532 аналоги с учётом фармакофорных особенностей BIBR1532 для применения в качестве ингибитора теломеразы.

Разработка соединений основывалась на фармакофорных особенностях, изученных на комплексе Tribolium castaneum TERT (tcTERT) с BIBR1532 (PDB ID: 5CQG), и ценных исследованиях зависимости активности от структуры. BIBR1532 располагается в близком к поверхности и доступном для растворителя гидрофобном кармане, состоящем из остатков фенилаланина, валина, тирозина и лейцина, который консервативен и для tcTERT, и для hTERT. Структура BIBR1532 похожа на гантелю: содержит две липофильные головы, соединённые линкером четырёхуглеродным α,β-ненасыщенным вторичным амидом, что лежит в основе активности соединения. Ведущим подходом для оптимизации стало добавление нитрильной группы, способствующее улучшению лиганд-рецепторного взаимодействия. В соответствии с этим были составлены аналоги 2-амино-3цианотиофена в качестве целесообразной липофильной основы для аминной части модели. Для усиления липофильности аминов были подготовлены аналоги 2-амино-3-цианоциклопента тиофена 2а и 2-амино-3-циано-тетрагидробензотиофена 2b. Каждый амин присоединялся к амидному линкеру для образования ацетамида по аналогии с 2-циано-N-(2-циано-4,5,6,7-тетрагидро-1-бензотиофенил-2)ацетамидом (9b), который проявляет противоопухолевую активность. Вторая липофильная голова должна состоять из трёх групп разных ароматических соединений, среди которых были один или два цикла и сочленённые кольца (Рисунок 12.9). Цель этой головы – улучшение биологической активности. И, наконец, две липофильные головы соединялись обязательным четырёхуглеродным α,β-ненасыщенным вторичным амидом, повторяя геометрию BIBR1532. Были разработаны три набора возможных соединений и синтезированы тридцать новых соединений, как показано на Рисунке 12.9.



Рисунок 12.9 – Рациональный дизайн целевых соединений на основе BIBR1532



Рисунок 12.10 – Организация трёх разных групп соединений и химическая структура тридцати новых соединений, разработанных для ингибирования теломеразы

Химические структуры целевых соединений групп 1, 2 и 3 проверялись при помощи элементного анализа и спектроскопии (1H, 13C ЯМР и масс-

спектрометрией). Спектр протонного магнитного резонанса для соединений 9a и 9b характеризуется синглетом на $\delta = 4.12$ и 3.72 м.д., что отражает два протона метиленовой группы. Пропажа этого сигнала в спектрах соединений 25а-39b – признак успешного протекания реакции Кнёвенагеля так же, как и появление характеристического синглетного сингала алкенильного протона на отрезке значений δ от 7.98 до 9.06 м.д. Другое подтверждение успешного протекания реакции Кнёвенагеля – двухмерная ядерная магнитно-резонансная спектроскопия с эффектом Оверхаузера (NOESY). Виниловый протон соединения 38b на 8.30 м.д. сопряжён одновременно с водородом у шестого (на 7.47 м.д.) и четвёртого (на 7.71 м.д.) атомов углерода в бензодиоксольном кольце (Рисунок 12.12).



Рисунок 12.11 — Двухмерная ядерная магнитно-резонансная спектроскопия с эффектом Оверхаузера (NOESY) соединения 38b, показывающая дипольные взаимодействия в точках (8.30, 7.47 м.д.) и (8.30, 7.71 м.д.)

ИК-спектр соединения 38b продемонстрировал характеристические пики 1279.83 см-1 (С-О бензодиоксольного кольца), 1648.26 см-1 (С=О амида), 1673.84 см-1 (С=С), 2223.38 см-1 (СN), 2931.53 см-1 (алифатические протоны), 3002.25 см-1 (ароматические протоны) и 3433.83 см-1 (амидная группа NH).

На основании протокола амплификации теломерных повторов (TRAP) была определена активность ингибирования теломеразы соединений 25а-39b. В исследованиях вне клеток применялся лизат клеток А549 (эпителиальные клетки

лёгочной карциномы) для оценки теломеразы при разных концентрациях ингибитора. Мы применяли высокоселективную теломеразу и ингибитор обратной транскриптазы BIBR1532 в качестве положительного контроля. Все соединения показали зависимое от дозы ингибирование теломеразы в диапазоне концентраций 0.1–100 мкМ (Рисунок 12.12). Соединения 29а, 36b и 39b показали лучшее ингибирующее действие по сравнению с контролем.



Рисунок 12.12 – Подавление теломеразной активности в лизатах клеток A549, на которых подействовали разными концентрациями ингибиторов 29а, 36b и 39b. Представлены характерные для TRAP результаты гель-электрофореза. Для каждого из экспериментов представлен один из четырёх гелей. На диаграммах показаны средние значения и соответствующие им стандартные погрешности среднего

Чтобы определить, могут ли синтезированные соединения воздействовать на теломеразу в живых опухолевых клетках, мы инкубировали клетки А549, НСС-44 и NCI-H23 с самыми эффективными ингибиторами 29а, 36b и 39b, а затем измерили теломеразную активность по TRAP (Таблица 12.2).

соединений 29а, 36b, 39b по сравнению с контролем						
	% теломеразной активности в раковых клетках					
Соединение	A549	HCC44	NCI-H23			
29a	22,1±4,8 %	66,1±2,4 %	28,2±3,9 %			
36b	18,1±5,4 %	54,4±4,4 %	25,1±3,2 %			

75,6±7,9 %

50,3±5,1 %

41,5±6,9 %

39b

Таблица12.2 — Теломеразная активность в раковых клетках с применением соединений 29а, 36b, 39b по сравнению с контролем

Полученные результаты свидетельствуют о том, что все исследуемые соединения подавляли теломеразную активность во всех клеточных линиях. Самым эффективным ингибитором оказалось соединение 36b, которое на исследованных

раковых клеточных линиях показало наибольшее подавление в активности теломеразы. Соединение 39b продемонстрировало наименьшую способность к ингибированию теломеразы. Активнее теломераза ингибировалась в клетках А549. Более того, А549 оказались более чувствительными к действию всех трёх проверяемых соединений. Самое активное соединение 36b снизило активность теломеразы до 18.1±5.4 %. НСС-44 оказались наиболее устойчивыми к ингибированию (для 36b да 54.4±4.4 %). Полученные результаты свидетельствуют о том, что соединения, показавшие значительную антителомеразную активность в лизатах клеток, успешно проникают внутрь клетки и подавляют теломеразу.

Относительно аллостерического сайта связывания был смоделирован молекулярный докинг, поскольку наши соединения аналогичны аллостерическому ингибитору BIBR1532A. Результаты докинга показали, что все соединения взаимодействуют в сходных положениях, и значения скоринг-функции варьировались от -7.6 ккал/моль до -10 ккал/моль. Была отмечена небольшая корреляция скоринг-функции с экспериментальными показателями ингибирования. Соединения взаимодействуют с аллостерическим сайтом при помощи гидрофобных взаимодействий, водородных связей и катион-*π* взаимодействия (Рисунок 12.13).



Рисунок 12.13 – Положение соединения 36b в аллостерическом сайте теломеразы, предсказанное молекулярным докингом. (левая панель) Структура теломеразы представлена молекулярной поверхностью. (правая панель) Основные взаимодействия соединения 36b с аллостерическим сайтом. Водородная связь представлена жёлтой линией, катион-π взаимодействия – красной пунктирной линией, гидрофобные взаимодействия – светло-голубыми пунктирными линиями

Оценка ингибирования теломеразы синтезированных соединений была проведена по модифицированному протоколу амплификации теломерных повторов (TRAP), причём BIBR1532 был положительным контролем. Концентрации полумаксимального ингибирования IC50 тридцати новых ингибиторов 25а-39b принимают значения от 0.3 мкМ до 205.3 мкМ, когда у BIBR1532 IC50 = 0.2 мкМ. Результаты исследования по TRAP (значения IC50 and IC90), представленные в Таблице 1, показывают, что мы разработали и синтезировали три группы новых ингибиторов теломеразы. Шестнадцать соединений продемонстрировали наибольшее ингибирующее действие: их значения IC50 от 0.3 до 13.5 мкМ. Семь соединений умеренно ингибировали теломеразу: значения ІС50 от 20.9 до 53.6 мкМ - и ещё семь соединений слабо ингибировали теломеразу: значения IC50 от 89.9 до 205.3 мкМ. Относительно размера кольца аминной части (n=1 или n=2), было замечено, что соединения с 2-циклопента тиофеновым амином (n=1) оказались более сильными ингибиторами теломеразы, чем аналоги тетрагидробензотиофена (n=2), за исключением соединений 31, 33, 34, 36 и 39. В то время, как в группе 3 лучшую активность показали ингибиторы с липофильными дополнительными ароматическими аналогами такими, как нафталин в 35а-ь и 36а-ь и индол в 39а-ь их концентрации полумаксимального ингибирования ІС50 ¬¬принимали значения от 0.3 до 5.3 мкМ. Присутствие менее липофильного бензодиоксольного кольца в соединениях 37а-ь и 38а-ь понижало активность: ІС50 ¬¬принимали значения от 23.5 до 97.8 мкМ. В группе 1 присутствие таких электроноакцепторных групп, как хлорид и трифторметил, повышали эффективность ингибитора. Соединения 27а-b и 28а-b, содержащие дихлорбензил с двумя атомами хлора в орто, мета- и мета-параположениях, имели концентрацию полумаксимального ингибирования IC50 от 6.5 до 12.5 мкМ. А IC50 ингибиторы 25а-b с пара-трихлорметилбензилом принимали значения от 20.9 И 25.8 мкМ соответственно. И, наоборот, наличие электронодонорных групп понижали эффективность, как показывают IC50 соединений 26а-b с мета, пара-диметоксибензилом, равные 13.5 и 53.6 мкМ соответственно. В группе 2 ингибиторы с замещённым бензальдегидом показали, что присутствие колец пиперидина и морфолина в пара-положении увеличивает активность, и соединений 29а-b и 30а-b проявили концентрацию полумаксимального ингибирования ІС50 в диапазоне значений от 1.7 до 5.9 мкМ. На значительное

снижение активности повлияла N-метилпиперазиниловая группа в пара-положении бензолового кольца соединений 31a-b, поскольку её полярность не сочетается с липофильной частью активного сайта. Значения IC50 соединений 31a-b 98.5 и 89.9 мкМ соответственно. Кроме того, соединение 32b с мета-метокси-пара-бензилоксибензоловой группой и n=2 обладало IC50, равной 109.7 мкМ. Соединение 32a оказалось исключением с мета-метокси-пара-бензилоксибензоловой группой и n=2: его IC50 равна 6.4 мкМ. Присутствие полярного пиразольного кольца в соединениях 33a-b и 34a-b значительно снизили активность (Рисунок 12.14).



Рисунок 12.14 — Обобщение зависимости активности от структуры (SAR) для соединений 25а-39b в качестве ингибиторов теломеразы

Разработаны и синтезированы тридцать новых соединений из уже доступных и дешёвых первичных материалов. Проанализирована по протоколу амплификации теломерных повторов (TRAP) активность теломеразы под действием всех синтезированных соединений. Три соединения 29а, 36b и 39b проявили наилучшие ингибиторные свойства. Максимальную активность проявило соединение 36b (IC50 равна 0.3 мкМ). IC50 соединений 29а и 39b – 1.7 и 2 мкМ соответственно. Проведена оценка активности теломеразы в живых клетках по протоколу амплификации теломерных повторов (TRAP). Установлено, что все три соединения успешно проникли сквозь мембрану. Для соединения 36b проанализировано взаимодействие

с другими мишенями на панели NCI-60. Установлено, что рост клеток практически не изменился, что подтверждает высокую избирательность соединения 36b. По предсказанию SwissADME, соединение 36b хорошо взаимодействует с ЦНС и обладает повышенной биодоступностью, по сравнению с BIBR1532.

12.4. Изучение интерактома цитохрома Р450 2E1 в микросомах печени человека с помощью масс-спектрометрии химических сшивок

Особый интерес вызывает роль белок-белковых взаимодействий Р450 в изменении метаболизма лекарств у человека при хроническом воздействии алкоголя. Многократное увеличение содержания Р450 2E1 (СҮР2E1) в печени и других тканях является одним из наиболее важных эффектов алкоголя на экспрессию белка. Участие СҮР2E1 в случаях взаимодействия алкоголя и лекарств обычно считается незначительным из-за его незначительной роли в метаболизме лекарств, однако, наши исследования влияния СҮР2E1 на активность СҮР3A4, СҮР1A2 и СҮР2C19 являются убедительными доказательствами прямого эффекта алкогользависимой индукцией СҮР2E1 на изменение метаболизма лекарств.

С целью выяснить общесистемное действие повышения содержания цитохрома P450 2E1 (CYP2E1) был исследован ряд белок-белковых взаимодействий (интерактом) в микросомах печени человека (МПЧ) с использованием массспектрометрии химических сшивок (CXMS). Экспериментальный ход исследования интерактома CYP2E1 проиллюстрирован на рисунке 12.15.



Рисунок 12.15 – Схема экспериментального процесса анализа интерактома CYP2E1 с использованием масс-спектрометрии химических сшивок (CXMS)

По оценке эффективности бензофеноновой модификации белков инкубация CYP2E1 с BPM приводила к включению до трех молекул сшивающего агента на молекулу фермента без его денатурации или инактивации, тогда как для BPS наблюдалось включение до семи таких молекул на молекулу белка. На рисунке 12.16 показаны спектры поглощения для модифицированных белков BPM-CYP2E1 (красный) и BPS-CYP2E1 (синий) и немодифицированного CYP2E1 (сплошной черный).



Рисунок 12.16 — Спектры поглощения немодифицированного СҮР2Е1 (сплошная черная линия) и СҮР2Е1, модифицированного ВРМ (красный) и ВРЅ (синий). Черная пунктирная линия показывает спектр поглощения 1 мкМ ВРМ. Вставка — спектр поглощения модифицированного ВРМ-СҮР2Е1, элюированного со смолы Ni-NTA после эксперимента по сшиванию

Спектр поглощения белков микросом после химической сшивки с белкомприманкой СҮР2Е1, элюируемых со смолы Ni-NTA (рисунок 12.16, вставка), указывал на присутствие значительных количеств сшитых или неспецифически связанных белков. Анализ на SDS-PAGE выявил несколько заметных полос, соответствующих белкам с молекулярными массами, отличными от СҮР2Е1 (рисунок 12.17). Белковые полосы дорожек в контрольном эксперименте с немеченным СҮР2Е1 и с бензофенон-активированным СҮР2Е1 схожи, что позволяет предположить, что оба образца могут содержать неспецифически связанные белки. Для протеомного анализа выбрали зоны геля 1-5 (рисунок 12.17), содержащие сами активированные белки СҮР2Е1 и вероятные ковалентно сшитые с ними комплексы.

SDS-PAGE более 740 Протеомный анализ фрагментов выявил микросомальных цитоплазматических белков. присутствующих И В микросомальной мембране или просвете микросом. Среди этих белков наиболее представленными были CYP2E1, CES1 (печеночная карбоксиэстераза 1) и P4HB (протеиндисульфидизомераза), содержание которых составило более 60% от всех обнаруженных белков. Все P450, UGT и большинство других представляющих интерес микросомальных мембранных белков (NADPH-цитохром P450 редуктаза, гемоксигеназа 1, микросомальная эпоксидгидролаза, флавинсодержащие монооксигеназы и т. д.) имеют молекулярную массу от 45 до 85 кДа (зоны 1 и 2).



Рисунок 12.17 – Схема выделения зон в геле SDS-PAGE для идентификации белков с использованием ВЭЖХ-МС/МС. Дорожки на SDS-PAGE визуализируют белки, полученные в экспериментах по сшиванию с МПЧ (LFJ) с использованием BPM-CYP2E1 (1) и BPS-CYP2E1 (2) в качестве белка-приманки и в контрольном эксперименте с интактным CYP2E1 (4). Дорожки 3 и 5 соответствуют калибровочной смеси белков (5, 15, 30, 35, 50, 65, 95, 130, 175 и 270 кДа) и очищенному белку CYP2E1, соответственно

Их появление в зонах с более высокой молекулярной массой указывает на сшивку с белком-приманкой. Идентификацию потенциальных белков, сшитых с

СҮР2Е1, проводили по соотношению нормированных интенсивностей пептидных пиков в зонах 3 и 4 (молекулярные массы 85–155 кДа) к обнаруженным в зонах 1 и 2 (45-85 кДа). Случаи, когда это соотношение в образце с сшивкой было выше, чем в контроле (с немодифицированным СҮР2Е1), рассматривали как указывающие на потенциальное сшивание. Помимо нескольких видов P450 и набора UGT, в этот микросомальные мембранные белки, список входят такие как жирная альдегиддегидрогеназа (FALDH, название гена ALDH3A2), эпоксидгидролаза 1 (EPHX1), флавинсодержащая монооксигеназа FMO3, которые непосредственно вовлечены или тесно связаны с метаболизмом ксенобиотиков в печени.

Последующий анализ включал изучение закономерностей распределения потенциальных белков-партнеров между зонами SDS-PAGE. Помимо набора белков, определенных в первом раунде скрининга (таблица 12.3), мы дополнительно проанализировали распределение по зонам геля пептидов цитохрома b5 (CYB5A), компонента 1 мембраны рецептора прогестерона (PGRMC1) и других видов Р450 и UGT. идентифицированных В образцах c сшивкой, которые являются потенциальными партнерами СҮР2Е1. Кроме того, было проанализировано распределение печеночной карбоксиэстеразы 1 (CES1)И протеиндисульфидизомеразы (Р4НВ) между зонами геля в качестве эталонов белков без образования связей, поскольку они расположены в просвете ЭПР И, следовательно, не могут взаимодействовать с Р450, если мембрана ЭПР не разрушена. На рисунке 12.18 представлено распределение потенциально сшитых белков между отдельными полосами дорожек SDS-PAGE, полученное в экспериментах с BPM-CYP2E1 (A) и BPS-CYP2E1 (B), усредненное по трем отдельным экспериментам с HLM(LFJ) и HLM(LBA). Ось У графика соответствует отношению нормализованного содержания белка в сшитом образце к контролю.

Значительное отличие профилей СҮРЗА4, СҮР4F2 и СҮР2А6 (увеличение содержания до двух порядков) от эталонных, не образующих сшивок белков CES1 и Р4HB свидетельствует об образовании многочисленных сшитых агрегатов первых трех белков с приманкой СҮР2E1. Результаты, полученные с двумя разными сшивающими агентами — ВРМ и ВРЅ, демонстрируют схожие закономерности. В обоих случаях профили имеют ярко выраженный максимум в зоне молекулярных масс 85–110 кДа, что свидетельствует о преимущественном образовании димерных

поперечных связей. Профили, полученные после BPS-сшивки, свидетельствуют о более обширном образовании тримерных агрегатов. Это наблюдение согласуется с более высокой степенью модификации BPS-CYP2E1 по сравнению с его BPM-модифицированным аналогом (семь бензофеноновых групп на молекулу белка с BPS по сравнению с тремя в случае BPM).



Рисунок 12.18 – Распределение потенциально сшитых белков между отдельными полосами дорожек SDS-PAGE, полученное в экспериментах с BPM-CYP2E1 (A) и BPS-CYP2E1 (B). Ось Y соответствует отношению нормализованного содержания белка в сшитом образце к контролю. Ось X показывает приблизительные средние молекулярные массы всех белков, обнаруженных в каждой полосе

В последующем анализе были идентифицированы белки, которые демонстрировали соотношение выше 30 по нормализованной интенсивности пептидов между сшивкой и контролем в любой из зон геля, соответствующей молекулярным массам выше, чем у самого белка (зоны 2–5 для цитохромов Р450 и UGT, зоны 3–5 для NCPR и зоны 1–5 для цитохрома b5 и PGRMC1). Пороговое значение 30 было выбрано на основе самого высокого значения, встречающегося для несшиваемых эталонных белков (значение 28 наблюдалось для Р4НВ в зоне 2 образца HLM(LBA)). Белки, соответствующие этому критерию в четырех или более отдельных экспериментах, считались наиболее вероятными партнерами белокбелковых взаимодействий СҮР2Е1. Согласно этому анализу список наиболее

вероятных партнеров по взаимодействию СҮР2Е1 (5–6 экспериментов) включает P450 2A6, 3A4 и 4F2; UDP-глюкуронозилтрансферазы 1A6, 1A9, 2B4, 2B10, 2B15 и 2B17. Сшивки СҮР2Е1 с СҮР4А11, СҮР2С8, UDP-глюкуронозилтрансферазами 1A1, 1A4 и 2B7 и цитохромом b5 обнаружены в четырех из шести экспериментов, что также свидетельствует о высокоаффинных взаимодействиях в этих парах. Другими потенциальными партнерами по взаимодействию с СҮР2Е1 являются жирная альдегиддегидрогеназа (FALDH), эпоксидгидролаза 1 (EPHX1), дисульфидоксидаза 1α (Ero1α оксидаза, ERO1L) и рибофорин II (RPN2), которые были установленны в предыдущем анализе.

Основную роль в метаболизме лекарств и других ксенобиотиков в организме человека играет ансамбль цитохромов Р450. Принято считать, что функциональная универсальность ансамбля Р450 достигается в основном за счет присутствия более десятка видов Р450, различающихся по субстратной специфичности. Однако зависимость общесистемных проявлений системы метаболизма лекарств от состава пула Р450 в печени человека значительно усложняется за счет последовательных белок-белковых взаимодействий компонентов системы, в том числе образование гетеромерных комплексов нескольких видов Р450 и взаимодействия Р450 с другими ферментами, метаболизирующими лекарственные средства, и регуляторными белками.

Применение нового подхода CXMS позволило продемонстрировать высокоаффинные белок-белковые взаимодействия индуцируемого алкоголем белка СҮР2Е1 в микросомах печени человека. Были обнаружены сшитые димерные и тримерные комплексы СҮР2Е1 с другими ферментами, метаболизирующими лекарственные средства. Среди наиболее интенсивно связывающихся партнеров CYP2E1 цитохромы P450 2A6, 2C8,3A4, 4A11 И 4F2. UDPглюкуронозилтрансферазы (UGTs) 1А и 2В, дегидрогеназа жирных альдегидов (ALDH3A2), эпоксидгидролаза 1 (EPHX1), дисульфидоксидаза 1а (ERO1L) и рибофорин II (RPN2). Эти результаты демонстрируют высокий исследовательский потенциал предложенного подхода CXMS и подтверждают концепцию тесной функциональной интеграции в системе метаболизма лекарственных средств у человека посредством белок-белковых взаимодействий составляющих ферментов.

12.5. Профилирование интерактома белков из лизата биоматериала в составе стабильных молекулярных комплексов

Большинство белковых молекул в живых системах функционируют не сами по себе, а в составе различных белковых комплексов — от простейших димерных структур до сложных молекулярных систем, состоящих из десятков субъединиц. Образование белковых комплексов осуществляется посредством белок-белковых взаимодействий (ББВ). Таким образом, научная область, называемая белковой интерактомикой, направлена решение основных проблем: на трех (1)идентификация белковых партнеров и частей сложных внутриклеточных структур; (2) установление параметров ББВ (аффинность, специфичность молекулярного распознавания, скорости образования и распада комплексов, термодинамика и структура комплекса); (3) изучение функциональной роли идентифицированного ББВ. Успешное решение этих проблем может значительно расширить наши фундаментальные знания о структуре, принципах функционирования и регуляции белковых комплексов и внутриклеточных молекулярных механизмов. С точки зрения применения важно найти ББВ, которые могут быть использованы в качестве мишеней для инновационных препаратов, избирательно регулирующих биологические процессы на уровне ББВ.

Первоначальной задачей белковой интерактомики является системный анализ ББВ и каталогизация белковых комплексов. Сложность этой задачи обусловлена многоуровневой архитектурой, структурной и функциональной динамичностью, а так же гибкостью белкового интерактома в результате молекулярных перестроек в клетке в ответ на действие многих эндогенных и экзогенных факторов.

Разнообразные белковые комплексы могут быть охарактеризованы с использованием ряда критериев: (1) количество отдельных белков (субъединиц), участвующих в комплексах: димеры, тримеры, тетрамеры и т.д.; (2) идентичность субъединиц: гомо- и гетеродимеры и т.д.; (3) функциональная значимость: моно- или мультифункциональные комплексы; (4) количество белков, взаимодействующих с целевым белком в олигомерном комплексе.

Функционально значимые белковые комплексы можно условно разделить на стабильные (долгоживущие) и динамические (короткоживущие, также известные как метастабильные или переходные). Эта оценка белковых комплексов основана на

следующих параметрах ББВ: константе равновесной диссоциации (KD), константах скоростей ассоциации и диссоциации (kon и koff, соответственно) и периоде полураспада (t1/2) комплекса. Динамические белковые комплексы, как правило, многофункциональны, поскольку они являются частью многих сигнальных и метаболических путей, либо за счет присутствия множества доменов, либо за счет образования переходных комплексов, которые различаются по функции. Более того, срок службы динамического белкового комплекса определяет эффективность определенного биологического процесса.

Базы данных, такие как hu.MAP v.2.0 (дата обращения 5 сентября 2022 года, http://humap2.proteincomplexes.org/), CORUM v.3.1 (дата обращения 5 сентября 2022 года, https://mips. helmholtz-muenchen.de/corum/) и комплексный портал (дата обращения 5 сентября 2022 года) (https://www.ebi.ac.uk/complexportal/home) являются важными веб-инструментами для сбора и интерпретации данных интерактомного профилирования и содержат информацию о 6965, 5134 и 2472 белковых комплексах, соответственно. Однако одной из главных проблем белковой интерактомики является отсутствие информации об участии большинства белков в образовании стабильных белковых комплексов. Эта проблема дополнительно осложняется тем фактом, что спектр ББВ конкретного белка может отличаться в зависимости от его субклеточной и тканевой локализации, а также в нормальных условиях и при наличии патологического процесса. По-прежнему существует общая методологическая проблема анализа и дифференцировки стабильных и динамичных белковых комплексов. Это связано с отсутствием унифицированных протоколов получения тканевых или клеточных лизатов, что приводит к различной скорости диссоциации нативных белковых комплексов и существованию множества индивидуальных методик разделения белковых комплексов. Целью данной работы является оценка текущих возможностей И перспектив интерактомного профилирования белков, участвующих в образовании стабильных белковых комплексов, на основе методологической парадигмы разделения белков и их стабильных комплексов с последующей масс-спектрометрической идентификацией.

В области белковой интерактомики до сих пор не существует универсального метода обнаружения ББВ, поэтому в большинстве исследований используются различные комбинации протеомных методов. Каждый из них оптимизирован для

узкоспециализированных задач со своим набором преимуществ и недостатков. Для идентификации возможных стабильных белковых комплексов часто используется панель нескольких современных аналитических методов. К ним относятся дигибридный дрожжевой анализ, метод химического сшивания, ультрацентрифугирование в градиенте плотности, ко-иммунопреципитация и тандемная аффинная очистка, а также нативный анализ методом "голубого" гельэлектрофореза. Все методы коэлюции белков основаны на разделении белковых комплексов в нативных условиях. Основная идея здесь заключается в том, что белки, принадлежащие к одному комплексу, элюируются или мигрируют вместе при разделении. Среди ЭТИХ методов чаще всего используются совместное фракционирование на основе эксклюзионной хроматографии (гель-фильтрация, SEC) и фракционирование с помощью ионообменной хроматографии (IEX) из-за их высокой воспроизводимости рутинных экспериментальных данных. протоколы и наличие научного оборудования. Высокий технический уровень интерактомного профилирования на основе SEC и/или IEX в сочетании с другими протеомными методами позволяет добиться хорошего разделения отдельных белков и белковых комплексов. Для точной панорамной оценки распределения нативных белков между мономерными и олигомерными формами, а также гетерокомплексов во фракциях лизатов существует подход, сочетающий фракционирование SEC с многоугловым светорассеянием (MALS) Для полуколичественной и количественной оценки белков в образцах лизатов используют различные варианты масс-спектрометрической идентификации белков в том числе анализ в градиенте плотности методом массспектрометрии (qDGMS), метод стабильных изотопов, мечение аминокислотами в клеточной культуре (SILAC) и импульсный SILAC (pSILAC) для изучения динамики и числа оборотов белков в комплексах. Общую схему панорамного профилирования белковых интерактомов можно разделить на два блока: «Блок генерации данных» и «Аналитический блок» (рисунок 12.19). Блок генерации данных состоит из преаналитического и подготовительного этапов. Аналитический блок включает этапы биоинформатики и проверки результатов интерактомного профилирования.

Преаналитический этап заключается в выборе и оптимизации метода пробоподготовки биологического образца для превращения белкового материала в лизат с использованием мягких условий солюбилизации с целью сохранения

нативных стабильных белковых комплексов. В зависимости от целей эксперимента можно включить стадию обогащения образца материалом с определенной субклеточной локализацией, например, цитоплазматической или мембранной фракцией. Подготовительный этап включает либо SEC-фракционирование лизатного материала, либо серийные циклы SEC и IEX для повышения эффективности разделения белковых комплексов с различными физикохимическими свойствами. Принцип SEC заключается в разделении компонентов сложной смеси в соответствии с их молекулярной массой (тогда как IEX использует разницу их зарядов) в разделительной колонке, заполненной химически инертным сорбентом.

Чем крупнее молекула, тем меньше глубина ее проникновения в гранулу сорбента, содержащую поры разного размера. В результате путь крупных молекул в сорбенте короче, чем у мелких. Поэтому крупные молекулы покидают разделительную колонку быстрее, чем мелкие. Принцип высокоэффективной SEC заключается в разделении лизата на несколько фракций, каждая из которых содержит белки и мультибелковые комплексы одинаковой молекулярной массы (ММ). В результате последующего анализа содержания белка во фракциях можно получить профили элюирования белка в зависимости от свойств используемого «молекулярного сита». Для этого после фракционирования в ЭХ белки каждой фракции подвергают ферментативному протеолитическому расщеплению (например, трипсинолизу) по стандартным протоколам с последующим массспектрометрическим анализом (ЖХ-МС/МС) протеолитических пептидов и биоинформатической обработкой данных. Пример типичной хроматограммы высокоэффективного SEC-фракционирования лизата цельной ткани показан на рисунок 12.20.



Рисунок 12.19 — Общая схема протокола панорамного интерактомного профилирования



Рисунок 12.20 — Типичная хроматограмма высокоэффективного SECфракционирования лизата цельной ткани печени. Шесть лизатных фракций, отобранных для сравнительного анализа белкового состава, обозначены цифрами 1–6

Данные были получены из наших предыдущих экспериментов. Образец лизата ткани был разделен на 22 фракции, и для сравнительного анализа белкового состава фракций было выбрано шесть репрезентативных фракций. Эти фракции охватывали диапазон мономерных белковых молекул (45-60 кДа), диапазон (60 - 150)тримеров кДа) диапазон. соответствующий димеров И И белковым комплексам (150-450 кДа). высокомолекулярным При средней молекулярной массе белка 42 кДа (по базе данных UniProt) последние комплексы состояли не менее чем из четырех и более субъединиц. Из хроматограммы следует наличие двух ярко выраженных белковых пиков, один из которых находится в области мономерных белковых молекул (ММ 45 кДа), а другой пик 350 кДа, площадь которого в 2,5 раза больше первого, находится в области области белковых комплексов с молекулярной массой от 150 до 350 кДа.

Генерация гипотез о составе устойчивых белковых комплексов часто основывается на корреляции профилей коэлюции белков. Чтобы предсказать состав возможных стабильных белковых комплексов, присутствующих в каждой фракции, используется ряд биоинформационных алгоритмов для анализа данных ЖХ-MC/MC. В алгоритмах используются определенные ЭТИХ комбинаторные предположения И кластеризация данных, которые порождают избыточное количество конечных гипотез, особенно в случае предсказания белковых гетерокомплексов, содержащих три и более субъединиц.

Один из возможных алгоритмов, используемых в нашей практике для интерпретации данных о ББВ в SEC-фракции тканевого лизата, представлен на рисунке 12.21 Как видно из рисунка, двухэтапный алгоритм анализа данных «Димеры» включает генерацию гипотезы для димерных белковых комплексов и отбор гипотез по двум дескрипторам: ММ и полуколичественной оценке содержания белка во фракции.



Рисунок 12.21 – Алгоритм интерпретации данных о белок-белковых димерах во фракциях, полученных при разделении методом SEC. Он состоит из двух этапов генерации димерных гипотез в программе «Димеры»; в результате формируются два списка гипотез. Также проводится отбор наиболее приоритетных гипотез методами in silico для дальнейшей экспериментальной проверки

Для проверки стабильных белковых комплексов, идентифицированных панорамным интерактомным профилированием белков в тканевых и клеточных лизатах, можно использовать различные методы. Один подход, который мы успешно использовали для идентификации белков-партнеров, образующих стабильные белком-мишенью, представляет собой комплексы С процедуру прямого молекулярного лова. Протокол этой процедуры основан на аффинном выделении и масс-спектрометрической идентификации потенциальных белков-партнеров из цельного лизата (или из его фракций SEC), где целевой белок («белок-наживка») ковалентно иммобилизован на твердом носителе (хроматографические сорбенты или парамагнитные наночастицы).

Большинство белков функционируют как часть различных комплексов, стабильных образующихся посредством И динамичных белок-белковых взаимодействий (ББВ). Профилирование ББВ расширяет фундаментальные знания о функциях И паттернах регуляции белковых комплексов структурах, И внутриклеточных молекулярных механизмов. Белковая интерактомика направлена на решение трех основных задач: (1) идентификация белков партнеров и частей сложных внутриклеточных структур; (2) анализ параметров ББВ (аффинность, специфичность молекулярного распознавания, константы кинетической скорости и термодинамические параметры); (3) изучение функциональной роли новых ББВ. Целью данной работы является обновление текущего состояния и перспектив мульти-"омикс" подходов к профилированию белков, участвующих в образовании стабильных комплексов. Выявленная методологическая парадигма включает разработку методов извлечения и разделения белков из тканей или клеточных лизатов и последующую идентификацию белков с использованием массспектрометрического анализа.

12.6. Протеом белков плазмы крови для медицины: мета-анализ результатов количественных измерений методами целевой масс-спектрометрии содержания белков в крови здорового человека

Биохимический анализ крови давно используется в медицинской практике для оценки состояния здоровья человека. Совокупность белков или протеом плазмы крови играет особую роль в диагностике социально-значимых заболеваний, в том

числе сердечно-сосудистых патологий, сахарного диабета и различных типов рака. Исследователей давно занимает вопрос, какое количество белков находится в плазме крови, в каких концентрациях присутствует каждый белок, и чем отличается белковый здорового И больного состав плазмы человека. Применение моноклональных антител в настоящий момент времени является золотым стандартом для детектирования и количественной оценки белков в плазме крови. Такой подход имеет ряд недостатков, включая ограниченную специфичность за счет кросс-реактивности антител, а также низкий потенциал для мультиплексного анализа.

Панорамная и направленная масс-спектрометрия, бурно развивающиеся в представляют собой хорошую альтернативу методам с последние годы, использованием антител для изучения протеома плазмы крови. Панорамный массспектрометрический анализ высокого разрешения позволяет одновременное исследование сотен белков с высокой специфичностью. С использованием данной технологии в рамках проекта HUPO Human Plasma Proteome Project (HPPP), усилиями 35 лабораторий удалось обнаружить около 3000 белков, из которых 900 были идентифицированы с высокой достоверностью. С количественной точки зрения по данным Андерсона и других исследователей в плазме крови в различных концентрациях в диапазоне от 10⁻³ до 10⁻¹² М обнаружено более 1500 различных белков. Это наблюдение характеризует плазму крови как очень сложную биологическую матрицу. Научная группа под руководством Aebersold в 2005 году показала значимость мета-анализа, т.е. объединения результатов нескольких экспериментов, для получения наиболее полной протеомной карты, поскольку оказалось, что различные протеомные методы, варианты пробоподготовки и алгоритмы анализа полученных данных приводят к идентификации в одном образце различных наборов белков. В 2011 году эта научная группа в рамках создания pecypca Peptide Atlas сформировала перечень из 1929 мастерных белков, надежно идентифицированных методом LC-MS/MS в плазме крови. На сегодняшний день, по данным The Human Protein Atlas, с помощью масс-спектрометрии без использования стабильных изотопных меток, в плазме здоровых людей идентифицированы 4072 белка в широком диапазоне концентраций.

В свою очередь, таргетные методы, в том числе мониторинг

выбранных/множественных реакций (selected/multiple reaction monitoring, SRM/MRM). позволяет не только детектировать белки в биоматериале, но и получить абсолютную количественную оценку их содержания, что является критически важным для использования в медицине. Использование в качестве стандартов синтезированных изотопно-меченных пептидных стандартов позволяет увеличить точность идентификации, а также измерить содержание белков. Кроме того, с помощью SRM анализа возможно детектировать белки, присутствующие в области низких (10⁻¹²-10⁻¹⁴ M) и ультранизких (10⁻¹⁵-10⁻¹⁸ M) концентраций, путем необратимого связывания минорных белков плазмы крови на биогранулах, а также применением фракционирования.

Исследований белков плазмы крови методом SRM было проведено меньше по сравнению с панорамным анализом. Благодаря тому, что метод SRM позволяет проводить структурный анализ аминокислотной последовательности пептидов, в настоящее время его все чаще применяют для выявления точечных аминокислотных замен в белках. Например, этот метод может быть использован для количественной оценки протеоформ белков или валидации событий редактирования мРНК ферментами ADAR на белковом уровне.

Следующим логичным шагом кажется адаптация направленной массспектрометрии для клинического применения. Создание и совершенствование имеющихся SRM тест-систем может позволить персонализированно проводить возникновения заболеваний, диагностику предсказание рисков И оценку эффективности лечения, основанную на рациональном назначении препаратов и подборе индивидуальных схем лечения, т.е., для создания цифрового молекулярного образа человека. Сочетание использования меток с целенаправленным МС в режиме мониторинга выбранных реакций (SRM) в настоящее время широко признано в качестве альтернативы иммуноанализу для точного количественного определения белка, а также для подтверждения выводов предыдущих исследований, в которых биомаркеры имеют спорное клиническое значение.

Важной задачей для внедрения SRM тест-систем в клиническую практику является определение референсных норм для белков-аналитов. Подобная информация, например, отсутствует в наборах Biognosys AG. В SRM исследованиях [165,166], упомянутых выше, концентрации исследуемых белков в норме были

взяты из литературных данных, причем референсные значения были получены разными методами, в том числе и не связанными с масс-спектрометрией. Стоит также отметить, что различия в способах получения сыворотки или плазмы крови от пациентов, например, использование пробирок с разными антикоагулянтами, могут привести к статистически значимым различиям в уровнях белков, что затрудняет исследования биомаркеров.

В настоящей работе, на основе мета-анализа SRM данных плазмы здоровых людей мы сформировали набор референсных значений концентраций в плазме крови здорового человека для белков, которые потенциально могут быть использованы в SRM-анализе. Кроме того, сформулированы основные принципы для выбора потенциальных кандидатов в биомаркеры и создания панелей для мониторинга состояния здоровья человека.

Выбор публикаций для мета-анализа данных количественной протеомики осуществлялся с помощью двух стратегий. В первом случае выбор публикаций производился через платформу ScanBious, функционал которой позволяет классифицировать научные публикации по ключевым словам из базы PubMed и отбирать близкие по смыслу работы на основе встроенной системы анализа семантического сходства. Результаты поиска по запросу "Selected Reaction Monitoring Proteomics Human" представлены на рисунке 12.22.

Полученный список содержал 197 статей по заданной тематике, опубликованных в течение последних десяти лет. Как оказалось, в литературных данных по большей части представлены работы, где методом MRM измеряется концентрация единичных белков. Так, например, в работе [167] в образцах плазмы здоровых людей было показано, что концентрация аполипопротеина F составляет 445,2 нг/мл. SRM после 2012 года появляется в работах в качестве метода, который позволяет проводить направленные количественные измерения белков плазмы крови, в том числе, и протеоформ, кодируемых одним геном, как, например, при количественном исследовании изоформ Арое3 и Арое4, различающихся на 1-2 аминокислотных остатка. Таким образом, в настоящее время SRM чаще используется для детального исследования отдельных белков и их протеоформ, чем для количественного "скрининга" протеома, перспективного для медицинских задач. Тем не менее, именно такой скрининг в геноцентричном формате предложен

в качестве экспериментального метода выбора при реализации международного проекта "Протеом человека", имеющего принципиально важное значение для развития медицины.



Рисунок 12.22 — Результаты поиска публикаций SRM данных человека за последние 10 лет (2012-2022) через систему ScanBious. Размер узлов отражает появление ключевых слов в абстрактах публикаций. Найденные ключевые кластеры связаны с поиском биомаркеров новообразований, их чувствительности, специфичности и воспроизводимости. Также из рисунка видно, что анализ SRM часто применялся для исследования раковых клеточных линий, таких как Jurkat, MCF-7, Нер G2

Вторая стратегия выбора научных публикаций включала ручную курацию литературных источников базы PubMed. Как показал такой анализ, в последние годы исследователями по ряду причин все реже происходит выбор метода мониторинга выбранных/множественных реакций для протеомного анализа. Во-первых, это может быть связано с широким распространением других методов, например, с использованием изобарных меток тандемной метки масс (TMT Labeling), позволяющей исследовать образцы мультиплексно и выявлять относительное количественное содержание пептидов. Еще один немаловажный факт – внедрение аффинного обогащения белков с применением аптамеров на платформе SOMAscan, позволяющего добиться одновременной детекции от сотен до тысяч белков. Также

повышение качества количественной оценки данных панорамной протеомики стало возможно при использовании метода data-independent acquisition (DIA) вместо datadependent acquisition (DDA). И, наконец, несмотря на высокую селективность и чувствительность, сама процедура оценки результатов SRM не до конца автоматизирована по сравнению с методами панорамной протеомики и может требовать тщательной визуальной оценки спектров квалифицированным персоналом.

Поскольку наблюдается нисходящий тренд использования метода SRM, можно ожидать, что большинство наборов данных с использованием SRM с текущим уровнем аналитической чувствительности уже опубликовано и доступно в базах данных и репозиториях. Поэтому в этой работе была проведен мета-анализ публикаций для оставления сводной таблицы измеренных методом SRM концентрации белков в плазме крови здорового человека. Мы предполагаем, что уже известные, но недостаточно аннотированные концентрации пептидов, измененные в плазме здоровых доноров, могут помочь в дальнейших исследованиях и поиске биомаркеров различных заболеваний.

Из всех проанализированных публикаций поставленным критериям удовлетворяли всего четыре набора данных, полученных с помощью SRM с использованием синтетических изотопно-меченных пептидных стандартов. Первый, представленный в работе [168], содержал данные о концентрациях 147 пептидов, гены которых принадлежат 18, 13 и Ү хромосомам, а также митохондриальной ДНК, измеренные в пятидесяти четырех образцах. Во второй работе [169] представлены данные о концентрациях 42 пептидов, принадлежащих FDA-одобренным белкам и измеренных в тридцать одном образце. Третий набор данных получен из работы [170]. В нем измерены концентрации 45 белков в двадцати образцах плазмы. Также стоит отметить, что для получения плазмы в первых трех работах в качестве антикоагулянта была использована ЭДТА. Четвертая работа, выполненная [171], содержала количественные данные о максимальной и минимальной концентрации для 144 белков, измеренных как минимум в пяти образцах из исследованных двадцати коммерческих образцов плазмы людей и одного пула. Таким образом, общий список содержал концентрации для 296 белков, двадцать из которых были общими для трех наборов данных и сорок два – для двух (рисунок 12.23 b). При

сравнении абсолютных значений концентраций общих белков найдены максимальные и минимальные значения, а также рассчитано, во сколько раз они отличаются. Данные для 55 белков были в пределах одного порядка концентраций, а для белков Antithrombin-III, Alpha-2-macroglobulin, Complement C3, Transthyretin, Transferrin и Apolipoprotein B-100 отличались в 10 и более раз.

Итоговый список, содержащий 296 белков, был сопоставлен с данными для 4072 белков проекта The Human Protein Atlas, полученными с помощью массспектрометрии, основанной на общедоступных данных проекта Peptide Atlas. Общими для двух массивов данных оказались 172 значения, представленные на рисунке 12.23с и в дополнительной таблице 12.3с. Большая часть концентраций оказалась в пределах одного порядка. Как видно из рисунка, корреляция значений сильно снижалась только в области низких концентраций. Таким образом, концентрации в области средних и высоких значений, полученные на основании количества спектральных идентификаций, сопоставимы с результатами, полученными с помощью SRM. Данные проекта The Human Protein Atlas можно использовать при создании диагностических панелей.

Из сформированного перечня только 53 белка соответствуют сформулированным критериям и могут рассматриваться в качестве стабильной характеристики протеома здорового человека. На рисунке 12.23 d представлена диаграмма, показывающая диапазон концентраций этих белков.

В следующей части работы результаты мета-анализа содержания белков в крови здоровых людей сопоставили с результатами измерения этих же белков в плазме людей на примере двух диагностированных заболеваний. Нами были выбраны данные, полученные с помощью SRM для образцов плазмы пациентов с онкологическими и не онкологическими заболеваниями. Первый набор содержал концентрации белков для образцов плазмы пациентов с неврологическими заболеваниями. Второй набор данных для сравнения был найден в исследовании биомаркеров аденокарциномы легкого. Результаты представлены в таблице 12.3.

Как видно из таблицы, белки с наиболее стабильными значениями концентраций у здоровых доноров, отличались от образцов с патологией не более, чем на 2 порядка. Максимальное отличие в 1,7 раз показано для альфа-2макрогобулина, компонента врожденной иммунной системы, изменения которого

было выявлено ранее при повреждении нейронов.



Рисунок 12.23 – Мета-анализ SRM-данных плазмы здоровых доноров. а) Сравнение количества публикаций в PubMed за последние 10 лет, полученных с использованием разных протеомных методов. Для мониторинга выбранных и множественных реакций (синий цвет) показан нисходящий тренд за последние годы. b) Диаграмма Венна, полученная при сравнении наборов данных SRM-анализа работа Kopylov et al., Novikova et al., Kuzyk et al. и Gaither et al. [168-171] с) Корреляция между значениями концентраций белков плазмы (Log10 (нМ)), измеренных в плазмы здоровых добровольцев методом SRM, и концентрацией этих же белков, доступных в базе The Human Protein Atlas. d) Диапазон концентраций белков, выявленных в более, чем 70% образцов и имеющий межиндивидуальный коэффициент вариации менее 40%

Белки, не обозначенные в таблице цветом, имели разницу концентраций в пределах одного – полутора порядков. Большинство из них, помеченные жирным шрифтом, имели наиболее стабильные значения концентраций и в плазме здоровых доноров. Таким образом, полученные данные можно использовать для выбора потенциальных единичных или целых наборов белков для создания диагностических панелей. Возможно, при минимальных отличиях концентраций в образцах здоровых людей по сравнению с патологией, стоит сделать выбор в пользу другого белка для дальнейших исследований.

В работе суммированы данные из открытых источников по количественному измерению белков в плазме крови здорового человека. Результаты обработки опубликованных данных и сведений из информационных ресурсов в области протеомики представлены в виде таблицы с указанием значений абсолютного количественного содержания белков.

Таблица 12.3 – Сравнение концентраций белков в норме и при патологии, полученных с помощью мониторинга множественных реакций. Синим цветом помечены ячейки, в которых концентрация белка при сравнении отличалась более, чем на 2 порядка. Жирным шрифтом обозначены наиболее стабильные белки плазмы здоровых доноров, найденные в результате мета-анализа этой работы

	Ген	Log 10 (average concentration, fM, M*10 ⁻¹⁵)		
Белок		Плазма здоровых людей	Neurological diseases (n=19, Kiseleva et al., Clin Trans Med, 2015)	Lung adenocarcinoma (n=102, Wu et al., Proteomics Clin Appl, 2020)
Alpha-1-antitrypsin	A1AT	10,0	9,5	
Alpha-2-macroglobulin	A2MG	10,2	8,5	
Apolipoprotein A-I	APOA1	10,6	9,1	
Ceruloplasmin	CERU	9,1	6,5	
Complement C3	CO3	9,2	8,4	
Cystatin-C	CST3	7,7	7	
Fibrinogen alpha chain	FIBA	10,3	8,9	
Haptoglobin	HPT	9,9	9	
Hemopexin	HEMO	9,4	8,3	
Insulin-like growth factor- binding protein 3	IGFBP3	7,4	7	
Plasma protease C1 inhibitor	IC1	8,6	7,5	
Platelet basic protein	CXCL7	8,0	6,8	
Serotransferrin	TRFE	10,3	9,3	
Serum albumin	ALB	11,8	8	
Transthyretin	TTR	9,9	8,5	
von Willebrand factor	VWF	7,8	7	
Complement factor H	CFH	9,0		5,8
Desmoglein-2	DSG2	7,0		6,4
Gelsolin, isoform 1	GSN	9,2		6,8
Lambda-crystallin homolog	CRYL1	6,6		6,2
Lumican	LUM	8,5		6,7
Mucin-16	MUC16	7,7		5,8

Для сравнения приведены примеры изменения содержания этих же белков у пациентов с диагностированными онкологическими и неврологическими заболеваниями. Сформированный перечень белков с указаниями абсолютных концентраций и значений межиндивидуальной вариабельности в плазме крови здоровых людей может быть основой для выбора белков для создания панелей и мониторинга состояния здоровья человека. В этом случае отклонение персональных показателей от параметров здорового человека может быть сигналом для корректировки образа жизни.

12.7. Молекулярное профилирование протеомного состава биологических образцов из Коллекций с использованием масс-спектрометрического детектора

С применением разработанных на предыдущих этапах работ методик массспектрометрического анализа (документы названием «Punkt PG-1.10с Metodika_1.10(1-4)_v1) и разработанного на данном этапе работ СОП (файл в составе отчетной документации «Пункт ПГ-2.12-СОП Протеомика») проведено масс-спектрометрическое профилирование образцов Коллекции-1-PS, ИЗ Коллекции-1-liv, Коллекции-cell, Коллекции-2-PS-сс. Описание образцов, входящих в коллекции приведено в разделе 1 настоящего раздела.

Результаты анализа коллекций биологических образцов – клеточных линий Коллекция-2-cell-HepG2 представлены в виде списков идентифицированных белков, доступных по ссылке https://www.ibmc.msk.ru/articles/075-15-2021-933 (в соответствие с пунктом 2.12 ПГ). Также в данном архиве представлены списки идентифицированных белков по результатам анализа Коллекции-1-liv. Результаты анализа для образцов из других коллекций будут обработаны и представлены на следующем этапе проекта.

Результаты анализа доступны также по ссылкам на депозитарии:

Repositoryname: figshare

Dataidentification number(permanent identifier, i.e. DOInumber):

https://doi.org/10.6084/m9.figshare.19312256.v2

Directlink to the dataset:

https://figshare.com/articles/dataset/Normal_liver_tissue_proteome_analysis/1931 2256

Repositoryname:ProteomExchange:

Permanentidentifier: PXD028510, PXD026997

Согласно п 2.12 ПГ результаты молекулярного профилирования биологических образцов – первичные данные, депонированы в PRIDE, ссылка на

репозиторий с MC файлами: http://www.ebi.ac.uk/pride/archive/projects/PXD026997

Работы по пункту 2.12 плана-графика выполнены в полном объеме и соответствуют пунктам 5.26, 6.1.21 и 7.1.7 технического задания.

13. МОЛЕКУЛЯРНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ МЕТАБОЛОМНОГО СОСТАВА БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ (КОЛЛЕКЦИЯ К1) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО ДЕТЕКТОРА

Целью работы на данном этапе согласно п. 2.13 ПГ и п.5.27 ТЗ было разработать СОП проведения панорамного молекулярного профилирования метаболомного состава биологического образца с использованием массспектрометрического анализа и провести молекулярное профилирование метаболомного состава биологического образца (коллекция К1) с получением перечня метаболитов.

Персонализированная медицина основывается на важности индивидуальных характеристик для ранней диагностики заболеваний и более точной оценки реакции на лечение. Согласно концепции 4П, медицина должна быть профилактической, прогностической, персонализированной и партисипативной (с вовлечением самого пациента), что может быть достигнуто путем применения инструментов и стратегий системной биологии в клинике. Используя глобальные, интегративные и динамические подходы и анализ больших массивов данных, персонализированная медицина может обеспечить глубокое понимание механизмов заболевания, что позволит разделить сложные заболевания на подтипы и открыть новые подходы к назначению лекарств, а также сделать возможной как диагностику заболевания, так и оценку состояния здоровья человека с помощью универсального биологического образца как кровь [172,173]. Современная клиническая практика имеет дело с ограниченным числом физиологических параметров и, таким образом, основывается на небольшом объеме информации о состоянии организма. Современные постгеномные технологии позволяют проводить комплексный анализ организма на различных уровнях биологической организации от генов до метаболитов, обеспечивая новые способы лечения и профилактики заболеваний за счет проведения ранней диагностики и более целенаправленного фармакологического лечения [174,175]. Метаболомика является самой молодой omics наукой после протеомики и часто рассматривается как наиболее перспективная для клинической практики. Метаболомика изучает метаболиты - как эндогенные, так и экзогенные низкомолекулярные соединения (до 1000-1500 Да), которые могут быть как
субстратами, так и конечными продуктами биохимических процессов в организме. Следовательно, метаболом как совокупность всех метаболитов отражает как внутренние патофизиологические процессы в организме, так и влияние окружающей среды [176,177]. Метаболомное сообщество считает, что «узкий спектр анализов, используемых сегодня медицинским сообществом, в будущем будет заменен анализами, которые выявляют гораздо более полную метаболическую сигнатуру. Ожидается, что эта сигнатура будет описывать глобальные биохимические отклонения, которые отражают закономерности изменения состояния здоровья, более точно описывать конкретные заболевания и их прогрессирование и значительно помогать в дифференциальной диагностике» [178].

Согласно PubMed, на сегодняшний день опубликовано более 3 000 000 метаболомных исследований, направленных на открытие новых методов диагностики заболеваний. После 2007 года ежегодное количество таких статей превышает сто тысяч. Каждое новое исследование предоставляет новые данные о механизмах заболеваний, лекарственных мишенях и терапии, приближая нас на один шаг к открытию omics-тестов, подходящих для клинического применения [179-181]. Метаболомные данные, накопленные за последние десятилетия В соответствующих базах данных, содержат исчерпывающую информацию о более чем 200 000 метаболитов, более чем 800 метаболических путях, наборах метаболитов и аномальных концентрациях метаболитов, связанных с различными состояниями и заболеваниями, а также расположении метаболитов в органах, тканях и даже их субклеточной локализации. Представлены сотни метаболических сигнатур различных заболеваний, обнаруженных в крови, моче, спинномозговой жидкости и кале [182]. Таким образом, использование накопленных метаболомных данных вместе с современными высокопроизводительными методами измерения больших наборов низкомолекулярных веществ в биопробах делает возможным внедрение метаболомики в клинику [183]. Однако, несмотря на столь огромные наборы данных, собранные на сегодняшний день, и такие многообещающие перспективы, пока нет одобренных FDA (Food and Drug Administration) метаболомных тестов.

13.1. Разработка СОП проведения панорамного молекулярного профилирования метаболомного состава биологического образца с использованием массспектрометрического анализа

Протокол поиска биомаркеров включает в себя несколько ключевых этапов, таких как исследование, валидация и трансляция полученных результатов в клиническую практику. На каждом из этих этапов достигнут значительный прогресс с точки зрения технологических достижений в области получения, анализа и интеграции метаболомных данных, но некоторые ограничения все еще существуют [179,183-191].

В 2007 году Метаболомное Общество учредило Комитет Инициативы по стандартизации в области метаболомики (MSI) для разработки контроля качества и стандартных операционных процедур (СОП), которым следует тщательно следовать на протяжении всего процесса метаболомного исследования [178,192-195]. Общеизвестно, что основная проблема всех методов, разработанных для диагностических целей, заключается в том, что стандартизация необходима на всех этапах процесса, начиная с критериев отбора исследуемых когорт, используемого метода метаболомного анализа и заканчивая статистическим анализом данных. Стандартизация всех этих этапов позволит предотвратить риск некачественного выполнения метаболомных протоколов, неправильного количественного определения метаболитов и вводящей в заблуждение интерпретации данных [196-2011.

Например, разные метаболомные исследования одного и того же заболевания могут давать резко отличающиеся или только частично схожие результаты из-за различий в дизайне исследования, включая принципы формирования исследуемых групп, а также различий в участниках, таких как возраст, пол, продолжительность заболевания, возраст начала заболевания и наличие других сопутствующих заболеваний или факторы риска прогрессирования заболевания. Упомянутые расхождения между исследованиями указывают на необходимость высококачественного, хорошо продуманного дизайна эксперимента, включающего тщательное рассмотрение изучаемых когорт и отбор соответствующего контроля. Конечно, в случае крови образец должен быть взят натощак, чтобы свести к вариабельности Чтобы минимуму нежелательные источники метаболома.

уменьшить влияние меж- и внутри-индивидуальных различий, анализируемые группы должны быть схожи по демографическим признакам (пол, этническая принадлежность, возраст), образу жизни (диета) и физиологическим факторам (индекс массы тела (ИМТ)) в дополнение к параметрам, непосредственно связанным с целью исследования. Соответствующие данные должны быть тщательно собраны и могут быть использованы не только для разработки дизайна эксперимента, но и для анализа полученных результатов [178]. В случае возможной высокой межиндивидуальной вариабельности требуется более крупная выборка. Размер выборки является одним из основных факторов, влияющих на результаты эксперимента, и должен быть достаточным для обеспечения статистически достоверных результатов исследования с учетом фенотипической вариабельности метаболома. Количество образцов, необходимых для полной идентификации и понимания механизмов заболевания, может зависеть от сложности изучаемого патофизиологическогоо процесса [202]. Очень часто главным ограничением метаболомного исследования являются небольшие по размеру группы и отсутствие валидационной когорты, что приводит к недостаточной статистической надежности полученных результатов [203].

Следующая проблема заключается в том, что перечень детектируемых метаболитов зависит от технологического процесса, поскольку получены с использованием разных аналитических платформ, а значит, отличаются по процедурам подготовки образцов и измерительному оборудованию. Вот почему очень часто обнаруженные наборы метаболитов специфичны для конкретного исследования.

Согласно существующим базам данных, метаболом человека содержит тысячи метаболитов, различающихся по концентрации (от г/л до пг/л), химическим и физическим свойствам и стабильности [195]. Поэтому для всестороннего анализа метаболома необходимы различные аналитические платформы и различные процедуры подготовки образцов [204,205]. В настоящее время не существует стандартизированных протоколов экстракции метаболитов, и обычно метод пробоподготовки выбирается в зависимости от представляющих интерес метаболитов [206]. Такая же ситуация наблюдается и для инструментальных методик. 1Н спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и масс-

спектрометрия (МС) являются двумя основными аналитическими методами в метаболомике. Оба они могут быть использованы для идентификации и количественного определения большого количества метаболитов в сложных биопробах. Несмотря на то, что ЯМР характеризуется лучшей воспроизводимостью, методы, основанные на МС, обладают более высокой чувствительностью. Поэтому технология на основе МС широко используется в клинически ориентированных метаболомных исследованиях. Независимо от того, используются ли методы нецелевой или целевой метаболомики, оба подхода имеют одни и те же сложности из-за разнообразия метаболома [207]. В обоих случаях только определенный класс соединений в соответствии с их химическими или физическими свойствами может быть измерен благодаря протоколу подготовки образца, методу разделения (газовое или жидкостное хроматографическое разделение, одномерное или двумерное) и масс-спектрометрическому методу ионизации, используемому в исследовании. Например, метод газовой хроматографии сопряженной с масс-спектрометрией (ГХ-МС) позволяет анализировать только летучие и термостабильные метаболиты, такие как большинство аминокислот, сахарные спирты, ароматические амины и органические кислоты [208,209]. Метод жидкостной хроматографии сопряженной с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС) позволяет анализировать как полярные, так и неполярные соединения разных химических классов с использованием различных хроматографических колонок [210-212]. Метод масс-спектрометрии с прямым вводом (DIMS) позволяет анализировать только высоко представленные метаболиты, диапазон детекции которых ограничен характеристиками используемого детектора, но он более быстрый и воспроизводимый, чем методы с предварительным разделением [213,214].

Таким образом, разнообразие фенотипов и отсутствие установленных регламентированных процедур и стандартов для метаболомных тестов могут быть главной причиной медленного внедрения их результатов в медицину. Инициативы метаболомного сообщества указывают на то, что необходимы стандартные операционные процедуры (СОП) для стандартизации методов и технических средств контроля с целью повышения воспроизводимости результатов и повышения надежности разрабатываемых методов диагностики. Поэтому на данном этапе выполнения работ был разработан СОП проведения панорамного молекулярного

профилирования метаболомного состава биологического образца с использованием масс-спектрометрического анализа (представлен отдельным документом, файл «Пункт_ПГ-2.13-СОП_Метаболомика»). По результатам работы была опубликована статья Trifonova O.P., Balashova E.E., Lokhov P.G. Current state and future perspectives on personalized metabolomics. Metabolites, 2023, 13(1), 67. https://doi.org/10.3390/metabo13010067

13.1.1. Область применения и рекомендации по СОП

Для определения области применения СОП, а также формирования по ним рекомендаций, был проведен анализ литературных данных. Наиболее наглядные результаты были получены по литературным данным по исследованию старения. При старении происходят преобразования в организме, которые приводят к широкому спектру системных функциональных и органических изменений. При этом метаболомика занимает особое место в исследовании старения, поскольку метаболом, являясь конечной точкой всех биологических событий, протекающих в организме, способен обеспечить исчерпывающей информацией для понимания молекулярных механизмов старения. Таким образом, в рамках реализации данного проекта, был выполнен обзор существующих на данный момент исследований ассоциированных со старением изменений метаболомного состава, для измерения которого разработан СОП, у разных видов модельных организмов и человека.

При рассмотрении результатов исследований метаболома при изучении старения и попытке сделать выводы о применимости СОП, необходимо учитывать специфику таких исследований. Измерение больших наборов метаболитов с использованием различных модельных организмов, разных протоколов подготовки образцов и измерительного оборудования приводит к тому, что в метаболомных исследованиях измеряются разные наборы метаболитов. Это затрудняет обобщение результатов различных исследований и получение обобщенных выводов. Решением данной проблемы является выполнение проекции метаболитов, выявленных в различных исследованиях, на метаболические пути. Наиболее широко применяемый подход для этого – анализ обогащения набора метаболитов, реализованный в алгоритме MSEA (metabolite set enrichment analysis). Если разные метаболиты, обнаруженные в различных независимых исследованиях, принимают участие в

одних и тех же метаболических путях, то это свидетельствует об их участии в идентичных биохимических процессах, что позволяет говорить об идентичности результатов исследований даже при использовании различных протоколов измерения метаболитов.



Рисунок 13.1 — Метаболические пути, выявленные масс-спектрометрическим метаболомным анализом и вовлеченные в процессы старения. Графики построены с помощью анализа обогащения набора метаболитов (MSEA) с использованием программы MetaboAnalyst (www.metaboanalyst.ca). Показаны названия метаболических путей со статистически значимым (p<0,01) обогащением проецируемых метаболитов. Значение вероятности (p) оценивает, представлен ли измеренный набор метаболитов в метаболическом пути больше, чем ожидалось бы это случайным образом

На рисунке 13.1 показано, что метаболиты, связанные со старением и выявленные в ходе различных исследований, в основном относятся к одним и теми же метаболическими путями. Например, биосинтез аминоацил-тРНК статистически значимо (при p < 0,01) связан со старением у нематод (С. elegans), дрозофил, собак и человека. Цитратный цикл также статистически значимо связан со старением у нематод, рыб, мышей и людей. Более детальный анализ метаболических путей, вовлеченных в процесс старения у разных видов организмов, показал, что, прежде всего это метаболические пути, связанные с метаболизмом аминокислот, липидов, пуринов и энергетическим обменом. Нарушение этих путей отражает процессы,

происходящие в любом организме при старении. Это означает, что процессы старения, отражаемые в метаболомном составе, очень похожи друг на друга у разных организмов, от нематод до человека. Это подтверждает целесообразность использования СОП для исследования механизмов процесса старения, как на модельных животных, так и включая людей.

Таким образом, в результате проведенного исследования был выявлен список метаболитов (выявленные метаболиты относились к разным классам веществ – аминокислоты, углеводы, липиды), уровень которых связан с продолжительностью жизни модельных организмов и человека. Основываясь на полученных результатах, а также возможности детектирования указанных метаболитов с применением СОП, было высказано предположение о целесообразности применения СОП в исследованиях процессов старения, как у фруктовых мушек, так и у организмов других видов, включая человека. Данный вывод уточняет область применения СОП, относится к рекомендациям его применения и подтверждает его научную и прикладную значимость. По результатам работы в рамках данного проекта была опубликована статья Balashova E.E., Maslov D.L., Trifonova O.P., Lokhov P.G., Archakov A.I. Metabolome Profiling in Aging Studies. Biology, 2022, 11(11), 1570.

Второе направление применения СОП, исследованное в рамках данного проекта, является персонализированная метаболомика. В метаболомике множество метаболитов измеряют одновременно за один анализ. Такие аналитические возможности открывает перспективы для клинической лабораторной диагностики. В данной работе масс-спектрометрическая метабограмма была разработана на основе созданного СОП как упрощенный и клинически применимый способ измерения метаболома плазмы крови. Для построения метабограммы были использованы образцы плазмы крови здоровых добровольцев мужского пола (n=48) примерно одного возраста, метод масс-спектрометрии с прямой инжекцией (DIMS) низкомолекулярной фракции образцов и анализ главных компонент (РСА) полученных масс-спектров. Определенные семь главных компонент метабограммы, которые охватывают ~70% вариабельности метаболома плазмы крови, были охарактеризованы с использованием анализа обогащения наборов метаболитов клинических лабораторных (MSEA) и результатов тестов участвующих

добровольцев. Установлено, что компоненты метабограммы представляют собой функционально родственные группы метаболома крови, связанные с регуляцией, липидно-углеводным и липидно-аминым компонентами крови, эйкозаноидами, поступлением липидов в организм, функцией печени, что обеспечивает большую клиническую значимость метабограммы. Таким образом, метабограмма, получаемая с применением СОП, дает возможность применять метаболомику в клинике. Дополнительно был проведен сравнительный анализ метабограммы с тонкослойной хроматографией и анализом метаболома крови методом жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией. По результатам работы была опубликована статья Lokhov P.G., Balashova E.E., Trifonova O.P., Maslov D.L., Grigoriev A.I., Ponomarenko E.A., Archakov A.I. Mass Spectrometric Blood Metabogram: Acquisition, Characterization, and Prospects for Application. International Journal of Molecular Sciences, 2023, принята в печать.

13.1.2. Молекулярное профилирование метаболомного состава биологического образца (Коллекция-1-PS) с получением перечня метаболитов

Материалы

На данном этапе выполнения работ проведено молекулярное профилирование метаболомного состава образцов плазмы крови 30 индивидуумов из Коллекции-1-PS, согласно разработанному СОП. Их характеристики приведены в таблице 13.1.

В анализ вошли образцы от 19 мужчин и 11 женщин европеоидной расы. Средний возраст условно-здоровых доноров 57,3±6,3 лет, а индекс массы тела 23,06±16,8, что указывает на нормальный вес индивидуумов.

В качестве биологического образца для панорамного молекулярного профилирования метаболомного состава использовали ЭДТА плазму крови, как наиболее часто используемый материал для диагностики. Образцы ЭДТА плазмы крови собирали утром натощак по стандартному протоколу. Для этого кровь брали из кубитальной вены в пробирку вакутейнер ('VACUETTE'), содержащую антикоагулянт К2ЭДТА, в объеме 5 мл. После забора вакутейнер аккуратно переворачивали 4–6 раз, чтобы перемешать кровь с ЭДТА, но при этом избежать образования пены. Не позднее, чем через 15 минут после забора полученную кровь центрифугировали при комнатной температуре в течение 15 мин при 3000 об/мин

(1600 g). Полученную плазму с помощью автоматического дозатора перенесли в специальную криопробирку для хранения биологического материала. Маркированные образцы хранились при температуре –80°С и не подвергались повторному размораживанию/замораживанию.

№ п/п	Индекс образца	Пол	Возраст,	Рост,	Bec,	Индекс
			лет	СМ	КГ	массы тела
1	CIDp520007710	М	47	1,61	60	23,15
2	CIDp520007711	ж	52	1,73	73	24,39
3	CIDp520007712	М	57	1,69	71	24,86
4	CIDp520007715	М	63	1,76	69	22,28
5	CIDp520007713	М	51	1,81	79	24,11
6	CIDp520007714	ж	56	1,6	70	27,34
7	CIDp520007716	М	57	1,65	68	24,98
8	CIDp520007717	М	57	1,63	65	24,46
9	CIDp520007718	М	66	1,73	70	23,39
10	CIDp520007719	ж	58	1,74	71	23,45
11	CIDp520007720	ж	60	1,82	72	21,74
12	CIDp520007721	М	66	1,74	75	24,77
13	CIDp520007722	М	47	1,7	69	23,88
14	CIDp520007723	ж	63	1,74	68	22,46
15	CIDp520007724	М	56	1,68	64	22,68
16	CIDp520007725	М	45	1,65	63	23,14
17	CIDp520007726	М	59	1,66	63	22,86
18	CIDp520007727	ж	57	1,69	69	24,16
19	CIDp520007728	ж	57	1,77	67	21,39
20	CIDp520007729	М	59	1,71	64	21,89
21	CIDp520007730	М	58	1,63	52	19,57
22	CIDp520007731	ж	60	1,67	58	20,80
23	CIDp520007732	М	74	1,78	63	19,88
24	CIDp520007733	ж	55	1,54	57	24,03
25	CIDp520007734	М	59	1,82	67	20,23
26	CIDp520007735	М	45	1,69	68	23,81
27	CIDp520007736	М	60	1,76	71	22,92
28	CIDp520007737	ж	55	1,82	76	22,94
29	CIDp520007738	ж	59	1,93	82	22,01
30	CIDp520007739	М	61	1,82	80	24,15

Таблица 13.1 — Характеристики образцов из коллекции Коллекция-1-PS, используемых для молекулярного профилирования метаболомного состава

Методы

Пробоподготовка биологического образца

Для молекулярного профилирования метаболомного состава образцов плазмы крови использовали метод, основанный на экстракции низкомолекулярной субстанции из биологического материала с одновременным предварительным осаждением белков с помощью 90% раствора метанола [183,213,215,216]. Для этого

в чистой пластиковой пробирке объемом 1,5 мл (EppendorfTM) смешивали 10 мкл предварительно размороженного при 4°C образца плазмы крови с 10 мкл очищенной воды (LiChrosolv, Merck, США) и 80 мкл метанола (J.T. Baker, США,). Инкубировали при периодическом интенсивном перешивании на шейкере (1000 об./мин) в течение 10 минут при комнатной температуре и после этого центрифугировали при 13000 об./мин (Centrifuge 5408R, "Eppendorf", Германия) при температуре 10°C в течение 15 минут. Полученный супернатант (надосадочная жидкость) переносили в чистую пластиковую пробирку объемом 1,5 мл (EppendorfTM).

Непосредственно перед масс-спектрометрическим анализом 10 мкл полученной низкомолекулярной фракции отбирали в чистую пробирку и добвляли 490 мкл 0,1% раствора муравьиной кислоты (Fluca, США) в метаноле. В полученный раствор низкомолекулярной фракции биологического образца добавляли 1 мкл стокового раствора внутреннего стандарта (до конечной концентрации 10 нг/мл). В качестве внутреннего стандарта использовали синтетическое вещество лозартан (Aldrich, США) с химической формулой C22H23ClN6O с молекулярной массой 422,917 у.а.е.

Масс-спектрометрический анализ

Масс-спектрометрический анализ проводили на гибридном квадрупольвремяпролетном масс-спектрометре с электроспрейным источником ионизации timsTOF (Bruker Daltonik GmbH, Germany) методом прямой инжекции образца. Для этого использовали стеклянный шприц ("Hamilton Bonaduz", Швейцария) объемом 500 мкл, установленный в встроенный шприцевой инжекторный насос массспектрометра. Поток пробы, подаваемой в электроспрейный источник ионизации, составлял 180 мкл/час. Для источника ионизации использовались следующие параметры:

- температура осушающего газа (азот) – 200°С;

- скорость потока осушающего газа – 4 л/мин;

- напряжение на капилляре – 4500 B;

- фокусирующее напряжение: – 500 B;

- давление на распылителе – 0,4 Бар.

Настройки прибора были подобраны так, чтобы детектировать положительно заряженные ионы преимущественно в диапазоне m/z от 50 до 1500. Перед

проведением анализа биологического образца была проведена предварительная калибровка масс-спектрометра с помощью смеси низкомолекулярных веществ ESI-L Low Concentration Tuning Mix (Agilent). Запись детектируемых сигналов проводили в течение 1 минуты. Масс-спектрометрические измерения осуществляли в условиях повторяемости (три последовательных технических повтора).

Обработка результатов измерений

Предварительную обработку масс-спектров проводили в программе DataAnalysis 4.1 (Bruker Daltonik GmbH, Germany) суммированием записанных сигналов. Детекцию пиков в спектрах осуществляли по следующим параметрам: количество точек на пик – 2; отношение сигнал к шуму – 1; отсечение по относительной и абсолютной интенсивности – 0,001% и 100, соответственно. Таким образом, получали список характеристик (m/z, интенсивность и др.) пиков массспектра. Выравнивание значений m/z массовых пиков в различных масс-спектрах было выполнено, как описано ранее [217]. Полученные значения m/z были отправлены в систему поиска метаболитов MassTRIX (http://masstrix3.helmholtzmuenchen.de) со следующими параметрами: режим сканирования - положительная ионизация (с поправкой на возможность формирования ионов с H+, Na+, K+), максимальная ошибка - 0,005 Да, база данных - KEGG (https://www.genome.jp/kegg/), HMDB (https://hmdb.ca/) и LIPID MAPS (https://www.lipidmaps.org/) с изотопами, организм - Homo sapiens. Полученный список названий метаболитов для каждого представленного значения m/z был дополнительно обработан с помощью алгоритма аннотирования соединений.

Аннотация детектируемых метаболитов

Аннотацию детектируемых метаболитов проводили с помощью ранее разработанного алгоритма, который выявляет истинные аннотации (там, где это возможно) из возможного списка названий метаболитов. Возможный список аннотаций определяли по соответствию измеренной масс-спектрометрически молекулярной массе вещества и молекулярным массам веществ из базы метаболитов. Для определения истинной аннотации использовали биологический контекст – поддержка соответствия конкретного соединения масс-спектрометрически измеренной массе данными о путях метаболизма данного соединения (рисунок 13.2) [213].

Алгоритм аннотации соединений реализовали посредством применения следующих шагов:

•Были рассчитаны коэффициенты корреляции Пирсона между интенсивностями выровненных масс-спектрометрических пиков с использованием функции для расчета корреляций в MATLAB (MathWorks, Natick, MA, USA). В результате была построена корреляционная матрица (столбцы соответствовали значениям m/z пиков, для которых вычислялась корреляция, строки соответствовали значениям m/z других пиков, взятых для расчета парной корреляции, в ячейках матрицы представлены коэффициенты корреляции (r)). Для нахождения корреляций использовали масс-спектры всех образцов, участвовавших в исследовании.

•Каждый масс-спектрометрический пик был протестирован на поддержку контекстными данными (рисунок 13.2). Используя корреляционную матрицу, 30 (установлено эмпирически как оптимальное число) масс-пиков с наиболее сильной корреляцией (положительной или отрицательной, с r < 0,85) были связаны с идентификаторами KEGG, предложенными программой MassTRIX, которые считались контекстной поддержкой для тестируемого пика. Наиболее сильно коррелирующие пики из контекстной поддержки с r > 0,85 рассматривались как производные одного соединения (фрагмент, аддукт или мультийон соединения).

•Чтобы выявить истинное название соединения, было рассчитано расстояние между каждым возможным названием соединения и соединениями в его контекстной поддержке. Для ЭТОГО с набора помощью инструментов MetaboNetworks была создана матрица расстояний между соединениями в метаболических путях человека. Расстояние, равное N, означало, что расстояние от устанавливаемой аннотации до выбранной аннотации из контекстной поддержки лежит через N-1 промежуточных соединений (т.е. кратчайший путь через N биохимических реакций). Полученные значения для позиций N = 1, 2, 3 и 4 были сравнены с данными, получаемыми случайным совпадением. Для этого, контекстная поддержка была сгенерирована случайным образом 300 раз, и полученные данные для позиций N = 1, 2, 3 и 4 были использованы для вычисления р-значения для кандидата с использованием кумулятивной функции для распределения экстремальных значений (функция 1-cdf с опцией gev в MATLAB).

•Вероятность p > 0,95 для любой позиции N 1-4 статистически подтверждает,

что тестируемая аннотация поддерживается биологическим контекстом, т.е. проверяемая аннотация для соединения является истинной.

• Получение истинной аннотации повторяли шесть раз, включая каждый раз результаты аннотаций соединений в контекстную поддержку. Таким образом, с каждым разом контекстная поддержка становился все более компетентной. Наконец, аннотации с Z-оценкой <-1,64 (соответствуют вероятности р > 0,95) считались выходными данными алгоритма аннотации.

Ксенобиотики считались ложными аннотациями и исключались из результатов аннотации. Схема аннотации соединений, использованная в работе, представлена на рисунке 13.3.



Рисунок 13.2 – Концепция аннотации соединений по масс-спектрометрическим использованием данным С биологического контекста. Измеренная масса, соответствующая масс-спектрометрическому пику (обозначен знаком «?»), интенсивность которого отражает концентрацию соединения в образце, связана с набором возможных названий соединений (обозначенных как соединения 1-4), молекулярные массы которых соответствуют этому пику. Суть алгоритма аннотации заключается в том, что концентрации соединений в живых организмах взаимосвязаны через метаболические пути. Следовательно, правильное название соединения (обозначенное как соединение 2) должно поддерживаться списком возможных аннотаций соединений (обозначенных как соединения 11–14), которые соответствуют измеренным массам коррелирующих пиков, поскольку среди этих названий есть названия соединений, близко расположенных в метаболическом пути (помечено как соединение 13). Если используются многочисленные коррелирующие пики, то связанные с ними соединения в метаболических путях обеспечивают статистическую поддержку (помечена как «контекстная поддержка») для правильного аннотирования соединения (соединения 2)



Рисунок 13.3 – Схема аннотации соединений, использованная в исследовании. Измеренное масс-спектрометрически значение т/г для аннотируемого соединения (•) передается в поисковую систему метаболитов (1), и извлекается список возможных названий соединений для данного m/z (2). Из набора масс-спектров вычисляется корреляция между интенсивностью масс-спектрометрического пика аннотируемого соединения и другими масс-спектрометрическими пиками (3), и т/г значениния наиболее сильно коррелирующих пиков также запрашивают по поисковой системе (4) для получения для них списка кандидатов (возможных аннотаций) (5). Каждый кандидат в списке для аннотируемого соединения последовательно применяется к матрице расстояний (6) с кандидатами из списка, относящегося к коррелирующим массам, чтобы измерить расстояние между ними. Матрица расстояний включает расстояния между соединениями в биохимических путях и рассчитана с использованием баз данных KEGG соединения, KEGG реакции и *KEGG* ферменты (7). Полученные расстояния используют для поиска истинного названия аннотируемого соединения, которое "окружено" кандидатами с коррелирующими пиками (8), что подтверждает значение р из статистической модели, основанной на измеренных расстояниях

Результаты

В результате молекулярного профилирования метаболомного состава 30 биологических образцов (плазма крови) был получен список из 9335 массспектрометрических пиков (m/z), которые детектировались во всех образцах. Массовые пики соединений были отправлены в поисковую систему MASSTrix для аннотирования соединений, соответствующих пикам по массе, и было извлечено 26 430 записей названий соединений с соответствующим значением m/z. Из 26 430 записей составных имен, связанных со значениями m/z, алгоритм аннотации выбрал 2015 кандидатов в качестве предположительно истинной аннотации. Среди аннотаций были представлены названия 41 ксенобиотика. Из-за настроек алгоритма аннотаций они были сочтены ненадежными аннотациями и исключены из результатов. В результате применение алгоритма позволило аннотировать 1989 соотвественно, 386 метаболитов. Для некоторых метаболитов пиков И. детектировали несколько пиков в масс-спектрах с учетов образования ионов с H+, Na+, K+. Среди аннотированных соединений присутствовали почти все хорошо известные и клинически значимые метаболиты: аминокислоты, гормоны, жирные кислоты, нуклеотиды, углеводы, холестерин и его производные и т.д. Список аннотированных значений m/z и соответсвующих им метаболитов представлен в таблице, доступной по ссылке https://www.ibmc.msk.ru/articles/075-15-2021-933. По данной ссылке доступны результаты молекулярного профилирования биологических образцов из Коллекция-1-PS – перчень метаболитов, полученный согласно п.2.13 ПГ. Для ряда метаболитов, таких как глюкоза, креатин, глутамин, карнитин, триптофан и другие аминокислоты, была проведена валидация результатов идентификации с помощью спектров фрагментации соответствующих пиков в масс-спектре (рисунок 13.4).



Рисунок 13.4 – Подтверждение результатов идентификации креатина (1), L-карнитина (2), L-глутамина (3), L-триптофана (4) и D-галактозы/глюкозы (5) с помощью спектров фрагментации

13.2. Молекулярное профилирование метаболомного состава плазмы крови пациентов с разной стадией почечно-клеточного рака

В рамках задельных работ по проекту на следующий этап и выполнения работ по молекулярному профилированию биологичеких образцов, полученных от пациентов с подтвержденными заболеваниями (Коллекция К 2) выполнено молекулярное профилирование метаболомного состава плазмы крови пациентов с стадией почечно-клеточного разной рака. Наряду с сердечно-сосудистыми заболеваниями рак является наиболее распространенной причиной смерти во всем мире [218]. Почечно-клеточный рак (ПКР), также известный как почечная аденокарцинома или гипернефрома, является одним из наиболее распространенных видов рака и диагностируется более чем у 80% случаев рака почек у взрослых. Три основных гистологических подтипа ПКР включают светлоноклеточный ПКР (скПКР), папиллярный ПКР (пПКР) и хромофобный ПКР (хрПКР), которые наблюдаются в 75-85%, 10-15% и 5-10% случаев соответственно [219-221]. Эффективность лечения заболевания зависит от того, насколько рано оно было диагностировано. Однако, отсутствие явных клинических симптомов и неэффективные стратегии скрининга, особенно на ранних стадиях заболевания, приводят к незаметному прогрессированию опухоли и значительному снижению выживаемости пациентов [222,223]. Широкое применение современных эффективных методов диагностики (тонкоигольная биопсия, компьютерная томография (КТ), магнитно-резонансная томография (МРТ) и т.д.) ограничено высокой стоимостью специализированного оборудования и высокими требованиями к квалификации персонала [224]. Поэтому разработка новых эффективных, но в то же время относительно простых и более дешевых методов лабораторной диагностики рака почки на основе биомаркеров очень важна. В рамках проекта было проведено молекулярное профилирование метаболомного состава плазмы крови пациентов с разной стадией ПКР согласно разработанному СОП для выявления потенциальных низкомолекулярных биомаркеров для диагностики на ранней стадии.

В работе провели сравнительный анализ метаболомного состава образцов плазмы крови, взятых у 51 контрольного добровольца и 78 пациентов с различными подтипами и стадиями ПКР (ранние стадии скПКР, пПКР, хрПКР и поздние стадии скПКР). Полученные данные масс-спектрометрического анализа были обработаны

методами многомерного и одномерного статистического анализа, направленного на выявление масс-спектрометрических пиков с наиболее значимым вкладом в различия между анализируемыми группами. Многомерный статистический анализ выполняли методом OPLS-DA (Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis), который продемонстрировал различия между контрольной группой и больными. Для выбора наиболее различающихся пиков был применен VIP (важность переменной в проекции) анализ, и пики со значением VIP >1,0 рассматривались как со значимым вкладом. Статистическую значимость разницы в интенсивности пиков между анализируемыми группами оценивали по р-значению (р ниже 0,05 считался статистически значимым). Совместное применение двух статистических методов обеспечило обнаружение наиболее важных дискриминационных m/z пиков. Для дальнейшего анализа были выбраны пики, характеризующиеся VIP >1,0 и p- <0,05 (рисунок 13.5).



Рисунок 13.5 — Диаграмма Венна с количеством наиболее дискриминационных m/z пиков, выявленных двумя статистическими подходами (важность переменной в проекции (VIP) и критерий Уилкоксона. с использованием скорректированных рзначений коэффициента ложного обнаружения (FDR))

Среди наиболее различающихся масс-спектрометрических пиков были аннтированы 67 метаболитов. Среди этих метаболитов были выявлены липиды, аминокислоты и углеводы. Большинство аннотированных метаболитов были понижены у больных раком на всех стадиях. Изменение уровня в плазме крови таких метаболитов, как оксопролин, таурин, фенилаланин, тирозин, цитруллин и некоторые фосфолипиды, демонстрировало четкую корреляцию с прогрессированием опухоли. В то же время результаты многомерного статистического анализа не позволили выделить различные подтипы ПКР на ранних стадиях. На следующем этапе основываясь на списке аннотированных метаболитов, были выявлены метаболические пути, потенциально связанные с патогенезом скПКР (рисунок 13.6). Было обнаружено, что выявленные пути преимущественно связаны с метаболизмом аминокислот. Нарушенные метаболические пути, выявленные у пациентов с ранними стадиями скПКР, связаны с метаболизмом глутамата, глутамина, аргинина, пролина, фенилаланина, тирозина, триптофана и линолеата (рисунок ба). Наряду с биологическими путями, которые были нарушены на ранних стадиях, метаболизм таурина, гипотаурина, цистеина, метионина и никотинамида нарушается и на поздних стадиях заболевания (рисунок 13.6 б). При этом одни и те же нарушенные пути были выявлены как для скПКР, так и для п/хрПКР.



Рисунок 13.6 – Метаболические пути, связанные с различными стадиями скПКР (использовалась база данных KEGG): (a) I-II стадии; (б) III-IV стадии. Ось у – отрицательное натуральное логарифмическое значение исходного р-значения, которое указывает на анализ обогащения пути. Ось х показывает значения воздействия, представляющие анализ топологии пути. Выявленные метаболические пути отображаются в виде кругов, цвет которых коррелирует с отрицательными значениями log(p) (темно-красный указывает на высокую значимость, светложелтый - на незначительную), а размер указывает на величину воздействия на пути (увеличение размера связано с ростом значения воздействия). В качестве пороговых значений были приняты отрицательные логарифмические значения (p) ниже 1,5 (p-значения ниже 0,05) и значения воздействия 0,1

Диагностическую эффективность аннотированных метаболитов оценивали путем расчета AUC (Area Under Curve). Были отобраны 14 метаболитов с AUC>0,7, комбинации которых использовали для построения модели с наиболее высокой диагностической эффективностью. Модель, построенная с использованием 10 метаболитов (цитрат, глутамат, аргинин, тирозин, фенилаланин, метионин, триптофан, пипеколиновая кислота, лизофосфатидилхолин (20:5) и фосфатидилхолин (32:2)), продемонстрировала самую высокую эффективность дискриминации между контрольной группой и ранней стадией скПКР. С помощью независимой выборки были получены следующие значения эффективности модели: AUC - 0,80 (95% ДИ: 0,59-0,95); чувствительность - 0,79 (95% ДИ: 0,74-0,84); специфичность - 0,82 (95% ДИ: 0,76-0,88). Однако данная диагностическая модель продемонстрировала низкую эффективность при сравнении ранней и поздней стадий скПКР. Специфичность разработанной модели была оценена с помощью независимой выборки образцов плазмы крови больных раком легкого (ранняя стадия): AUC - 0,60 (95% ДИ: 0,46-0,74), чувствительность – 0,61 (95% ДИ: 0,48-0,73) и специфичность - 0,69 (95% ДИ: 0,49-0,89). Результаты показали, что диагностическая модель имеет низкую эффективность для выявления рака легких. Из-за небольшого количества образцов эффективность модели для диагностики ранних стадий пПКР и хрПКР не была подтверждена.

Таким образом, сравнительный анализ метаболомного состава образцов плазмы крови контрольной и онкологической групп позволил выявить метаболиты, связанные с различными стадиями опухоли. Разработанная модель, основанная на выявленных метаболитах, продемонстрировала высокую диагностическую эффективность и точность. По результатам была опубликована статья Maslov D.L., Trifonova O.P., Lichtenberg S., Balashova E.E., Mamedli Z.Z., Alferov A.A., Stilidi I.S., Lokhov P.G., Kushlinskii N.E., Archakov A.I. Blood Plasma Metabolome Profiling at Different Stages of Renal Cell Carcinoma. Cancers, 2023, 15(1), 140. https://doi.org/10.3390/cancers15010140

13.3. Поиск стратегий повышения воспроизводимости результатов метаболомного анализа методом ГХ-МС

Метаболомное пофилирование выполняется сразу для пула образцов, в вышеизложенных результатах анализировали 30 образцов, что является обычно

нижней границей масштабных исследований. При выполнении анализа техническим ограничением является вместимость приборов при пробоподготовке и невозможность одновременного закола всех образцов при МС-анализе. Данные особенности могут влиять на воспроизводимость результатов, что, в частности, может искажать количественную оценку содержания конкретных малых молекул. Двумерная газовая хроматография (ГХ) в сочетании с масс-спектрометрией зарекомендовала себя как один из надежных методов проведения метаболомного анализа [225]. Благодаря своей надежности подход ГХ-МС (ГХ*ГХ-МС) становится все более широко используемым для идентификации и количественного определения метаболитов.

Таким образом, в рамках перспективы внедерения в практику метаболомных тестов, был проведен анализ по выявлению оптимальных условий хранения и ввода проб в хромато-масс-спектрометрическую систему при исследовании серий биологических образцов методом двумерной газовой хроматографии в сочетании с Была вариабельность масс-спеткрометрией. исследована интенсивности характеристик m/z малых молекул в плазме крови. В качестве существенных факторов, потенциально влияющих на воспроизводимость хромато-масс-спектрометрических экспериментов, были рассмотрены одни из наиболее популярных растворителей для при ΓX-MC (MeOH пиридин); промывки шприцев И условия хранения пробоподготовленных образцов (свежеприготовленные образцы и хранение в течение 24 часов при комнатной температуре или в холодильнике); схема введения (одна инъекция на неповрежденный флакон или три последовательных введения на флакон). Интерес к влиянию целостности флакона на воспроизводимость результатов связан с высокой чувствительностью дериватизированных метаболитов (т.е. в которых активный водород полярных функциональных групп замещен неполярным алкилсилильным радикалом) к влаге [208], которая потенциально может попасть во флакон из воздуха. Общая схема эксперимента приведена на рисунке 13.7.



Рисунок 13.7 — Схема эксперимента по выбору оптимальных условий проведения метаболомного профилирования с помощью ГХ-МС

Материалы и методы.

Образцы плазмы крови от здорового донора были пробоподготовлены в максимально унифицированных условиях, включая одни и те же флаконы реактивов, пробирки, приборы. Процедура пробоподготовки проводилась согласно протоколу, описанному в работе [226]. Реагенты для силирования (MSTFA), гидрохлорид метоксиамина, пиридин, а также смесь метиловых эфиров жирных кислот (FAME), используемая для расчета индексов удерживания, были произведены Sigma-Aldrich. (США). Метанол (чистота для ВЭЖХ-МС) был приобретен у J.T. Baker (США).

Масс-спектрометрический анализ выполнялся с использованием двумерной газовой хроматографии на хроматографической системе 7890В (Agilent Technologies, США), сопряженной с времяпролетным масс-спектрометром Pegasus BT 4D (LECO, США), настроенным в соответствии с рекомендацией производителя.

Полученные файлы масс-спектров были обработаны в программе ChromaTOF (v. 5.51, LECO, CША) для деконволюции, выделения пиков, выравнивания и поиска в первичной базе данных. Отбирали только те данные, для которых отношение сигнал/шум превышало 10. Идентификацию проводили с использованием компонентов базы данных масс-спектров и индексов удерживания NIST (mainlib, replib) и библиотеки Leco-Fiehn rtx5 [227]. Только те совпадения считались надежными, для которых их прямое и обратное сходство превышало 700. Статистический анализ (коэффициент вариации) и графики выполнялись с использованием программной среды R (версия 4.0).

Результаты

На основании полученных >200 надежно идентифицированных малых молекул были отобраны 31 производные ТМС для 29 основных метаболитов плазмы крови, которые отвечают строгим требованиям надежности (ручной анализ кандидатов и контроль индексов удерживания). Согласно системе ClassyFire, финальный список контролируемых метаболитов включал 13 аминокислот, семь углеводов, две альфааминокислоты и один представитель дикарбоновых кислот, бета-гидроксикислот (а средней длиной также бета-гидроксикислот co цепи), жирные кислоты, индолилкарбоновую кислоту, спирты и мочевину. Аминокислота триптофан была представлена двумя стабильными силильными производными (2TMS и 3TMS). Имелись также два сигнала для галактозы, которые, на основании литературных данных, вероятно, относятся к двум стереоизомерам [226]. Для этих вышеуказанных метаболитов было сравнение проведено площади под кривыми (AUC) хроматографических пиков (рисунок 13.8а) и их воспроизводимость в технических повторах (рисунок 13.8б) для оценки влияния условий хранения и введения на полученные результаты.

На основе анализа флуктуации хромато-масс-спектрометрических пиков различных малых молекул, рутинно анализируемых в метаболомных исследованиях, возникающей при длительном хранении образца, с учетом особенностей введения образца в аналитическую систему, было выявлено, что общая картина анализа проб будет менее изменчивой, если закол в хроматографическую систему будет через отложенное время после пробоподготовки и при использовании пиридина в качестве промывочного растворителя. Хранение в этом случае может быть неблагоприятным для качественного анализа некоторых метаболитов, например, HMDB0000123 (глицин) HMDB0000929 (L-триптофан), И площадь которых под хроматографическими кривыми уменьшилась на 20-25%. В то же время следует отметить, что использование пиридина в качестве промывающей жидкости при хранении на холоде также может привести к примерно 5% -му снижению AUC.



Рисунок 13.8 — Сопоставление разных комбинаций проведения ГХ-МС анализа: (a) нормированные площади под кривыми (AUC) хроматографических пиков исследуемых метаболитов в формате индексов HMDB; (б) коэффициенты вариаций, рассчитанные для сигналов метаболитов, где приставкой «Fresh» обозначены свежеприготовленные образцы, приставками «StorageA» и «StorageF» — через сутки хранения при комнатной температуре и в холодильнике (+4C), соответственно. Три последовательных инъекции из одного флакона обозначены постфиксом «3x1», а отдельный технический повтор, полученный из интактного флакона — «1x3». Синим цветом обозначены образцы, при введении которых шприц промывали метанолом, а зеленым — пиридином.

Также стоит отметить, что трехкратный ввод из одного флакона не увеличивает CV между техническими повторами при использовании в качестве растворителя пиридина, что позволяет упростить процедуру пробоподготовки без негативных последствий для результатов. Использование метанола в качестве растворителя для промывки шприцев дает более рассеянные результаты, чем пиридин. При выборе метанола технические повторы следует проводить с отбором проб из отдельных неповрежденных флаконов. Таким образом, на примере коровых метаболитов плазмы крови, представляющих различные классы химических веществ, были сформированы общие рекомендации по постановке экспериментов метаболомному по профилированию при необходимости анализа различного количества проб, где, безусловно, возникают вопросы их оптимального хранения пробоподготовленных биообразцов и их отложенный запуск анализа. По результатам была опубликована статья Kurbatov I., Kiseleva O., Arzumanian V., Dolgalev G., Poverennaya E. Some Lessons

Learned on the Impact of the Storage Conditions, Syringe Wash Solvent, and the Way of GC-MS Injection on the Reproducibility of Metabolomic Studies. Metabolites 2023, 13(1), 75; https://doi.org/10.3390/metabo13010075

Таким образом, в результате выполнения второго этапа проекта согласно п. 2.13 ПГ и п.5.27 ТЗ был разработан СОП проведения панорамного молекулярного профилирования метаболомного состава биологического образца с использованием масс-спектрометрического анализа (представлен отдельным документом в составе пакета отчетной документации, название документа «Пункт_ПГ-2.13-СОП_Метаболомика»). Разработанный СОП соответствует п.6.1.21 и п.7.1.8 ТЗ. Также в рамках работ проведено молекулярное профилирование метаболомного состава 30 биологических образцов (коллекция-K1-PS) и получен перечень из 386 детектируемых метаболитов, доступный по ссылке https://www.ibmc.msk.ru/articles/075-15-2021-933.

Был проведен анализ литературы о существующих проблемах внедрения метаболомных исследований и возможных путях их решения. По результатам была опубликована статья Trifonova O.P., Balashova E.E., Lokhov P.G. Current state and future perspectives on personalized metabolomics. Metabolites, 2023, 13(1), 67. https://doi.org/10.3390/metabo13010067

Был проведен анализ литературы и определена область применения разработанного СОП с рекомендациями по применению, включая персонализированную метаболомику. По результатам были опубликованы статьи Balashova E.E., Maslov D.L., Trifonova O.P., Lokhov P.G., Archakov A.I. Metabolome Profiling in Aging Studies. Biology, 2022, 11(11), 1570. https://doi.org/10.3390/biology11111570 и Lokhov P.G., Balashova E.E., Trifonova O.P., Maslov D.L., Grigoriev A.I., Ponomarenko E.A., Archakov A.I. Mass Spectrometric Blood Metabogram: Acquisition, Characterization, and Prospects for Application. International Journal of Molecular Sciences, 2023.

Была проведена аппробация разработанного СОП для исследования почечноклеточного рака. По результатам была опубликована статья Maslov D.L., Trifonova O.P., Lichtenberg S., Balashova E.E., Mamedli Z.Z., Alferov A.A., Stilidi I.S., Lokhov P.G., Kushlinskii N.E., Archakov A.I. Blood Plasma Metabolome Profiling at Different Stages of Renal Cell Carcinoma. Cancers, 2023, 15(1), 140. https://doi.org/10.3390/cancers15010140

На примере основных метаболитов плазмы крови, представляющих различные

классы химических веществ, были сформированы общие рекомендации по постановке экспериментов по метаболомному профилированию при необходимости анализа различного количества проб. По результатам была опубликована статья Kurbatov I., Kiseleva O., Arzumanian V., Dolgalev G., Poverennaya E. Some Lessons Learned on the Impact of the Storage Conditions, Syringe Wash Solvent, and the Way of GC-MS Injection on the Reproducibility of Metabolomic Studies. Metabolites 2023, 13(1), 75; https://doi.org/10.3390/metabo13010075

Работы по пункту 2.13 плана-графика выполнены в полном объеме и соответствуют пунктам 5.27, 6.1.21 и 7.1.8 технического задания.

14. ВЕРИФИКАЦИИ АНАЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ АСМ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК НАНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ ДО ВКЛЮЧЕНИЯ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ КЛАССИЧЕСКИХ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ И С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДЕТЕКТОРА АСМ

Активное развитие нанотехнологий в последние десятилетия, ориентированное на широкое и всестороннее изучение свойств наноразмерных объектов разной природы, а также возможность их применения в медицине, привело к формированию новых направ-лений – наномедицины и нанобиологии. Благодаря своим свойствам наночастицы находят применение как в фармакологической отрасли, так и в медицине для диагностических и терапевтических целей. Интеграция наноматериалов в привела к разработке специальных биомедицину диагностических средств (контрастных реагентов, аналитических инструментов) и наноразмерных средств доставки лекарств. Отдельным направлением наномедицины является разработка наноразмерных фармацевтических препаратов. Нано-частицы, используемые для доставки лекарств, обычно состоят из наносфер, нанокапсул и наноразмерных эмульсий [228]. Наноразмерные частицы позволяют осуществить адресную доставку лекарств и улучшить терапевтический индекс препарата.

В рамках работ проекта необходимо исследовать характеристики наночастиц для доставки лекарств с применением нанотехнологического подхода – метода сканирующей зондовой микроскопии, а именно атомно-силовой микроскопии (ACM). ACM уже показал эффективность в исследовании характеристик таких частиц для подтверждения их формы (наночастицы различной формы могут влиять на транспортные пути, деградацию и нацеливание), размера, шероховатости поверхности, поверхностного заряда и наномеханических/адгезионных свойств [229].

В предыдущем этапе проведения работ проекта (в рамках мероприятия 1.14) была разработана Методика визуализации наноразмерных частиц, позволяющая охарактеризовать объекты по их размерам и жесткости. Было показано, что ACM данные по высотам визуализированных объектов сопоставимы с экспериментальными результатами, полученными методом фотонной корреляционной спектроскопии и электронной микроскопии, а также литературными источниками [230], что позволяет

судить об эффективности Методики. Разработанная методика была использована в рамках настоящего этапа (работы по п.5.27 ТЗ) для проведения верификации аналитической системы на основе ACM.

Цель работы на отчетном этапе – определение характеристик наноразмерных частиц для доставки лекарств до включения активных компонентов, полученных с помощью классических аналитических методов и с помощью молекулярного детектора ACM.

Задачи:

1. Наработка наноразмерных частиц для доставки лекарств до включения активных компонентов.

2. Характеризация наработанных частиц классическими методами.

3. АСМ-визуализация наработанных частиц и сравнительный анализ полученных данных.

нанотехнологического подхода в исследованиях Применение физикохимических характеристик частиц является новаторским в области разработки лекарств. Необходимость применения АСМ – метода, позволяющего визуализировать и определять морфологические свойств отдельных биообъектов, обусловлена следующими факторами. Во-первых, внедрение нанотехнологий в разработку лекарств требует введения соответствующих аналитических методов для контроля качества новых препаратов. Из-за крайне малых размеров (обычно меньше 100 нм), необходима разработка методов определения характеристик самих наночастиц в дополнение к обычным характеристикам, традиционно используемых для описания свойств лекарственных препаратов. Размер и форма наномедицинских препаратов являются важными факторами, которые влияют на их поведение в организме. Контроль размера наночастиц лекарственных препаратов имеет важное значение, поскольку фармакокинетика наночастиц *in vivo* напрямую зависит от их размеров [231].

Как правило, на сегодняшний день, для характеристики нанопрепаратов применяют методы, регистрирующие сигнал от ансамбля молекул, например метод лазерной корреляционной спектроскопии (DLS). В DLS средний гидродинамический диаметр наночастиц в водном растворе измеряется на основе интенсивности рассеянного света от частиц, которые считаются сферическими. Основными

преимуществами DLS являются его экспериментальная простота и применимость к наночастицам, взвешенным в водном растворе. Однако, возможно переоценивание средних диаметров в распределении частиц по размерам, поскольку интенсивность рассеянного света от сферической частицы пропорциональна шестой степени ее диаметра, в связи с чем интенсивность от более мелких частиц теряется в фоновом сигнале [232].

В работе [232] авторы сравнили данные, полученные с помощью DLS, и данные АСМ. Рассматривалось распределение размеров стандартов – наночастиц полистирола двух размеров 20 и 100 нм. Реперным (номинальным) значением являлась величина, установленная с помощью электронной микроскопии (ТЕМ). Показано, что в случае исследования растворов, содержащие один тип частиц, средние значения, полученные с помощью DLS и AFM совпадают в пределах погрешности с номинальными. Однако, исследовании растворов, содержащие при два типа частиц, бимодальные распределения успешно характеризовались с помощью ACM, но результаты DLS были смещены в сторону более крупных частиц. Авторы утверждают, что определение характеристик наночастиц с помощью АСМ с использованием программного обеспечения для автоматизированного анализа обеспечивает точный и быстрый анализ характеристик наночастиц и имеет преимущества по сравнению с DLS для не монодисперсных растворов. Полученные авторами [232] результаты демонстрируют необходимость подбора методов тщательного анализа при исследовании наноразмерных фармпрепаратов.

Вторым фактором, определяющим перспективность внедрения ACM в разработку нанолекарств, является возможность проведения измерений в нативных условиях. Этот фактор определяет возможность исследования особенностей изменения микро- и наноструктуры поверхности лекарственных форм в процессе выделения биоактивного компонента, а также визуализировать поверхность биообъекта, например поверхности клетки, при взаимодействии с лекарственным препаратом. Преимущества использования метода ACM в наномедицинских исследованиях подробно рассмотрены в обзоре [233]. Авторы раскрывают особенности использования метода при разработке, характеристике и доставке наноразмерных носителей лекарств, таких как наночастицы, липосомы и полимерные частицы. В том числе, указано, что использование ACM позволяет наблюдать за

нанообъектами без необходимости громоздкой и потенциально загрязняющей пробоподготовки, исследования контролируемой без возможны В среде необходимости окрашивания или сушки [234]. Кроме того, АСМ в прерывистом контактном режиме позволяет исследовать мягкие образцы с минимальным воздействием и последующим изменением образца. Режим АСМ – визуализация фазы регистрируемого сигнала, позволяет получить доступ к информации за пределами топографии образца, а эксперименты по силовой спектроскопии могут быть использованы в исследованиях внутренней структуры нанообъектов за счет регистрации упругого или адгезионного взаимодействия частиц с зондом АСМ. Также АСМ позволяет получить доступ к информации, которую вряд ли можно получить с помощью других экспериментальных методов, например, провести визуализацию агрегатов наночастиц. В исследовании [235] авторы использовали АСМ для анализа морфологии, размера и топологии поверхности наночастиц хитозана диаметром 45 нм. Размеры, полученные с помощью АСМ, были немного меньше, чем в исследованиях DLS, однако это объясняется обезвоживанием образцов в процессе высушивания, о чем сообщается в литературных источниках. В связи с чем визуализация наночастиц в жидкости остается важной задачей для изучения свойств объектов в условиях, приближенных к нативным.

В обзоре Gardiner et al. [236] было упоминается, что < 10% исследований, характеризующих внеклеточные везикулы, которые также являются перспективным инструментом доставки иммунотерапевтических лекарств, были проведены с использованием методов ACM [237]. Отчасти это связано с трудностями, возникающими в процессе иммобилизации подобных частиц для проведения ACMхарактеристик, что подтверждает необходимость продолжение проведения работ для разработки новых протоколов и стратегий.

Разработка и стандартизация аналитического метода на основе ACM для определения морфологии и размера наномедицинских препаратов представляет интерес как с научной, так и с нормативной точки зрения. Для внедрения ACM в систему разработки нанолекарств необходимо решить ряд научных и методических проблем. На сегодняшний день для измерения размеров наночастиц используется несколько методов, однако, интерпретация результатов является сложной задачей изза различных основополагающих метрологических концепций [238]. В том числе, для

использования ACM в качестве метода характеристики наномедицинских препаратов в системе контроля качества, необходимо доказать надежность аналитического метода, для этого условия измерений размера и изображений НФ с использованием ACM, включая проверку воспроизводимости, зависящей от прибора и верификацию другими методами.

Одной из таких проблем является форма частиц, которая является важным фактором как с биомедицинской, так и со статистической (соспоставление методик) точки зрения. Сферическая форма наночастиц подтверждена исследователями, которые использовали в своих работах технологию TappingMode® – полуконтактный режим. Например, в работе [239] авторы показали, что наночастицы хитозана, содержащие 2-оксотиазолидин-4-карбоновую кислоту, являются сферическими, обладают однородной формой и ограниченной агрегацией, что согласуется с SEM исследованиями.

Еще одним важным аспектом для изучения наноразмерных частиц является характеристика шероховатости, что также необходимо учитывать для их использования в области доставки лекарств. Шероховатость поверхности может быть измерена с использованием целого ряда методов, однако, для наночастиц наиболее точным является АСМ. Для вычисления отклонений высоты используются линейные сечения, проведенные по АСМ-изображениям. Имеются многочисленные доступные параметры шероховатости (например, Ra, Rq, Rz, Rmax), но наиболее широко используемым является арифметические среднее значение шероховатости – Ra [240]. Например, были представлены данные о топографии и шероховатости поверхности, полученные с АСМ-изображений наночастиц серебра для нацеливания на клетки рака легких линии А549 [241].

В рамках настоящей работы проведены экспериментальные работы по приготовлению наноразмерных чстиц, получены характеристики традиционными методами, методом ACM и методом ЭМ, используемого в качестве верификационного метода. Электронная микроскопия достаточно часто используется для визуализации морфологии нанообъектов [242], однако применение этого метода невозможно в условиях, близких к нативным.

В то время как фотонная и электронная микроскопия обладают возможностью получения 3D изображений образца, ACM уникален тем, что с его помощью возможно

определения наномеханических свойств искомого объекта. Отображение жесткости и адгезии поверхности обозначается как количественное наномеханическое картирование (QNM). Метод широко применяется в исследованиях биологических образцов, например, режим PeakForce QNM использовался Gebril et al. для характеристики состава липидов разработанного нанопрепарата [243]. Полученные данные показали, что конъюгаты гонадотропин-высвобождающего гормона оказали значительное влияние на упругость липидной мембраны, но не ее на форму. Также были показаны различия механических свойств при различной концентрации липидов в препарате. Данные результаты невозможно получить другими методами, особенно для биологических объектов, находящихся в нанометровом диапазоне и обладающих схожей морфологией (например, сферической формой и размером).

Ранее исследователями уже проводилось изучение размеров наночастиц для доставки лекарств до и после загрузки препаратом. Авторы работы [244] использовали ACM для характеристики размеров твердых липидных наночастиц до и после загрузки противоопухолевым средством. Полученные ACM размеры отличались от измерений методом лазерной дифракции в меньшую сторону, что объясняется высушиванием образца и небольшим эффектом уплощения, вызванным зондом микроскопа. Однако в данной работе исследователи не использовали параметр жесткости, в связи с чем исследования, проводимые в рамках мероприятия п.2.14 ПГ работ проекта, являются новаторскими в области изучения свойств наночастиц для доставки лекарств на основе фосфатидилхолина.

14.1. Определение характеристик наноразмерных частиц для доставки лекарств до включения активных компонентов, полученных с помощью классических аналитических методов

Актуальность работы определяется возможностью использования свойств фосфолипидных наночастиц в качестве систем доставки биологически активных веществ. Системы доставки лекарств позволяют улучшить транспорт в организме, повысить биодоступность и эффективность терапевтического действия, уменьшить неблагоприятные побочные эффекты. Для этой цели часто используются фосфолипидные наночастицы. По своей природе они биосовместимы, обеспечивают улучшенную биодоступность для плохо растворимых лекарств и могут позволить благодаря замедленному высвобождению лекарства. снизить уровень дозы

Уникальные свойства фосфолипидных наночастиц, в том числе их биосовместимость, биоразлагаемость, амфифильность, низкий токсический эффект, способность к нагрузке биологически и фармакологически активными соединениями, нашли применение в медицине, особенно для доставки биологически активных веществ [228– 232].

Фосфолипиды являются естественными компонентами биомембран всех живых клеток, а также липопротеидов крови. Фосфолипиды сои, как компоненты разрабатываемой наносистемы, отличаясь от фосфолипидов животных клеток жирнокислотным составом, тем не менее, способны интегрироваться в клеточные мембраны и эффективно способствовать восстановлению структуры и функции поврежденных клеточных мембран животных и человека. В связи с этим особый представляют соевые фосфолипиды интерес с высоким содержанием фосфатидилхолина (ФХ от 75 до 98%). Как источник фосфатидилхолина они могут участвовать во многих процессах жизнедеятельности организма, таких как построение и восстановление клеточной стенки и мембраны, гемостаз. Согласно современным представлениям, наноразмерная форма такой транспортной системы позволяет преодолевать биологические барьеры и доставлять встроенное в нее вещество в клетку [232-236]. Эффективность фосфолипидных наночастиц, особенно обеспечиваемая их размером 10-30 нм [232-236], как системы доставки лекарств способствует улучшению фармакокинетики препарата.

Фосфолипидные наночастицы получали последовательным суспендированием фосфолипидов сои (Lipoid GmbH, Германия) в водном растворе мальтозы, гомогенизацией полученной эмульсии при высоком давлении (800–1500 бар) с последующей лиофилизацией. Подробно технология описана в работе [237]. Полученные наноразмерные частицы для доставки лекарств представляют собой стабильный при хранении, лиофильно высушенный порошок фосфолипидных частиц с диаметром не более 50 нм.

Поскольку фосфатидилхолин является основным компонентом, обеспечивающим биодоступность наноназмерных частиц, необходимо контролировать его количественное содержание по сравнению с содержанием родственных фосфолипидов, основным из которых является фосфатидилэтаноламин. На данном этапе произведена валидация аналитического метода одновременного

количественного определения фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина в растворе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

14.1.1. Разработка и валидация аналитического метода одновременного количественного определения фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина в растворе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Разработанный метод пригоден для количественного определения фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина в исходной смеси фосфолипидов (стандартный образец) Lipoid S80 и образце наноразмерных фосфолипидных частиц в диапазоне от 16 до 800 мкг/см3 и от 0,1 до 5 мг/см3 для фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина соответственно. В Таблице 14.1 представлен диапазон измерений, а также основные метрологические характеристики метода измерений.

Все указанные характеристики метода соответствуют критериям приемлемости, и, таким образом, делают его пригодным для количественного определения фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина в исходной смеси фосфолипидов Lipoid S80 и в образце фосфолипидных наночастиц методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

При проведении измерений применяют средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы, указанные в разделе 14.1.1.1.

ΠΑΡΑΜΕΤΡ	ЗНАЧЕНИЕ					
	hoodorumumorauonaum hoodorumumorum					
Анализируемое	фосфатидилэтаноламин		фосфатидилхолин			
вещество	TT	1 1		1 1		
Матрица	Наноразмерные фосфолипидные			Наноразмерные фосфолипидные		
	частицы и смесь фосфолипидов		час	частицы и смесь фосфолипидов		
	Lipoid S80			Lipoid S80		
Анализируемые	Растворы с концентрацией 1,6			Растворы с концентрацией 1,6		
образцы	мг/см3 для смеси фосфолипидов			мг/см3 для смеси фосфолипидов		
	Lipoid S80 и 8 мг/см3 для			Lipoid S80 и 8 мг/см3 для		
	Наноразмерных фосфолипидных			Наноразмерных фосфолипидных		
	частиц			частиц		
Аналитический метод	ВЭЖХ			ВЭЖХ		
Диапазон	16-800 мкг/см3			0.1-5 мг/см3		
калибровочной						
кривой						
	Matou prouvero produka			Метол гралуировонного графика		
кошентрании	метод градуировочного графика			тод традупровочного трафика		
2	Π			Пинейноя		
зависимость площади	Линеиная			линеиная		
пика от концентрации						
Весовой коэффициент	нет		нет			
	Ce			елективность		
Аналит	Методика селективная			Методика селективная		
	Кросс-перенос					
Аналит	отсутствует			отсутствует		
	Прецизион			ность и правильность		
Внутри серии	В пределах допустимого			В пределах допустимого		
Межлу сериями	В пределах допустимого			В пределах допустимого		
				табильность		
Pactbon Lipoid S80 B 31	юенте с Стабилен 92 часа при		Стабилен 92 часа при			
концентрацией 1.8 м	п/см3 комнатной темпе		ne.	комнатной температуре		
		nomination remicipaly pe		nomination tomicputype		
Наноразмерные фосфот	ипилные	Стабилен 92 часа при		Стабилен 92 часа при		
частины в растворе в э	пюенте с	комнатной температуре		комнатной температуре		
концентрацией 8.4 -9	мг/см3					
Раствор Lipoid S80 в элюенте концентрацией 1,8 мг/см3 Наноразмерные фосфолипиднь частицы в растворе в элюенте концентрацией 8,4 -9 мг/см3		Стабилен 92 часа при комнатной температуре Стабилен 92 часа при комнатной температуре		Стабилен 92 часа при комнатной температуре Стабилен 92 часа при комнатной температуре		

Таблица 14.1 – Метрологические характеристики метода измерений

14.1.2. Требования к средствам измерений, вспомогательному оборудованию, материалам и реактивам

Химические реактивы

Деионизированная вода Milli-Q; пропан-2-ол для хроматографии ос.ч; ТУ 2632-030-78119972-11 (Sharlau, Испания), гексан для хроматографии ТУ 2631-158-44493179-13 (Sigma-Aldrich, США), ацетат аммония (ч.д.а.) ГОСТ 3117-78 (Sigma-Aldrich, США). Требования к стандартым образцам приведены в Таблице 14.2.
	Аналит	Аналит
Тестируемое соединение	Фосфатидилхолин (Стандарт РС)	Фосфатидилэтаноламин (Стандарт РЕ)
Химическое название	1,2-диацил-sn-глицеро-3- фосфохолин	1,2-диацил-sn-глицеро-3- фосфоэтаноламин
Производитель	Lipoid GmbH, Германия	Lipoid GmbH, Германия
Коэффициент пересчета на содержание чистого вещества	0,980	0,988
Условия хранения	-20±5°C	-20±5°C
Дата производства	07.2016	08.2016
Подтверждение состава	14.01.2022	08.10.2021
Срок годности	01.2023	07.2022

Таблица 14.2 – Требования к используемым стандартным образцам

Оборудование

Средства измерений

Жидкостной хроматограф Agilent 1200 серии (США) с диодно-матричным спектрофотометрическим детектором Agilent (США);

Весы лабораторные электронные Satorius CP324S (Германия) с точностью взвешивания 0,1 мг с метрологическими характеристиками ГОСТ 24104.

Автоматические дозаторы Eppendorf переменного объема 1-10 мм3, 20-200 мм3, 100- 1000 мм3 с шагом 0,1 мм3, с точностью ±3% по ГОСТ 10223-82.

Вспомогательное оборудование

Смеситель лабораторный IKA Vortex GENIUS 3 (Германия).

Ультразвуковая баня Elma, Elmasonic P (Германия)

Установка для получения деионизированной воды Synergy, Millipore.

Порядок выполнения измерений

Приготовление подвижной фазы

Сначала готовят 0,01М раствор аммония ацетата. В мерную колбу вместимостью 1000 см3 помещают 0,77 г аммония ацетата, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Подвижная фаза. В стеклянной бутыли вместимостью 1000 см3 смешивают 750

см3 пропанол-2-ол, 100 см3 гексана и 150 см3 раствора ацетата аммония 0,01М. Раствор дегазируют обработкой ультразвуком в течение 10 минут.

Приготовление сток-растворов стандартов

5 мг (точная навеска) стандартных образцов помещают в пробирку типа эппендорф, автоматическим дозатором переменного объема 100-1000 мм3 прибавляют такой объем подвижной фазы (около 500 мм3) необходимый для получения раствора с концентрацией 10мг/см3 и растворяют в ультразвуковой бане. Раствор охлаждают до комнатной температуры. Раствор хранят при температуре не выше -20оС.

Приготовление калибровочных образцов

Калибровочные образцы готовят (от 6-го уровня к 1-му) путем последовательного разбавления раствора с более высокой концентрацией, смешивая 100 ммЗкалибровочного раствора более высокого уровня с объемом подвижной фазы, указанным в таблице 14.3. Для приготовления калибровочного раствора 6-го уровня автоматическим дозатором переменного объема в эппендорфе смешивают 100 ммЗ сток-раствора стандарта РС, 16 ммЗ сток-раствора стандарта РЕ. Для каждой аналитической серии использовали свежеприготовленные калибровочные образцы

Таблица 14.3 – Объемы подвижной фазы и концентрации аналитов в калибровочных образцах

	Объем подвижной фазы, мм3	створе, мкг/см3	
N⁰		PC	PE
уровня			
1	150	100	16
2	100	250	40
3	100	500	80
4	150	1000	160
5	100	2500	400
6	см текст	5000	800

Приготовление образцов контроля качества

Для получения образцов контроля качества 3го уровня автоматическим дозатором переменного объема в эппендорфе смешивают 100 мм3 сток-раствора стандарта PC, 16 мм3 сток-раствора стандарта PE и 68 мм3 подвижной фазы. Для получения образцов контроля качества 2го уровня автоматическим дозатором переменного объема в эппендорфе смешивают 40 мм3 образца контроля качества 3го уровня и 160 мм3 подвижной фазы. Для получения образцов контроля качества 1го

уровня автоматическим дозатором переменного объема в эппендорфе смешивают 20 мм3 образца контроля качества 2го уровня и 180 мм3 подвижной фазы.

Концентрация анализируемых компонентов в образцах контроля качества приведена в таблице 14.4. Для каждой аналитической серии использовали свежеприготовленные образцы контроля качества.

N⁰	Концентрация в растворе, мкг/см3					
уровня	PC	PE	LPC			
1	100	16	16			
4	1000	160	160			
6	5000	800	800			

Таблица 14.4- Концентрации образцов контроля качества.

Пробоподготовка

Для определения содержания фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина навески стандартного образца Lipoid S80 (1,8 мг/ см3) и препарата фосфолипидных наночастиц (9 и 8,4 мг/см3) растворяют в подвижной фазе под действием ультразвука при комнатной температуре. Полученные гомогенные растворы анализируют в изократическом режиме при условиях хроматографирования, указанных В нижеследующей таблице 14.5. Идентификация пиков фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина происходила на длине волны 206 нм. Использовалось автоматическое интегрирование хроматограмм с помощью программного обеспечения ChemStation. Для количественного определения использовался метод градуировочного графика.

Параметр	Значение
Хроматограф:	Высокоэффективный жидкостный хроматограф Agilent
	1200 серии, снабженный насосом высокого давления,
	дегазатором подвижной фазы, термостатом колонок,
	автосемплером и диодно- матричным
	спектрофотометрическим детектором
Колонка:	250 мм × 4,6 мм, заполненная силикагелем, размер частиц 5
	мкм; Kromasil 60-5-SIL
Температура колонки	40°C
Скорость потока	1,0 см3/мин
Детектор	диодно- матричнй спектрофотометрическим
Длина волны	206 нм
Объем вводимой пробы	10 мм3
Время хроматографирования	ИН

Таблица 14.5– Условия хроматографирования аналитов

Количественное определение концентрации аналита

Проверка пригодности хроматографической системы

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

Эффективность хроматографической колонки (N), рассчитанная по пику фосфатидилхолина, должна быть не менее 1000 теоретических тарелок.

Фактор асимметрии пика (As) фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина должен быть не более 2,0.

Относительное стандартное отклонение времени удерживания (CV tR), фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и системного пика должно быть не более 2 %;

Относительное стандартное отклонение площади пика (CV S) фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина должно быть не более 5 %;

Разрешение между системным пиком и пиком фосфатидилэтаноламина (RS-PE) должно быть не менее 1,5;

Разрешение между пиками фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина (RPC-PE) должно быть не менее 8,0;

Отношение сигнал/шум для пика фосфатидилэтаноламина (PSNR) должно быть более 10.

Результаты измерения вышеперечисленных параметров приведены в Таблице 14.6.

Образец	Параметры							
	Ν	As	CV tR,	CV tR,	CV	RS-PE	RPC-PE	PSNR
			%	%	s, %			
				System				
				peak				
PE	>1400	0,56 –	0,1	0,19	1,32	$1,52\pm0,04$	-	77,4±20,7
16	(1426)	0,63						
мкг/см3								
PE	>1500	0,53 –	0,1	0,26	2,25	$1,6\pm0,07$	—	481±161,6
160	(1522)	0,55						
мкг/см3								
PE	>1500	0,51 –	0,04	0,14	0,2	$1,66\pm0,01$	—	2213,7±428,8
800	(1547)	0,53						
мкг/см3								
PC	>1500	0,77 –	0,09	0,19	1,62	—	12,61±0,09	100,8±19,7
500	(1513)	0,88						
мг/см3								
PC	>1600	0,89 –	0,07	0,26	0,29	—	13,24±0,05	203,6±25,6
1000	(1673)	0,92						
мг/см3								
PC	>1600	1,2 –	0,14	0,14	0,22	—	13,29±0,05	3303,5±398,2
5000	(1656)	1,36						
мг/см3								

Таблица 14.6 – Определение пригодности хроматографической системы

Полученные значения вышеперечисленных параметров удовлетворяют приведенным критериям, указанным в п. 14.1.3.1., следовательно, хроматографическая система пригодна.

14.1.3. Интерпретация результатов измерений

Относительное стандартное отклонение

Для подтверждения того, что методика позволяет оценить содержание целевого компонента, был проведен анализ проб, содержащих только подвижную фазу и проб, содержащих каждый стандарт в отдельности (Хроматограммы см. в Приложении Г1). Установлен порядок выхода и время удержания аналитов. Установлено, что время удерживания фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина в стандартных растворах соответствует времени удерживания анализируемых соединений в стандартном образце Lipoid S80 и образце фосфолипидных наночастиц (данные приведены в таблице 14.7). Относительное стандартное отклонение времени удерживания фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина в смеси стандартов и в измеряемых образцах должно быть не более 2 %.

Таблица 14.7 — Относительное стандартное отклонение времени удерживания фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина

	Стандартный образец	Фосфолипидные	Фосфолипидные		
	Lipoid S80,	наночастицы,	наночастицы,		
	1,8 мг/см3	9 мг/см3	8,4 мг/см3		
CV t-PE	0.93	0.11	0.97		
CV t-PC	0.24	0.13	0.17		

Линейность

Калибровочная кривая состояла из 6 ненулевых калибровочных стандартов, охватывающих диапазон концентраций фосфатидилэтаноламина от 16 до 800 мкг/см3 и фосфатидилхолина от 100 до 5000 мкг/см3. Для оценки воспроизводимости результатов были получены 3 калибровочные кривые и проведен обратный расчет концентраций используемых стандартов и определены статистические значения.

Критерии приемлемости:

Различие между обратно-рассчитанной концентрацией на всех уровнях и номинальным значением этой концентраций, должно быть ≤ 15%.

Коэффициент корреляции: ≥ 0,99.

Зависимость площади пика аналита от номинальной концентрации калибровочных образцов была линейной и описывалась уравнением типа Y= aX+b и коэффициентом корреляции R2 не менее 0,99 (рис. 14.1 – 14.6).

Воспроизводимость результатов с учетом критериев приемлемости достигается во всем интервале концентраций (табл. 14.8, 14.9). Результаты измерений разных калибровочных серий представлены в Приложении Г.2.



Рисунок 14.1 – Градуировочный график зависимости площади под хроматографическим пиком Фосфатидилэтаноламина от его концентрации в калибровочном растворе (1-я калибровочная серия)



Рисунок 14.2 – Градуировочный график зависимости площади под хроматографическим пиком Фосфатидилэтаноламина от его концентрации в калибровочном растворе (2-я калибровочная серия)



Рисунок 14.3 – Градуировочный график зависимости площади под хроматографическим пиком Фосфатидилэтаноламина от его концентрации в калибровочном растворе (3-я калибровочная серия)



Рисунок 14.4 Градуировочный график площади _ зависимости под хроматографическим пиком Фосфатидилхолина от концентрации его в калибровочном растворе (1-я калибровочная серия)



Рисунок 14.5 _ Градуировочный график зависимости площади под хроматографическим пиком Фосфатидилхолина от его концентрации в калибровочном растворе (2-я калибровочная серия)



Рисунок 14.6 – Градуировочный график зависимости площади под хроматографическим пиком Фосфатидилхолина от его концентрации в калибровочном растворе (3-я калибровочная серия)

Таблица 14.8 – Статистические параметры градуировочных графиков зависимости площади под хроматографическим пиком фосфатидилэтаноламина

№ серии	Номинальная концентрация фосфатидилэтаноламина мкг/см3						Параметры градуировочного
	16	40	80	160	400	800	Трафика
		Эксперимент	ально рассчит	ганные конце	нтрации мкг/с	м3	
1	17,6	36,2	83,5	181,6	409,5	791,4	$y = 8.5573 * X + 217.81$ $R^2 = 0.9978$
2	15,7	40,9	88,14	178,7	411,3	790,8	$Y=7.7468*X+208.97 \\ R^2=0.9976$
3	18,0	35,6	84,3	173,6	405,5	794,7	$Y = 8.554 * X + 135.66$ $R^2 = 0.9991$
Кол-во точек	3	3	3	3	3	3	
Среднее значение	17,1	37,6	85,3	178,0	408,8	792,3	
Правильность, %	106,88	93,92	106,64	111,23	102,19	99,04	
CV, %	7,19	7,73	2,91	2,28	0,73	0,27	

Номинальная концентрация фосфатидилхолина мкг/см3 № серии Параметры градуировочного графика 100 250 500 1000 2500 5000 Экспериментально рассчитанные концентрации мкг/см3 Y= 8.3338*X + 1124.6 1 107.6 232,3 514,7 1128,1 2583,9 4936,9 $R^2 = 0.9977$ 2 105.7 236.4 517.6 1095.6 2631.0 4918.6 Y = 8.3801 * X + 1436.7 $R^2 = 0.9973$ 3 106,1 235,6 560,4 980,5 2502,5 4949,4 Y= 6.0346*X + 1275.3 $R^2 = 0.9981$ 3 3 3 3 3 3 Кол-во точек 106.5 234.8 530.9 1068.1 2572.5 4935.0 Среднее значение Правильность, 106.47 93.91 106.18 106.81 102.90 98.70 % CV, % 0.94 0.93 4.82 7.26 2.53 0.31

Таблица 14.9 – Статистические параметры градуировочных графиков зависимости площади под хроматографическим пиком фосфатидилхолина

Прецизионность и правильность

Прецизионность аналитической методики представляет собой степень близости значений между отдельными повторными измерениями. Прецизионность выражают в виде коэффициента вариации (CV).

Правильность аналитической методики характеризуется близостью полученных с помощью нее значений к номинальным концентрациям аналита, выражается в процентах от номинального значения.

Прецизионность и правильность метода внутри одной серии оценивались по результатам параллельных анализов образцов контроля качества в составе одной аналитической серии. Каждый образец готовился в 5 повторах. Расчет концентраций образцов контроля качества проводился по градуировочному графику, полученному в составе той же аналитической серии (см. Приложение Г.3).

Прецизионность и правильность метода между аналитическими сериями оценивались по результатам параллельных анализов образцов контроля качества, выполненных в трех аналитических сериях.

Критерии приемлемости:

Прецизионность $\leq 15\%$

Правильность в диапазоне 85 – 115%.

Данные по оценке прецизионности и правильности фосфатидилэтаноламина (Таблица 14.10) и фосфатидилхолина (Таблица 14.11) внутри и между аналитическими сериями удовлетворяют критериям приемлемости.

	Номинальная конц	ентрация фосфатидилэт	аноламина мкг/см3
	16	160	800
№ серии	Эксперименталь	но рассчитанные конце	нтрации мкг/см3
Π	рецизионность и правил	тьность внутри серии	
	17,2	147,6	791,4
	17,3	147,6	787,8
1 серия	17,6	149,0	789,8
-	17,3	147,8	790,5
	17,7	147,3	795,1
Кол-во точек	5	5	5
Среднее значение	17,4	147,9	790,9
Правильность,%	108,8	92,4	98,9
CV, %	1,32	0,45	0,34
	18,5	140,8	790,7
-	17,4	131,1	788,3
2 серия	14,7	133,0	790,5
1	15,1	132,5	791,0
	14,8	131,2	792,9
Кол-во точек	5	5	5
Среднее значение	16,1	133,7	790,7
Правильность, %	100,6	90,4	98,8
CV, %	10,79	3,02	0,20
	18,7	173,7	794,7
	16,5	176,0	884,4
3 серия	17,3	174,9	838,7
	16,5	176,7	825,4
	18,0	173,6	819,4
Кол-во точек	5	5	5
Среднее значение	17,4	175,0	832,5
Правильность, %	108,7	109,4	104,1
CV, %	5,60	0,79	3,98
Пре	ецизионность и правил	ьность между сериями	
Кол-во точек	15	15	15
Среднее значение	17,0	152,2	804,7
Правильность, %	106,0	95,1	100,6
CV, %	7,34	11,75	3,36

Таблица 14.10 — Прецизионность и правильность определения фосфатидилэтаноламина

	Номинальная концентрация фосфатидилхолина мкг/см3						
	100	1000	5000				
№ серии	№ серии Экспериментально рассчитанные концентрации мкг/см3 Прецизионность и правильность внутри серии						
П	рецизионность и правил	пьность внутри серии					
	113,1	1128,0	4936,8				
	105,8	1128,2	4944,5				
1 серия	100,8	1133,0	4948,4				
	106,9	1121,7	4972,3				
	107,6	1131,0	5002,1				
Кол-во точек	5	5	5				
Среднее значение	106,8	1128,4	4960,8				
Правильность, %	106,8	112,8	99,2				
CV, %	4,10	0,38	0,54				
	104,6	1095,6	4918,6				
	102,3	1085,5	4930,8				
2 серия	106,6	1095,8	4914,5				
	103,8	1094,3	4926,7				
	105,7	1095,9	4939,7				
Кол-во точек	5	5	5				
Среднее значение	104,6	1093,4	4926,1				
Правильность, %	104,6	109,3	98,5				
CV, %	1,60	0,41	0,20				
	104,6	1147,6	4966,6				
	102,3	1129,1	5028,3				
3 серия	106,6	1136,2	5049,3				
	103,8	1142,8	5106,2				
	105,7	1139,1	5083,4				
Кол-во точек	5	5	5				
Среднее значение	104,6	1139,0	5046,7				
Правильность, %	104,6	113,9	100,9				
CV, %	1,60	0,61	1,07				
Пр	ецизионность и правил	ьность между сериями					
Кол-во точек	15	15	15				
Среднее значение	105,3	1120,3	4977,9				
Правильность, %	105,3	112,0	99,6				
CV, %	2,73	1,85	1,24				

Таблица 14.11 – Прецизионность и правильность определения фосфатидилхолина

Кросс-перенос

Для оценки кросс-переноса были осуществлены 4 серии ввода образцов в следующей последовательности: калибровочный образец с максимальной концентрацией фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, затем подвижная фаза (blank), затем калибровочный образец с минимальной концентрацией фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина. Хроматограммы стандартных образцов и образцов с минимальной концентрацией фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина.

Критерии приемлемости:

Площадь пика фосфатидилхолина в образце подвижной фазы, анализируемого сразу же после образца с максимальной концентрацией, должна

быть ≤ 5% площади пика фосфатидилхолина в образце с минимальной концентрацией.

Площадь пика фосфатидилэтаноламина в образце подвижной фазе, анализируемого сразу же после образца с максимальной концентрацией, должна быть $\leq 5\%$ площади пика фосфатидилэтаноламина в образце с минимальной концентрацией.

Результаты измерений, представленных в таблице 14.12, удовлетворяют критериям приемлемости.

140/14/4 17.12	προεί περέποι φί	сфитиоиллолит	α α φοεφαπασαλό	manomamina	
Название	Сер	ия 1	Сер	ия 2	
пробы	Площадь РЕ	Площадь РС	Площадь РЕ	Площадь РС	
Blank	0	0	0	0	
Cmin	206,3	1205,4	209,5	1307,8	
Соотношение	0,00	0,00	0,00	0,00	
площадей, %					
Название	Cep	ия 3	Серия 4		
пробы	Площадь РЕ	Площадь РС	Площадь РЕ	Площадь РС	
Blank	0	0	0	0	
Cmin	207,7	1072,4	198,3	1084,5	
Соотношение	0,00	0,00	0,00	0,00	
площадей, %					

Таблица 14.12 – Кросс-перенос фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина

Стабильность образцов Lipoid S80 и образца фосфолипидных наночастиц после пробоподготовки

Время одного анализа одного образца по валидируемой методике составляет 25 минут. Оценка пригодности хроматографической системы, съемка пустых образцов и образцов калибровки и образцов препаратов занимает существенное время. Поэтому весьма остро встает вопрос о стабильности подготовленных образцов стандартов Lipoid S80 и фосфолипидных наночастиц. Для исследования стабильности были подготовлены по 2 образца Lipoid S80 и 2-х партий фосфолипидных наночастиц согласно описанной выше методике пробоподготовки. Полученные образцы хранились в прозрачных стеклянных виалах при температуре 21-24°С, не попадая под прямое воздействие солнечных лучей. Отбор проб для анализа проводился через 0ч, 15ч, 92ч. Отобранные для анализа пробы помещались в автосамплер, термостатированный при 10°С и анализировались в порядке очереди. Результаты измерений представлены в Приложении Г.5.

Критерии приемлемости:

Снижение концентрации на протяжении хранения фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина ≤ 15%.

Как видно из таблицы 14.13, результаты измерений удовлетворяют критериям приемлемости.

Работа в коротковолновой области спектра накладывает дополнительные ограничения на прозрачность используемых для приготовления подвижных фаз растворителей. Важно использовать растворители, предназначенные для высокоэффективной хроматографии. Снижение прозрачности может значительно сказываться на величине сигнала от фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина.

Таблица 14.13 — Значения концентраций фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина в стандартном образце Lipoid S80 и фосфолипидных наночастиц

nuno aucina	iy							
Время, ч	Lipoie	d S80,	Фосфол	ипидные	Фосфолипидные			
	1.8 м	г/см3,	наночастии	наночастицы партия 1,		наночастицы партия 2,		
	1-я п	роба	9 мг/см3,	1-я проба	8,4 мг/см3	, 1-я проба,		
	PE	PC	PE	PE PC		PC		
0	49,4	1391,1	50,0	1393,8	50,2	1291,1		
15	47,1	1382,5	47,0	47,0 1331,1		1250,7		
92	49,1	1475,2	50,3	50,3 1370,0		1195,2		
	Lipoie	d S80,	Фосфол	ипидные	Фосфол	ипидные		
	1.6 м	г/см3,	наночастии	ы партия 1,	наночастицы			
	2-я п	роба	8 мг/см3,	2-я проба	партия 2,			
					8 мг/см3,	2-я проба		
	PE	PC	PE	PC	PE	PC		
0	49,2	1388,1	49,9	1388,9	50,0	1300,6		
15	53,5	1475,2	47,0	1332,0	50,6	1224,3		
92	46,4	437,7	46,2	1313,5	48.6	1160,7		

На время выхода анализируемых компонентов в значительной степени влияет содержание раствора ацетата аммония в подвижной фазе. Увеличение содержания ацетата аммония приводит к сокращению времени выхода компонентов анализа, и критически влияет степень разделения системного на пика И пика фэсфатидилэтаноламина. Однако, уменьшение содержания ацетата аммония увеличивает время выхода пика фосфатидилхолина и может превышать время анализа. Поэтому важно точно следовать методике анализа в части приготовления подвижной фазы.

Проведена валидация аналитической методики количественного определения

фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина в стандартном образце Lipoid S80 и образце фосфолипидных наночастиц методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Воспроизводимость, прецизионность и правильность достигается в интервале концентраций 16-800 мкг/см3 для фосфатидилэтаноламина и 0,1-5 мг/см3 для фосфатидилэтаноламина и 0,1-5 мг/см3 для фосфатидилхолина. Все аналитические характеристики метода соответствуют критериям приемлемости, и, таким образом, делают его пригодным для количественного определения фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина в стандартном образце Lipoid S80 и образце фосфолипидных наночастиц.

14.2. Характеристика наноразмерных частиц методом фотонной корреляционной спектроскопии

Размер частиц определяли методом фотонной корреляционной спектроскопии, относящимся к классическим методами опредления размеров. В эксперименте исследованы образцы, для которых в соответсвтии с п.7.1.32 ТЗ составлен Паспорт наноразмерных частиц для доставки лекарств до включения активных компонентов с характеристиками, полученными с помощью классических методов. Паспорт приведен в Приложениях Г.6 и Г.7- Паспорт 1, Паспорт 2, при использовании Lipoid 80 и Lipoid 100, соответственно.

Критерии приемлемости:

Размер частиц должен находиться в диапазоне от 15 до 50 нм.

Лиофилизированные образцы ресуспендировали в высокоочищенной воде Milli-Q (1 флакон в 10 мл, концентрация 25 мг/мл по ФХ), а затем разбавляли до концентрации 2,5; 1,25; 0,25 и 0,125 мг/мл, далее проводили измерение при +25°С, предварительно дегазировав образцы в течение 30 секунд; Все измерения проводили три раза, результат усредняли.

Средний гидродинамический диаметр частиц и распределение частиц по размерам (PDI) определяли методом динамического рассеяния света (DLS) с помощью нескольких анализаторов: Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Великобритания), Beckman Coulter N5 Submicron Particle Size Analizer (США), NICOMP 380 ZLS Zeta Potential/Particle Sizer (США) в сравнении со стандартными частицами образца микросфер полистирола размером 40 нм с разведением и без разведения. Результаты измерений приведены в таблице 14.14. На основании экспериментальных данных было установлено, что для анализа образец препарата рекомендуется разводить водой в 20 и более раз. При этом в методике анализа в приборе следует указать в качестве растворителя не воду, а 20 % раствор мальтозы и его характеристики, используемые для расчёта размера частиц (вязкость, показатель преломления).

Таблица .	14.14 – Измен	чение разл	<i>1ера фо</i>	сф	олип	идне	ых наноча	стиц в завис	имости от
степени	разведения	образца	водой	и	20	%	водным	раствором	мальтозы
моногидр	ama								

Раство-	Разве-	Унимодальное	распределение	Полимодальное распределение по		
ритель	дение			объёму		
		Средний размер,	Индекс	Средний размер,	% объёма	
		HM	полидисперс-	HM		
			ности			
Вода	_	$46{,}9\pm0{,}0$	$0,\!404 \pm 0,\!003$	$23,1 \pm 0,3$	$100,0\pm0,0$	
	1:2	$48,0\pm0,4$	$0,\!290 \pm 0,\!006$	$25,0 \pm 1,3$	$99,7\pm0,5$	
	1:4	$47{,}9\pm0{,}2$	$0,\!279 \pm 0,\!008$	$26,7 \pm 1,3$	$99,8\pm0,2$	
	1:10	$48,7\pm0,3$	$0,265 \pm 0,002$	$29,9 \pm 1,4$	$99,9 \pm 0,1$	
	1:20	$49,1 \pm 0,2$	$0,263 \pm 0,008$	$30,7 \pm 1,6$	$99,9 \pm 0,1$	
	1:50	$49,5 \pm 0,1$	$0,\!264 \pm 0,\!009$	$31,1 \pm 1,2$	$99,9 \pm 0,1$	
	1:100	$49,6 \pm 0,3$	$0,255 \pm 0,001$	$30,2 \pm 2,2$	$93,7 \pm 10,9$	
	1:250	$50,5 \pm 0,4$	$0,\!267 \pm 0,\!008$	$30,0 \pm 2,0$	$99,6 \pm 0,3$	
20 %	_	$46{,}9\pm0{,}0$	$0,\!404 \pm 0,\!003$	$23,1 \pm 0,3$	$100,0\pm0,0$	
раствор	1:2	$43,9 \pm 0,2$	$0,\!298 \pm 0,\!002$	$23,2 \pm 0,9$	$99,9 \pm 0,2$	
мальтозы	1:4	$43,8 \pm 0,2$	$0,\!290 \pm 0,\!004$	$23,5 \pm 0,5$	$99,8\pm0,4$	
моно-	1:10	$44,8\pm0,6$	$0,\!349 \pm 0,\!037$	$23,2 \pm 1,4$	$99,6\pm0,4$	
гидрата	1:20	$45,3 \pm 0,2$	$0,\!427 \pm 0,\!008$	$22,5 \pm 1,7$	$98{,}4\pm0{,}5$	
	1:50	$53,0 \pm 1,0$	$0,\!436 \pm 0,\!017$	$24,3 \pm 1,1$	$99,7 \pm 0,3$	
	1:100	$68,1\pm0,6$	$0,501 \pm 0,019$	$27,9 \pm 0,2$	$97,8 \pm 1,2$	
	1:250	$77,3 \pm 2,5$	$0,359 \pm 0,056$	$31,2 \pm 2,0$	$99,6 \pm 0,3$	

Считается, что оптимальной концентрацией образца для анализа является такая концентрация, при которой его дальнейшее разведение не приводит к изменению размера частиц. При этом стоит избегать чрезмерного разведения, поскольку низкое соотношение сигнал-шум и низкая интенсивность сигнала делают анализ продолжительным по времени, а результаты недостоверными. Для определения оптимального разведения образца была проведена серия измерений размера частиц регидратированного образца фосфолипидных наночастиц, разведенного водой и 20 % водным раствором мальтозы моногидрата. Соответственно измерения проводились для образца, разводимого водой, по методике, где в качестве растворителя значился раствор мальтозы моногидрата с концентрацией, соответствующий разведению (10 %, 5 %, 2 %, 1 %, 0,4 %, 0,2 % и 0,08 %), а для образца, разводимого 20 % водным раствором мальтозы моногидрата, по методике с 20 % водным раствором мальтозы моногидрата в качестве

растворителя.



Рисунок 14.7 — График изменения размера фосфолипидных наночастиц в зависимости от степени разведения водой

Из полученных данных (рисунок 14.7) видно, что при разбавлении образца фосфолипидных наночастиц водой измеряемый размер частиц практически не изменяется, начиная с разведения в 20 раз и более. При разбавлении 20 % водным раствором мальтозы моногидрата, напротив, измеряемый размер частиц имеет близкие значения при незначительном разведении до разведения в 20 раз (рисунок 14.8).



Рисунок 14.8 — График изменения размера фосфолипидных наночастиц в зависимости от степени разведения 20 % водным раствором мальтозы

Для установления достоверности разницы в значениях измеряемого размера частиц при разведении образца водой и 20 % водным раствором мальтозы моногидрата проводили измерения размера частиц в 5 флаконах такого образца, регидратированного водой и в дальнейшем разведённого водой или 20 % водным раствором мальтозы моногидрата.

Из полученных данных видно, что методика анализа характеризуется сходимостью: коэффициент вариации среднего значения размера частиц в полимодальном распределении по объёму составляет менее 10 %, т. е. степень отклонения получаемых данных от среднего значения является незначительной. При этом, в случае разведения водой образца определяемый размер частиц больше на 7 нм, чем определяемый размер частиц при разведении 20 % раствором мальтозы моногидрата. Однако индекс полидисперсности во втором случае больше, что указывает на большую степень гетерогенности образца при его разведении 20 % раствором мальтозы моногидрата. Помимо основной фракции частиц с размером около 23 нм в образце присутствуют частицы размером несколько мкм с содержанием менее 1 % по объёму. Возможно, это инородные частицы, так или иначе попавшие в образец в кювете (из воды, воздуха, со стенок кюветы).

Значение размера частиц при разведении образца 20 % раствором мальтозы моногидрата ближе к значению размера частиц без разведения, чем при разведении водой. Анализ такого образца методом малоуглового рентгеновского рассеяния света показал, что фосфолипидные наночастицы имеют средний размер 27 нм [238].

Результаты физико-химических измерений, полученных с использованием классических аналитических методов, представлены в Паспорте наноразмерных частиц для доставки лекарств до включения активных компонентов, прилагаемом к настоящему отчету (Приложение Г.6). Результаты определения размеров в разбавленных растворах необходимы для интерпретиации результатов измерений, полученных с помощью АСМ, поскольку в этом методе сорбция исследуемых объектов производится из разбавленных растворов.

<i>1аолица 14.15 – Результаты опреоеления схооимости метооики анализа размера</i>							
частиц							
Растворитель	N⁰	Унимодальное	распределение	Полимодальное			
для разведения	фла-			распределение по объёму			
	кона	Средний размер,	Индекс	Средний	% объёма		
		HM	полидисперс-	размер, нм			
			ности				
Вода	1	49.5 ± 0.2	$0,261 \pm 0,004$	$30,6 \pm 0,4$	$100,0 \pm 0,0$		

 $0,254 \pm 0,003$

 $0,261 \pm 0,003$

 $0,258 \pm 0,002$

 $0,261 \pm 0,005$

0,259

0,004

1.5

 $0,403 \pm 0,008$

 $0,393 \pm 0,015$

 $0,396 \pm 0,008$

 $0,401 \pm 0,007$

 $0,403 \pm 0,008$

0,399

0,009

2,3

 $29,6 \pm 0,6$

 $31,6 \pm 1,5$

 $31,8 \pm 2,8$

 $29,9 \pm 0,3$

30.7

1,6

5.1

 $23,0 \pm 0,6$

 $23,3 \pm 1,9$

 23.9 ± 1.1

 23.9 ± 0.8

 $22,3 \pm 1,7$

23,3

1,3

5,4

 $100,0 \pm 0,0$

 100.0 ± 0.0

 $99,9 \pm 0,2$

 $100,0 \pm 0,0$

 $99,5 \pm 0,1$

 $99,6 \pm 0,4$

 $100,0 \pm 0,0$

 99.9 ± 0.2

 $99,6 \pm 0,33$

 $49,8 \pm 0,3$

 $49,9 \pm 0,4$

 $49,8 \pm 0,2$

 $49,6 \pm 0,3$

49.7

0,3

0.6

 $48,4 \pm 0,2$

 $48,1 \pm 0,3$

 $48,4 \pm 0,4$

 $48,3 \pm 0,2$

 $48,7 \pm 0,3$

48,4

0,3

0,6

2

3

4

5

1 2

3

4

5

Среднее значение

Среднее квадратичное отклонение

Коэффициент вариации,

%

Среднее значение

Среднее квадратичное

отклонение Коэффициент вариации,

%

20 % раствор

мальтозы моногидрата

1 / 15 - -

14.3. Характеристика наноразмерных частиц методами атомно-силовой микроскопии (АСМ) и методом электронной микросокпии (ЭМ)

В работе использованы образцы, наработанные в рамках проекта и свойства которых, полученные классическими методами, описаны в Приложении Г.7 3). Определение размеров методом фотонной корреляционной (Паспорт спектроскопии проведено как описано в подразделе 14.2, результаты отражены в Паспорте.

Определение размеров частиц методом электронной микроскопии проводилось с использованием растрового электронного микроскопа Hitachi S-5500. Съёмка велась в просвечивающем режиме STEM при напряжении 15 и 30 кВ. Обработка изображений производилась с использованием программного обеспечения ImageJ [245]. Был применен порог для устранения фонового шума для каждого изображения и сбор распределения диаметров эквивалентной площади для не менее 500 частиц каждого размера в соответствии с ISO 13322-1 [246].

Проведенные серии экспериментов по АСМ-визуализации наночастиц,

адсорбированного на поверхности свежесколотой слюды, была приготовлены с использованием деионизированной воды (удельное сопротивлением 18,2 МОм×см) полученной с помощью УФ-системы Simplicity (Millipore, Molsheim, Франция). В качестве подложки для нековалетной сорбции наночастиц была выбрана поверхность слюды (толщина 0,15мм, размер 15х15 мм, TipsNano). Перед использованием слюда была разрезана пополам, скалывалась, для обеспечения атомарно ровного слоя и чистоты поверхности.

Изображения наноразмерных частиц получены при помощи атомно-силового микроскопа Dimension со сканером IconTM (Bruker, CША), входящего в состав УНУ «Авогадро». Сканирование производили в полуконтактном режиме. Использовался укороченный держатель для кантилевера, измерения проводились на воздухе. Измерений параметров жесткости и получения силовых кривых проводились с использованием технологии PeakForce QNM. Для измерения модуля Юнга были использованы кантилеверы RTESPA-300 (характерная жесткость 20 H/м, радиус кривизны 8-12 нм). Сканирование проводили в заданной области, в каждом эксперименте было получено не менее 15 кадров, каждый эксперимент был проведен не менее 3 раз. Скорость сканирования 1 Гц, разрешение кадра 256х256 (для модуля Юнга) область сканированного кадра 5×5 и 2х2 мкм2. Чувствительность к отклонению кремниевого зонда была откалибрована на стандартной чистой сапфировой пластине, затем было получено среднее значение для уменьшения случайной ошибки. Параметры жесткости кантилеверов были получены методом тепловой настройки.

Изображения регистрировали при помощи программного обеспечения NanoScope 9.4 (Bruker, США). Обработка ACM изображений производилась с использованием программы Femtoscan Online [247]. Обработка силовых кривых производилась с использованием стандартного программного обеспечения NanoScope Analysis 2.0 (Bruker, США). Анализ полученных данных по высотам проводился в программном обеспечении Recognite (совместная разработка ИБМХ и НИЯУ МИФИ). Построение функции распределения и диаграмм проводилось в Microsoft Excel. В дальнейшем планируется использовать специально разработанное (в рамках мероприятия по п.2.4.ПГ проекта) ПО, для совмещения анализа большого объема данных, полученных по высотам и модулю Юнга в одной программе.

14.3.1. АСМ измерения высоты наноразмерных частиц

Произведен подбор условий нековалентной иммобилизации наноразмерных частиц на атомарно ровную поверхность свежесколотой слюды. Для этого был использован раствор фосфолипидных частиц, без включения лекарственного вещества, исходной концентрации (2,5 г/10 мл воды). Адсорбция частиц происходила в процессе инкубации АСМ подложки в 1 мл раствора в течение часа. Для удаления излишней влаги подложку оставляли на воздухе в течение 1-2 мин, после чего проводилось сканирование образца.

Визуализированы единичные объекты, локализованные В слое, предположительно принадлежащему остаткам смесей исходного раствора. На рисунке 14.9 представлено типичное АСМ-изображение топографии обнаруженных объектов и профиль поперечного сечения (рисунок 14.9 б) соответствующей линии на изображении (рисунок 14.9 а). Линия поперечного сечения, проведенная через наночастицу, позволяет не только вычислить высоту, но также определить, изолирован ли объект и находится ли он на плоской области (например, на краю ступеньки). Наличие ступеньки в 1-2нм показывает, что объекты действительно находятся в детергенте, таким образом, исключая предположение об артефакте сканирования. В данном случае, на рисунке 4.9 б профиль поперечного сечения также показывает наличие ступеньки, на которой локализован искомый объект, высотой в 2-3 нм. Исходя из чего, при построении функции распределения объектов по высотам вводился уровень отсечения, который составил 3 нм.

По результатам обработки данных АСМ-изображений построен график функции распределения визуализированных объектов по высотам $\rho(h)$ (рисунок 14.10). Высоты наночастиц определялись как высоты соответствующих максимумов распределения $\rho(h)$ их изображений по размерам по соотношению:

$$p(h) = \frac{N_h}{N} * 100\%$$
 (1),

где Nh – это число визуализированных объектов с высотой h, a N – это общее число визуализированных объектов. Для статистически значимой оценки распределения частиц по размерам, было измерено примерно 200 <Np<400 наночастиц. Для измерения размеров наночастиц анализировали максимальные высоты объектов на ACM изображениях.



Рисунок 14.9 – АСМ-изображение (а) топографии объектов, адсорбированных на слюдяной подложке после нековалентной сорбции наночастиц из раствора фосфолипидных ноночастиц при комнатной температуре (T=25 °C). Красными маркерами обозначены границы искомой частицы. Масштаб изображения – 5 мкм. (б) – профиль поперечного сечения, соответствующий линии на изображении (а)



Рисунок 14.10 – График функции распределения визуализированных объектов по высотам, полученных в серии измерений по определению размеров наночастиц.

График показывает наличие мономодального пика, максимум которого соответствует 8,4 нм. Ширина распределения показывает наличие частиц с размерами от 3 до 12 нм. Предполагаем, что частицы имеют сферическую форму, следовательно, высота должна быть идентична диаметру (или размеру) каждой частицы. Однако следует отметить, что на значения высот могла повлиять деформация объектов, вызванная взаимодействием кантилевера и наночастицы во время формирования АСМ изображения, что может привести к отображению меньших значений высот, чем у неповрежденных частиц [230].

14.3.2. Определение размеров частиц методом электронной микроскопии.

Суть метода состоит в прямом наблюдении наночастиц для доставки лекарств в электронном микроскопе. По микрофотографии проводится измерение площади поперечного сечения частиц, полученные данные пересчитываются в диаметр частицы в предположении, что визуализированные объекты имеют сферическую форму. По расчетным данным строится гистограмма распределения частиц по размерам.

На стандартную 3-мм электронно-микроскопическую сетку с углеродной плёнкой нанесено 5 мкл исходного раствора, содержащего фосфолипидные наночастицы. Анализу подвергался аналогичный раствор, как и в АСМ измерениях, время инкубации раствора составляло 10 минут. Далее сеточка промывалась в деионизованной воде, а остатки воды удалялись промокательной бумагой. Затем сеточка высушивалась в вакуумной системе Gatan Model 655 в течение 30 мин. при давлении 1,5 10⁻⁴ Па.

Адсорбированные на плёнку частицы подвергались анализу в ЭМ. Съёмка велась в просвечивающем режиме STEM. На рисунке 14.11 представлены характерные микрофотографии адсорбированных частиц.



Рисунок 14.11- Изображения наноразмерных частиц для доставки лекарств на углеродной плёнке, полученные методом электронной микроскопии

На представленных изображениях визуализированы равномерно расположенные темные частицы округлой формы, предположительно мицеллы, в диапазоне размеров от 15 до 50 нм. Следует отметить, что контраст на снимках в процессе сканирования был довольно слабый, и был значительно увеличен при обработке фотографий, что говорит о том, что природа частиц, скорее всего, носит органический характер.

По результатам обработки данных STEM-изображений была построена гистограмма распределения частиц по размерам (рисунок 14.12). Для устранения вклада шумовых параметров и детергентных объектов при подсчете был установлен уровень отсечения 3,5 нм, что соответствует размерам ступенек, визуализированных в ACM.



Рисунок 14.12 – Гистограмма распределения частиц по размерам, полученных в результате STEM измерений

Максимум гистограммы соответствует размерам 6,5 нм, диапазон максимального количества частиц в гистограмме – от 4,5 до 10,5 нм, что подтверждает широкое распределения размеров частиц и сопоставимо с результатами АСМ измерений.

14.3.3. Определение параметров жесткости наноразмерных частиц для доставки лекарств методом АСМ

Были проведены ACM измерения на приборе Dimension Icon с применением технологии Peak Force QNM. Поскольку данный режим не вызывает резонанса с кантилевером, настройка резонансной частоты не производится. Это является большим преимуществом метода, в особенности для проведений измерений в жидкостных средах, так как не вызывает дополнительных колебаний, отражающихся на качестве полученных результатов. Производится контактная и тепловая калибровка кантилевера, благодаря которой формируются количественные показатели жесткости, адгезии и деформации объектов исследования.

Подготовка образца производится аналогично, как и для ACM-измерений высот. Производится детектирование объектов в масштабе 10x10 либо 5x5 мкм, далее сканируется интересующая область. Силовые кривые записываются в каждой точке взаимодействия кантилевера и образца. Модуль Юнга Е* вычисляется путем

подбора кривой с использованием модели Дерягина, Мюллера, Торопова (ДМТ):

Ftip = $4/3 E^* \sqrt{(Rd^3) + F_adh(3)}$,

где Ftip – сила, действующая на кантилевер, Fadh – сила адгезии, R – радиус кривизны, a d – расстояние между образцом и кантилевером.

На рисунке 14.13 а представлен пример изображения, полученных в канале DMTModulus, по которому, в свою очередь определяются силовые кривые для количественного расчета модуля Юнга.

На основании графика функции распределения частиц по высотам (рисунок 14.10) и гистограммы распределения частиц по размерам (рисунок 14.12) были выбраны частицы в диапазоне высот 5-10 нм, параметры жесткости которых были проанализированы (таблица 14.6). Для качественной оценки параметров жесткости также необходимо учитывать параметр Indentation, который показывает на сколько зонд продавливает поверхность. Были выбраны участки изображений, где уровень индентации составлял не менее 2 нм. Канал ошибки обратной связи (рисунок 14.13 б) подтверждает наличие искомых частиц на поверхности и позволяет нивелировать фактор ошибки приложенной силы к поверхности пользователем.



Рисунок 14.13 (a) — пример изображения, фосфолипидных наночастиц, адсорбированных на поверхности свежесколотой слюды, полученного в канале DMTModulus

(б) – пример изображения канала ошибки обратной связи

Средние значения модуля Юнга были вычислены методом обработки силовых кривых в ручном режиме, со всего участка соответствующей наночастицы (таблица

14.16). Было проанализировано не менее 10 силовых кривых в каждом заданном участке. Для обработки силовых кривых использовалось стандартное программное обеспечение NanoScope Analysis.

Таблица 14.16 – Значения жескости фосфолипидных наночастиц и поверхности свежесколотой слюды, полученные в режиме Peak Force QNM

Объект	Среднее значение модуля Юнга
Фосфолипидная наночастица	136,92±26,74 MPa
Поверхность слюды	400,13±153,6 MPa

Полученные результаты характеризуют значения жесткости наночастиц для доставки лекарств до включения активных компонентов. На следующем этапе работ проекта эти характеристики будут сопоставляться с характерстиками жесткости наноразмерных частиц для доставки лекарств после включения активных компонентов в систему. Отметим, что на данный момент параметры жесткости получены при сканировании в воздухе, что, предположительно, оказало влияние на конечный результат. В связи с чем на следующем этапе работ проекта проекта предлагается провести дополнительные измерения для изучения объектов при сканировании в жидкостной среде, а также произвести статистический анализ с помощью специально разработанного ПО (в рамках мероприятия п.2.4 ПГ) для установления корреляции высот и значений жесткости наночастиц.

В отчетный период календарного плана-графика работ в рамках мероприятия по п.2.14 ПГ было проведено сравнение результатов трех методов, для определения размера частиц: классических методов (электронной микроскопии, фотонной корреляционной спектроскопии) и метода с применением молекулярного детектора атомно-силовой микроскопии. Электронная микроскопия предоставила информацию не только о размерах и распределении по размерам частиц, а также об их форме и морфологии. Сравнение размеров фосфолипидных наноразмерных частиц для доставки лекарств до включения активных компонентов, полученных тремя методами, показало наличие широкого диапазона частиц от 3,5 до 50 нм. Однако наиболее близкими оказали результаты методов атомно-силовой и электронной микроскопии, которые позволили более детально визуализировать адсорбированные наноразмерные частицы не в ансамбле, а равномерно распределенных по поверхности, что позволяет оценить свойства единичных частиц.

Получены методом ACM результаты значения жесткости наночастиц для доставки лекарств до включения активных компонентов. Далее эти характеристики будут сопоставляться с характеристиками жесткости наноразмерных частиц для доставки лекарств после включения активных компонентов в систему.

В результате выполнения работ по пунктам 2.14 Плана-графика и 5.27 – 5.28 Технического задания Соглашения получены следующие результаты.

Определены свойства наноразмерных частиц классическими аналитическими методами, результат показан в Паспорте наноразмерных частиц (Приложение Г.6). Разработан и валидирован метод одновременного количественного определения фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина в растворе методом ВЭЖХ. Воспроизводимость, прецизионность и правильность достигается в интервале концентраций 16-800 мкг/см3 для фосфатидилэтаноламина и 0,1-5 мг/см3 для фосфатидилхолина. Все аналитические характеристики метода соответствуют критериям приемлемости, и, таким образом, делают его пригодным для количественного определения фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина в стандартном образце Lipoid S80 и образце фосфолипидных наночастиц.

Произведена верификация аналитической системы на основе ACM, с использованием разработанной на первом этапе Методики, что подтверждает выполнение пункта п. 5.27 ТЗ в полном объеме.

Полученные результаты показали возможность использования ACM в качестве инструмента для характеристики наноразмерных частиц, предназанченных для доставки лекарственных препаратов.

В рамках работ подобраны условия нековалентной сорбции фосфолипидных наночастиц на поверхности. Частицы визуализированы как в виде единичных объектов, так и в остатке смесей раствора.

Использована разработанная на первом этапе работ Методика ACMвизуализации наноразмерных частиц, применяемая для изучения физикохимических свойств наночастиц для доставки лекарств. Методика обеспечивает возможность определения характеристик частиц размером до 100нм. Объекты охарактеризованы по высоте сорбированных объектов и их жесткости.

Для оценки результатов ACM-анализа использовали дополнительные методы электронной микроскопии и фотонно-коррелиационной спектроскопии.

Полученные результаты сопоставимы с результатами АСМ и подтверждают наличие широкого спектра частиц размерами от 3,5 до 50 нм.

Определены значения модуля Юнга частиц разной локализации и подложки. Для дальнейшего применения методики на наноразмерных частицах для доставки лекарств требуется провести дополнительные измерения в жидкостной среде.

Представлены результаты определения высоты объектов в виде графиков функции распределения визуализированных объектов по высотам $\rho(h)$, диаграммы распределения частиц по их латеральным размерам и в виде таблицы, представляющей значения модуля Юнга.

Работы по пункту 2.14 плана-графика выполнены в полном объеме и соответствуют пунктам 5.28 и 7.1.32 технического задания.

15. ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ НАНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ СО ВСТРОЕННЫМ АКТИВНЫМ КОМПОНЕНТОМ

15.1. Выбор активного компонента для возможного последующего включения в наноразмерные частицы

В данной работе, в качестве практического применения полученных результатов, наряду с исследованием физико-химических свойств наночастиц, исследуется возможность их применения в качестве систем доставки биологически активных компонентов. На данном этапе выполнения работ проведена апробация встраивания хорошо известных в медицинской практике лекарственных субстанций, обладающих низкой водорастворимостью и, как следствие, биодоступностью, а также начата разработка новых фармакологически активных композиций с целью определения перспективных кандидатов для последующих фармакологических исследований.

Целью Проекта является поиск и исследование прогностических И терапевтических маркеров социально-значимых заболеваний, к которым относятся, в соответствии с Перечнем социально значимых заболеваний (утв. постановлением Правительства РФ от 1 декабря 2004 г. N 715), злокачественные новообразования. В рамках Проекта осуществляется разработка потенциальных лекарственных композиций и поиск фармакологически активных форм. Для этой цели синтезированы соединения-кандидаты с противоопухолевым действием И исследована их первичная фармакологическая активность на модели in vitro. Работы велись по трем направлениям: разработка соединений с противоопухолевой активностью, повышение цитопротекторных свойств лекарственных композиций при осуществлении химиотерапии и исследование механизма действия ферментных препаратов как противоопухолевых средств.

Наиболее часто применяемыми реальной клинической практике В лекарственными средствами являются нестероидные противовоспалительные (НПВП). Актуальность их обусловлена широтой препараты применения терапевтического действия: они обладают обезболивающим, жаропонижающим, противовоспалительным действием [248]. B данной работе исследованы возможности встраивания индометацина (МНН: индометацин) в наноразмерные

частицы. Полученные частицы размером до 50 нм увеличивали биодоступность активного компонента в 2 раза по сравнению со «свободной» (без наночастиц) формой.

Острые респираторные вирусные заболевания являются самой распространенной группой заболеваний, которые могут быть вызваны выбор одновременно несколькими возбудителями. Этим обусловлен для дальнейших исследований активного компонента с противовирусным действием. Умифеновир отобран в качестве компонента, обладающего противовирусной активностью в отношении вирусов гриппа типа А и типа В и коронавируса.

15.1.1.1. Фармакологически активные компоненты с противоопухолевым действием

Производные биспидина как потенциальные противоопухолевые агенты [249]

Полиамины (ПА) представляют собой повсеместно распространенные алифатические поликатионы (путресцин (Пут), спермидин (Спд) и спермин (Спм)), которые взаимодействовать с биологическими могут полианионными макромолекулами [250-253]. Связывание ПА с белками приводит к модуляции активности различных ферментов [254] и ионных каналов [255], поддерживает функции клеточных мембран. Благодаря своей способности взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами, ПА могут влиять на транскрипцию генов [256,257] и трансляцию мРНК [258,259]. Таким образом, ПА необходимы для различных клеточных функций, включая рост и пролиферацию клеток [260]. В дополнение к регулирующим функциям в нормальных клетках, они также могут играть решающую роль в злокачественной трансформации и пролиферации опухолевых клеток, поскольку их уровни часто повышены в опухолевых тканях [261]. Это повышение может произойти из-за дисбаланса в синтезе и деградации ПА, который часто наблюдается в опухолевых тканях по сравнению с нормальными тканями. Экспрессия ферментов, ответственных за биосинтез ПА, а именно Sаденозилметиониндекарбоксилазы и/или орнитиндекарбоксилазы, повышается при раке желудка [262], раке молочной железы [263], нейробластоме [264,265], раке предстательной железы, лейкозах и других видах рака. Ингибирование этих ферментов приводило к сенсибилизации опухоли в отношении противоопухолевой

терапии [266,267] или к снижению агрессивности опухоли [268]. Путь деградации ПА включает различные ди- и полиами-ноксидазы [264,265], активности которых часто снижены в опухолевых тканях [269,270], в то время как катаболические продукты окисления ПА способны индуцировать апоптоз в нормальных и опухолевых клетках [271-274]. Таким образом, активация катаболического пути ПА, в первую очередь за счет прямого взаимодействия с ПА-оксидазами, может быть перспективной стратегией терапии рака [275-277].

Химические соединения, способные восстанавливать уровень катаболизма полиаминов в опухолях, могут стать потенциальными противоопухолевыми агентами. Поиск активаторов катаболизма полиаминов среди бициклононан-9-онов является перспективной стратегией разработки лекарственных средств. Целью исследования была оценка биологической активности производных 3,7диазабицикло [3.3.1]нонан-9-он на предмет антипролиферативных свойств за счет ускорения катаболизма полиаминов. Оценивали цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам HepG2 и нормальным клеткам WI38. Был исследован возможный механизм индуцированной гибели клеток. Оценивали влияние полиаминов на цитотоксичность наиболее активных соединений.

Биспидины (диазабициклононаны), хорошо известные в медицинской химии, обладают широким спектром биологическлй активности. Они интенсивно изучаются в качестве противоопухолевых [278] или противовирусных [279] агентов, а также подходящих лигандов для радиофармацевтических препаратов [280] и тераностических препаратов [281]. Наше предыдущее исследование показало, что производные бициклононана являются одними из наиболее мощных активаторов катаболического пути ПА [282]. В настоящем исследовании мы протестировали набор из ранее описанных производных диазабициклононан-9-он [283] и новых синтезированных производных диазабициклононан-9-он [283] и новых синтезированых производных диазабициклононан-9-он на предмет их способности активировать путь распада ПА и вызывать гибель опухолевых клеток посредством этой активации. Мы обнаружили ПА-зависимое усиление цитотоксичности некоторых соединений.

В рамках данного исследования было синтезировано восемь производных биспидина, у которых протестирована способность активировать окисление ПА в лизатах регенерирующей печени крыс.



Рисунок 15.1 – Влияние испытуемых субстанций на скорость окисления полиаминов

Тестируемые соединения производных биспидина включает в себя 3 потенциальные пары «лекарственное средство-пролекарство»: 4а/7а, 4b/7b и 4c/7c. Пары 4а/7а и 4с/7с содержат гидрофобный фрагмент в N3, в то время как пара 4b/7b концевую ОН-группу в N3, которая обеспечивает содержит некоторую гидрофильность этому фрагменту. Общая тенденция к окислению различных ПА на фоне действия соединений заключается в следующем: только пары 4b/7b продемонстрировали истинную лекарственно-пролекарственную активность, поскольку ускоряющий эффект на катаболизм ПА был значительно снижен после введения бен-зоилоксимной группы. Соединения 7а и 7с, напротив, были более активными, чем их партнеры 4а и 4а соответственно, не содержащие бензоилоксима, что демонстрирует, что бензоилоксим-фрагмент может усиливать активирующее действие этих диазабициклононанов в отношении окисления ПА. Оба соединения 4d и 4е не содержат бензоилоксимной группы, но отличаются боковым радикалом в положении N3, а именно, 4d содержит арильную часть, в то время как 4е содержит алифатический гетероцикл. Сравнение этих двух соединений показывает, что ароматический радикал придает молекуле более сильные активирующие катаболизм ПА свойства, поскольку окисление ПА становится в 3-5 раз выше под действием 4d, чем у 4e. Таким образом, 4d становится лидером среди всех протестированных соединений в отношении активации окисления спермина.

Чтобы проверить цитотоксическую активность соединений, клетки фибробласты карциномы печени человека HepG2 И нормальные WI-38 присутствии различных концентраций культивировали синтезированных В соединений, а жизнеспособность клеток и индукцию апоптоза измеряли после 72 ч

инкубации. В таблице 15.1.1.1 представлены значения IC50 для выбранных клеточных линий.

Клеточная	Вещество								
линия	4a	4b	4c	4d	4e	7a	7b	7c	Цисплатин
HepG2	16.0	12.7	9.3	12.5	3.5	15.6	11.1	6.6	15.9 *
WI-38	13.1	10.1	13.8	4.6	5.1	24.3	5.0	6.6	18.5 **
8	P	~			0) (777	

Таблица 15.1 – Значения IC50 мкм для опухолевых и нормальных клеточных линий

Примечание – Результаты были представлены как 8 разных значений МТТ тестов

Погрешности находились в пределе +/-5% от предоставленных значений. Литературные данные: * [284], ** [285].

Три соединения (4с, 4е, 7а) продемонстрировали селективность в отношении опухолевых клеток HepG2 (рис. 15.1 A) со значительно меньшей цитотоксичностью и более высоким IC50 по отношению к нормальным клеткам (рис. 15.1 В). Соединение 4е было наиболее активным и могло индуцировать градирующуюся гибель клеток HepG2 в диапазоне концентраций 3-9 мкм. Почти все клетки погибли после инкубации при более высоких концентрациях. Соединение 7а было менее активным и могло индуцировать градирующуюся гибель клеток при концентрациях 7-25 мкм. Соединение 4с проявляло умеренную активность и градированно клеток при концентрациях 3-25 7a подавляло рост МКМ. Соединение продемонстрировало способность стимулировать рост нормальных фибробластов WI-38 при низких концентрациях 1-9 мкм и поэтому было исключено из дальнейших исследований.

Чтобы исследовать тип клеточной гибели, клетки инкубировали с 25 мкм 4с или 4e, а индукцию апоптоза оценивали путем мечения фосфатидилсерина клеточной мембраны аннексином V-FITC, а клеточной ДНК пропидия иодидом в сочетании с проточной цитометрией. Результаты оценки апоптоза хорошо согласуются с результатами МТТ-теста. Оба соединения индуцировали апоптоз более эффективно в опухолевых клетках HepG2, чем в нормальных клетках WI-38: 56% и 20% клеток оставались живыми после инкубации с 4с или 4е соответственно. Тестируемое соединение 4с не индуцировало апоптоз в нормальных фибробластах при концентрации 25 мкм, тогда как клетки были более чувствительны к 4e. Таким образом, 4е продемонстрировал цитотоксичность как против нормальных, так и против опухолевых клеток. Взятые вместе, результаты демонстрируют, что
производные биспидина 4с и 4е обладают сильной цитотоксической активностью и могут индуцировать апоптоз в опухолевых клетках, в то время как нормальные клетки менее чувствительны к их действию.

могут рассматриваться Отобранные соединения перспективные как кандидаты фармакологических исследований. При для последующих результатах исследований возможна комбинация положительных ИХ с фосфолипидными наночастицами для повышения биодоступности и снижения токсичности для нормальных клеток.

При проведении химиотерапевтического лечения актуальным остается поиск соединений, обладающих избирательной цитопротекторной активностью в отношении нормальных клеток, при этом не снижающих цитотоксическое действие на раковые клетки. В качестве кандидатных соединений нами выбраны полиамины и исследовано их влияние на альтернативный сплайсинг пре-мРНК RAD51A в нормальных CD4+ Т-лимфоцитах человека.

15.1.2. Цитопротекторная активность полиаминов при проведении химиотерапии

В настоящем исследовании показано, что полиамины [286] могут уменьшать повреждение ДНК и способствовать выживанию клеток путем значительного снижения количества клеток повреждениями ДНК, индуцированными С доксорубицином, цисплатином или иринотеканом. Результаты данного исследования позволяют предположить, что цитопротекторная активность полиаминов связана с альтернативным сплайсингом пре-мРНК RAD51A в CD4+ Т-лимфоцитах чувствительности нормальных человека. Разница в нормальных и раковых клеток к полиаминам может стать основой для использования этих соединений для защиты нормальных лимфоцитов во время курса химиотерапии.

Исследовано цитопротекторное действие трех полиаминов: спермина (Спм), спермидина (Спд) и путресцина (Пут). Инкубация раковых клеток с ДНК-повреждающими агентами приводила к значительному ингибированию их метаболической активности/роста до 32,4 – 68,3% от контрольных клеток, а добавление каждого ПА не защищало клетки от повреждения. CD4+ T-клетки были более чувствительны к повреждению ДНК, и только 3,1 – 20,9% клеток оставались

живыми после инкубации с генотоксическими агентами. Однако предварительная обработка CD4+ Т-клеток ПА приводила к значительной индукции метаболической активности/роста клеток до 55,3 – 122,6% от контрольных необработанных клеток. Результаты показали, что каждый полиамин обладает цитопротекторным действием на нормальные, но не раковые клетки. Самым простым полиамином является путресцин, который происходит из орнитина и может быть последовательно преобразован как в спермидин, так и в спермин [287]. Поэтому все последующие эксперименты проводились с путресцином в качестве цитопротекторного агента.

В данном исследовании впервые продемонстрирована связь между ПА, альтернативным сплайсингом пре-мРНК RAD51A и защитой клеток от гибели в результате повреждения ДНК. ПА смогли защитить нормальные активированные CD4+ Т-лимфоциты от действия доксорубицина, циспластина или иринотекана, но не раковые клеточные линии Jurkat или К562. Эти цитотоксические соединения являются широко используемыми противораковыми препаратами в химиотерапии, нацеленными на репликацию ДНК, и способны вызывать двойное повреждение ДНК по различным механизмам [288-293]. Нормальные CD4+ Т-клетки были более чувствительны к цитотоксическим соединениям, чем раковые клетки, что было продемонстрировано с помощью МТТ-теста, TUNEL-анализа и измерения количества живых, апоптотических и мертвых клеток с помощью метода проточной цитометрии. Однако предварительная обработка лимфоцитов каждым ПА приводила к значительному снижению клеток с повреждениями ДНК, что повышало их выживаемость и жизнеспособность. Все три ПА не показали такого эффекта на раковых клетках Jurkat и K562 и не смогли снизить скорость повреждения ДНК или увеличить жизнеспособность клеток. Способность ПА снижать окислительный стресс и повреждение ДНК достаточно хорошо изучена, однако точные механизмы защиты ДНК с помощью ПА еще предстоит выяснить. Одним из первых открытий в области взаимодействия ПА с ДНК было наблюдение, что ПА могут стабилизировать двухцепочечную ДНК за счет нейтрализации заряда и посредством связывания с основными или минорными бороздками. Другие исследователи непосредственно изучали влияние взаимодействий ПА-ДНК на целостность двойной нити со стороны структурных особенностей. Позже было описано стимулирование гомологически-направленной репарации ДНК с помощью ПА за

счет активации RAD51. Наша нынешняя работа относится к последнему типу, где мы показали индукцию экспрессии RAD51A в ответ на повреждение ДНК в раковых и нормальных клетках (рисунок 15.2).



Рисунок 15.2- Индуцированная экспрессия RAD51A в клетках, обработанных цисплатином (Цис)

Уровни мРНК представителей RAD51 измерены методом ПЦР-РВ в линиях раковых клеток (A) Jurkat, (Б) К562 или (В) нормальных CD4+ Т лимфоцитов, предварительно обработанных путресцином и инкубированных с циспластином. Уровни мРНК были нормализованы относительно экспрессии эталонного гена 18S. (Г, Д, Е) Вестерн-блоттинг для белка RAD51 и эталонного белка GAPDH в обработанных клетках. (Ж) Результаты количественного определения белка RAD51 относительно GAPDH. N = 4. *p ≤ 0,05 по сравнению с контрольными интактными необработанными клетками.

Мы показали, что ПА могут индуцировать альтернативный сплайсинг премРНК RAD51A только в нормальных CD4+ Т-клетках. Наши результаты подтверждают невозможность усеченных вариантов сплайсинга RAD51A способствовать гомологической рекомбинации и уменьшать повреждения ДНК, так как Пут индуцировал преобладание варианта FL и предотвращал гибель нормальных CD4+ Т-клеток. Хотя вопросы о том, почему ПА не индуцировали альтернативный сплайсинг RAD51A в раковых клетках и механизм его индукции ПА, еще предстоит изучить, мы продемонстрировали участие альтернативного сплайсинга пре-мРНК RAD51A в защите клеток от повреждения ДНК. Результаты данной работы позволяют предположить, что цитопротекторные свойства ПА связаны с альтернативным сплайсингом пре-мРНК RAD51A в нормальных CD4+ Т-лимфоцитах человека, но не в раковых клетках. Разница в чувствительности нормальных и раковых клеток к ПА может стать основой для использования этих соединений с целью защиты нормальных лимфоцитов во время химиотерапии лимфобластного лейкоза.

В настоящее время в клинической гематологии для лечения лимфобластных лейкозов применяются L-аспарагиназы, которые представляют собой семейство ферментов, катализирующих гидролиз L-аспарагина до L-аспарагиновой кислоты и аммиака. Однако их медицинское применение ограничено побочными эффектами, связанными со способностью этих ферментов гидролизовать L-глутамин, а также развитием иммунных реакций. Для решения этих проблем применяются методы редактирования генов для введения аминокислотных замен фермента. Ниже представлены результаты исследования механизма действия ферментов с целью оптимизации их противоопухолевой активности.

15.1.3. Молекулярный анализ L-аспарагиназ для выяснения механизма действия и оптимизации фармакологических функций

Уже более 50 лет в клинической медицине применяют препараты с ферментативной активностью. Заместительная терапия панкреатической недостаточности, ускорение заживления ран или тромболитическая терапия являются одними из наиболее успешных направлений применения ферментных препаратов [294]. Ферменты, которые необратимо разрушают некоторые жизненно важные аминокислоты, разрабатываются как противоопухолевые терапевтические средства [295]. Первым бактериальным ферментом, введенным в рутинную L-аспарагиназа (L-ASNase, Lклиническую практику, была аспарагинамидогидролаза (КФ 3.5.1.1) [296]. В настоящее время нативная Lаспарагиназа из Escherichia coli (EcA) или Dickeya didantii (ранее известная как Erwinia chrysanthemi) (ErA) вместе с пегилированной формой аспарагиназы E. coli

успешно используется для лечения больных острым лимфобластным лейкозом [294-300]. Нормальные и опухолевые клетки нуждаются в L-аспарагине для своих метаболических потребностей. Нормальные клетки могут синтезировать Lаспарагин для своего роста с помощью аспарагинсинтетазы. Неопластические клетки не способны синтезировать аспарагин из-за отсутствия или дефицита Lаспарагинсинтетазы и зависят от экзогенного поступления этой аминокислоты из кровотока [301]. Противораковое действие L-аспарагиназы основано на ее способности гидролизовать L-аспарагин до L-аспартата и аммиака. Воздействие Lаспарагиназы на опухолевые клетки, преимущественно лейкемические, приводит к нарушению синтеза белка, голоданию раковых клеток, что приводит к их гибели [302]. L-аспарагиназы были идентифицированы у млекопитающих, птиц, растений, грибов и широкого круга бактерий [303,304]. К настоящему времени выявлены десятки микробных источников L-аспарагиназ, хотя не все из них проявляли цитотоксичность в отношении лейкемических клеток или ингибирующее действие на опухоли [294,304].

L-аспарагиназы исторически подразделяются на три семейства: тип растений, тип Rhizobium etili и тип бактерий. Все бактериальные L-аспарагиназы можно разделить на два типа в зависимости от их индуцибельности, клеточной локализации, сродства к субстрату и четвертичной структуры [305]. L-аспарагиназы Ι представляют собой конститутивно экспрессируемые типа ферменты, локализованные в цитоплазме, и имеют относительно высокую Кт для Lаспарагина. L-аспарагиназы Bacillus subtilis [306], Pyrococcus horikoshii [307] и Acinetobacter soli [308] являются наиболее изученными примерами ферментов I типа, которые показали относительно низкое сродство к L-аспарагину, что привело нетерапевтическому применению. Бактериальные L-аспарагиназы II типа К представляют собой периплазматические ферменты с индуцированной экспрессией во время анаэробиоза, которые обладают высоким сродством к L-аспарагину и широкой субстратной специфичностью, что приводит к мощной противоопухолевой активности [309].

Терапевтическое использование L-аспарагиназ ограничено множеством побочных эффектов: гепато- и нефротоксичностью, дисфункциями центральной нервной системы, панкреатитом, тромбоэмболией, мукозитом, гипергликемией,

дислипидемией [310-312]. Кроме того, генотоксическая активность была показана для L-аспарагиназы, продуцируемой Streptomyces ansochromogenes [313]. Считается, что такие побочные эффекты связаны с неспецифическим действием этих ферментов. В дополнение к хорошо изученным антипролиферативным эффектам Lаспарагиназ, которые, как полагают, вызваны депривацией Lacnaparuna в среде опухолевых клеток, также было предложено несколько альтернативных механизмов. Другие субстраты L-аспарагиназ включают L-глутамин, D-аспарагин, моноамид янтарной кислоты и аспарагинил-тРНК [314,315]. Таким образом, вследствие их деградации могут появиться антипролиферативные или побочные эффекты. Показано, что L-аспарагиназа из E. coli может высвобождать углеводы из α2-HSгликопротеина фетуина, предполагая, что гидролиз гликопротеинов клеточных мембран и ингибирование их синтеза ферментом может приводить к лизису клеток [316]. Этот фермент также может ингибировать биосинтез гликопротеина и приводить к чувствительности мембран из-за специфического действия на рецептор конканавалина А в чувствительной и резистентной клеточной линии мышиной лимфомы L5178Y [317]. Очень неожиданный цитотоксический аспарагиннезависимый механизм был описан для мутантной L-аспарагиназы Rhodospirillum rubrum (RrA). RrA продемонстрировал регуляторную способность и мог подавлять активность теломеразы в нескольких линиях раковых клеток человека, нормальных активированных CD4+ Т-лимфоцитах и ксенотрансплантатах солидных опухолей человека [318,319]. Эти наблюдения указывают на существование сложных механизмов действия по крайней мере одной L-аспарагиназы на данную клеточную линию.

Теоретические исследования и практический опыт позволили прогнозировать наиболее значимые аминокислотные остатки в каталитическом процессе и получать ферменты с улучшенными свойствами. Доказано, что методы редактирования генов позволяют минимизировать иммуногенность ферментов, улучшить их субстратную специфичность или ввести новые сайты связывания, ответственные за определенные дополнительные функции, некоторые из которых могут быть полезными. для больных раком. Отсутствие аспарагинсинтетазы в некоторых клетках рака поджелудочной железы или молочной железы наряду с увеличенным периодом полувыведения и улучшенными фармакологическими свойствами новых

аспарагиназ открывают возможность расширить терапевтический потенциал новых ферментов и использовать их для лечения солидных раков.

15.1.4. Нестероидные противовоспалительные активные компоненты

Нестероидные противовоспалительные препараты являются наиболее распространенным средством лечения хронических воспалительных заболеваний. Одним из наиболее часто используемых в данном классе лекарств является лействия которого ингибировании индометацин, механизм основан на циклооксигеназы-2 фермента, вовлечённого образование в противовоспалительного простагландина PGE2. Однако лечение индометацином часто приводит к проявлению определенных побочных эффектов, включая желудочно-кишечные сердечно-сосудистые И нарушения. Следовательно, существует необходимость в разработке более совершенных способов доставки таких лекарств в организм, в том числе с использованием наночастиц [320]. Снабжение лекарственных соединений системами транспорта позволяет снизить побочные действия: уменьшить токсичность и повысить биодоступность субстанций, особенно плохо растворимых в воде, увеличить скорость перехода через естественные барьеры (мембраны клеток, гематоэнцефалический барьер и др.), а также сорбцию или метаболизм в организме [321-323]. Большое внимание исследователей уделяется разработке наносистем для индометацина из различных полимеров И наноматериалов (поли-глицероладипат, Eudragit L100, поликапролактон, хитозана, декстрана), наночастиц с заданной растворимостью в зависимости от pH среды [324-329]. Следует отметить, что основным недостатком указанных разрабатываемых систем является относительно крупный размер частиц (200-400 нм), что делает их доступными для лизиса ретикулоэндотелиальной В системой клетки. итоге существенно снижается эффективность транспортируемого лекарственного препарата. Известно, что за счет использования транспортных систем можно изменять фармакокинетику переносимых ими лекарственных веществ, оптимизируя процессы абсорбции, распределения в тканях, метаболизма и элиминации [330,331]. Вне зависимости от пути поступления лекарства в организм, значительное влияние на эффективность действия оказывает размер транспортирующих частиц – показано, что размер более влияет на фармакокинетику, чем другие свойства, например, поверхностный заряд [332]. Еще

одним свойством транспортных систем является их способность предохранять лекарственное соединения от преждевременной деградации, увеличивая тем самым время циркуляции вещества в кровотоке и увеличение биодоступности [333].

Разработанная в ИБМХ лекарственная композиция на основе растительного фосфатидилхолина противовоспалительной лекарственной субстанции И индометацина имеет размер частиц менее 50 нм [334]. После перорального введения ее крысам было продемонстрировано увеличение биодоступности индометацина по сравнению со свободной субстанцией более чем в 2 раза. На двух моделях воспаления (адъювантный артрит у крыс и индуцированный конконавалином А отёк V мышей) была показана повышенная противовоспалительная активность индометацина, включённого в фосфолипидные наночастицы, по сравнению с его свободной формой [321; 335]. Таким образом, показано, что фосфолипидная транспортная наносистема способна изменять не только фармакокинетику вещества, но также его физическо-химические характеристики, например, растворимость.

Следует отметить, что изучение морфологии фосфолипидных наночастиц, нагруженных лекарственной субстанцией и используемых как транспортная система, ранее не проводилось. Подобные эксперименты возможны благодаря использованию метода малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН). Ранее в институте ядерных исследований (Дубна) с использованием методов МУРН и малоуглового рассеяния рентгеновского синхротронного излучения проводилось исследование полидисперсной популяции везикул димиристоил-фосфатидилхолина в водном растворе сахарозы [336]. Целью данной работы было изучение физикохимических свойств и морфологии фосфолипидной композиции индометацина.

Разработанная фосфолипидная эмульсия с индометацином должна соответствовать определенным показателям, предъявляемым как до, так и после лиофилизации, поэтому на первом этапе изучали ее характеристику с точки зрения физико-химических параметров. После лиофилизации композиция индометацина (далее – индолип) представляла собой лиофильно-высушенную в мальтозной матрице субстанцию, легко растворимую в воде. Согласно данным анализа, в коллоидном растворе, получаемом после растворения, фосфолипидные наночастицы со встроенным индометацином имели средний размер 21,9 ± 0,9 нм. Из типичной спектрограммы измерения, представленной на рисунке 15.3, следует, что

95,6 % объёма, занимаемого всеми частицами в растворе, приходилось на частицы размером 20,99 нм. Это означает, что фосфолипидная композиция представляла собой высокогомогенную систему, поэтому распределение включенной субстанции в ней должно было быть равномерным.



Рисунок 15.3 — Спектрограмма динамического рассеяния света, характеризующая полидисперсное распределение размеров частиц по объёму в лиофильно высушенном образце фосфолипидных наночастиц с индометацином в качестве активного компонента после восстановления водой

В таблице 15.2 представлены средние значения диаметра наночастиц (унимодальное распределение) основной фракции наночастиц и светопропускания до и после лиофилизации индолипа.

Исслениемий напомет	Индометацин в составе ф	осфолипидных наночастиц
исследуемый параметр	до лиофилизации	после лиофилизации
Диаметр фосфолипидных наночастиц, нм	$20,3 \pm 1,3$	$21,9 \pm 0,9$
Светопропускание (при 660 нм), %	73,7 ± 2,3	$65,0 \pm 2,2$

<u> Таблица 15.2 – Характеристика композиции индометацина до и после высушивания</u>

Как видно из таблицы, средний диаметр частиц до и после лиофилизации был

приблизительно одинаковым. Светопропускание (прозрачность) незначительно падало после лиофилизации, однако его значение оставалось выше 60%.

В результате определения ζ -потенциала восстановленной наноэмульсии было получено следующее его значение: $-12,9 \pm 0,6$ мВ. Его отрицательная величина свидетельствует об отрицательном заряде поверхности частиц, образующих наноэмульсию. Абсолютная величина ζ -потенциала указывает на недостаточную электростатическую стабилизацию наночастиц в растворе. Считается, что агрегация заряженных частиц наименее вероятна при | ζ | > 30 мВ [323]. Вместе с тем лиофильно высушенная форма позволяет хранить полученную композицию длительное время. При этом собственные исследования показывают, что после восстановления наноэмульсия сохраняет свои свойства в течение суток, и признаков агрегации частиц за это время не наблюдается.

Данные ВЭЖХ-анализа показали, что среднее содержание индометацина в образце составляло 2,4 ± 2 мг/мл. Содержание фосфатидилхолина, согласно данным ферментно-колориметрического анализа, составляло 24,5 ± 5 мг/мл. Таким образом, экспериментально подтверждалось массовое соотношение компонентов композиции фосфолипидов и индометацина 10:1.

Одним из критериев качества липосомальных препаратов является окисленность фосфолипидов, формирующих липидный бислой. Результаты проведенного спектрофотометрического исследования, вычисления индекса окисленности фосфолипидов в препарате до и после лифильного высушивания, а также содержание лизофосфатидилхолина (лизоФХ) представлены в таблице 15.3.

Таблица	15.3	—	Параметры	оценки	окисления	фосфолипидов	в	композициях
индомет	ацина	!						

Исследуемый параметр	Индометацин в сос	Исходный ФХ	
	нано	очастиц	
	до лиофилизации	после лиофилизации	
Индекс окисленности	$0,\!37\pm0,\!02$	$0,41 \pm 0,02$	0,20 ± 0,013
Перекисное число, мэкв/кг	$3,0 \pm 0,7$	$4,3 \pm 0,8$	0
Содержание лизоФХ, % от массы фосфолипидов	1,9 %	1,9 %	1,1-1,5 %

Как видно из таблицы 15.3, процесс лиофилизации не приводил к

достоверному увеличению окисленности фосфолипидов в исследуемых препаратах. Таким образом, полученные результаты свидетельствовали о стабильности фосфолипидных наночастиц в процессе лиофильного высушивания.

Изучение морфологии фосфолипидной композиции индометацина методом малоуглового рассеяния нейтронов

На следующем этапе особенно важным представлялось изучение морфологии лиофильно высушенной композиции индолипа после ее восстановления водой. На рисунке 15.4 А показаны экспериментальные кривые малоуглового рассеяния нейтронов от образцов с различной концентрацией индолипа в тяжелой воде. Анализ препарата на принадлежность его к мицеллам с помощью программы SasView показал, что экспериментальная кривая исследуемого препарата не может быть описана кривой малоуглового рассеяния от мицеллы (рисунок 15.4 Б).





Рисунок 15.4 — Экспериментальные кривые малоуглового рассеяния нейтронов от препарата индолип при различных концентрациях в тяжелой воде (А), от образца с концентрацией 5% и аппроксимирующая функция, описывающая мицеллу (Б)

Расчеты по определению модели фосфолипидной композиции индометацина показали, что для всех концентраций исследуемого препарата экспериментальный спектр хорошо описывался моделью полой сферы. Результаты расчетов представлены ниже на рисунке 15.5.



Рисунок 15.5 — Экспериментальная кривая рассеяния от образца индолипа с концентрацией 5% (А) и 10% (В) и аппроксимирующая функция, описывающая везикулы

На рисунке 15.6 представлен график экспериментальной кривой рассеяния от образцов с концентрацией фосфолипидной композиции индометацина 25%. Из рисунков 15.5 и 15.6 видно, что с увеличением концентрации исследуемого препарата в тяжелой воде, функция везикул описывала кривую хуже. Учет возникающего межвезикулярного взаимодействия по модели «жесткие сферы» не улучшал точность аппроксимации.



Рисунок 15.6 — Экспериментальная кривая малоуглового рассеяния нейтронов от образца с концентрацией индолипа 25% и две аппроксимирующие функции, которые описывают везикулы с учетом межвезикулярного взаимодействия (H) и без

Поскольку индолип разрабатывался как препарат для перорального введения, интересным было проведение исследований именно при температуре, близкой к температуре человеческого тела (37°С). Экспериментальная кривая рассеяния от образца с концентрацией 5% при температуре 20°С практически не отличалась от экспериментальной кривой рассеяния от образца с той же концентрацией, но при более высокой температуре (рисунок 15.7). В случае образца с концентрацией 25 % увеличение температуры так же не оказывало значительного влияния на кривые рассеяния.



ΑБ

Рисунок 15.7 — Экспериментальная кривая малоуглового рассеяния нейтронов от образца с концентрацией индолипа 5% (А) и 25% (Б) при температурах 20°С и 37°С и аппроксимирующие их функции, которые описывают везикулы

В таблице 15.4 представлены все полученные параметры исследуемых

образцов. Стоит отметить, что под радиусом имеется в виду внутренний радиус везикул. Полидисперсность радиуса описывалась функцией Шульца, а полидисперсность толщины липидного бислоя – функцией Гаусса, также во всех аппроксимациях учитывалась функция разрешения спектрометра.

Образец	5% индолипа		10%	25%	25% индолипа	
1	2	3	4	5	6	7
Температура образца	20°C	37°C	2	0°C	20°C	37°C
Структурный фактор	-	-	-	-	Hard sphere	-
Радиус везикулы, Å	166 ± 1	155 ±2	166±1	166 ± 1	163±2	164 ±1
Полидисперсность радиуса (распределение Щульца), %	27,6	30,0	28,0	29,0	29,0	30,0
Толщина липидного бислоя, Å	33,8 ±0.1	33,9 ±0.2	33,8 ±0.1	31,6± 0,1	31,5 ±0,1	31,4 ±0,1
Полидисперсность толщины липидного бислоя (распределение Гаусса),%	15	10	16	5	9	4
χ²	11,9	8,8	13,7	23,5	22,6	16,9

Таблица 15.4 – Параметры наночастиц индолипа при различных условиях

Таким образом, согласно полученным данным, индолип представлял собой везикулу, а не мицеллу. Установлено, что увеличение концентрации индолипа в тяжелой воде от 5% до 25% не разрушало его морфологию. В условиях физиологической температуры человека (37°C) при концентрации индолипа 25% в воде внутренний радиус везикулы составлял 164 \pm 1 Å, а толщина липидного бислоя была равна 31.4 \pm 0.1 Å. Радиус везикулы превышал значение толщины бислоя в пять раз.

Везикулярная система была стабильна при изменении концентрации и температуры. Отношение радиуса к толщине липидного бислоя близко к пяти. Концентрационная стабильность свидетельствовала о возможности исследования сильно разбавленных систем (при концентрациях индолипа в воде меньше, чем 5%). Следует отметить, что определение положения индометацина в липидном бислое с использованием применяемого однородного приближения для описания плотности

длины рассеяния нейтрона не представлялось возможным.

Лиофилизация фосфолипидной композиции индолипа не приводила к изменению ее физико-химических параметров (размер частиц, светопропускание), также не происходило достоверного увеличения окисленности фосфолипидов. Таким образом, в процессе лиофилизации свойства фосфолипидных наночастиц сохранялись и были аналогичны свойствам препарата до лиофилизации.

15.1.5. Противовирусные активные компоненты

Несмотря на успехи современной медицины, острые респираторные вирусные инфекцией, в том числе, грипп и коронавирусная инфекция, сохраняют первенство по суммарной продолжительности больничных листов, госпитализации и смертельным исходам. По оценкам, ежегодно во всем мире происходит 1 миллиард случаев заболевания гриппом, из которых от 3 до 5 миллионов представляют собой случаи тяжелой формы заболевания, а от 290 000 до 650 000 случаев заканчиваются смертью пациентов от обусловленных гриппом респираторных заболеваний [337-339].

В дополнение к вакцинации как основного средства борьбы с гриппозной инфекцией Всемирной Организацией Здравоохранения рекомендовано также применение противогриппозных препаратов, среди которых ведущую роль занимают этиотропные препараты. В России широкое распространение получил оригинальный отечественный препарат умифеновир, МНН. Умифеновир обладает широким спектром действия, и эффективен не только в отношении вируса гриппа А и В, но и также в отношении целого ряда возбудителей ОРВИ. С использованием вирусологических, молекулярно-биологических и генетических методов было показано, что мишенью действия оригинального отечественного противовирусного препарата умифеновир в цикле вирусной репродукции является поверхностный белок вируса гриппа НА (гемагглютинин), который играет ведущую роль в осуществлении слияния липидной оболочки вируса с мембранами эндосом при проникновении вируса в клетки [340]. Структурная основа механизма действия умифеновира выяснена американсками учеными И. Уилсон и Р. Кадам, которые показали, что умифеновир связывается с расщелиной в кармане молекулы НА и эта связь так изменяет пространственную структуру молекулы НА, что не позволяет молекуле НА выполнять свои функции для проникновения вируса внутрь клетки

[341]. Опыт успешного использования препарата в России, на территории стран СНГ, совокупность экспериментальных и клинических исследований, усилия компании привели к тому, что ВОЗ присвоила умифеновиру международный код как противовирусному препарату прямого действия (J05A – Direct acting antivirals). К факторам, ограничивающим использование этого препарата являются его свойства, связанные с растворимостью и биодоступностью умифеновира, что определяет неудобные для пациента схемы лечения, отсутствие или несовершенство ряда лекарственных форм, в частности для лечения тяжелых случаев гриппозной инфекции.

В этой связи актуальна разработка лекарственной композиции, состоящей из фосфолипидных наночастиц с включенным активным компонентом. На данном этапе проведена наработка препарата под рабочим наименованием Фосфофеновир (Акт наработки представлен в Приложении Г.7). Проведен пилотный эксперимент, показана in vitro фармакологическая активность разработанной композиции в отношении вируса гриппа A и вируса гриппа B и коронавируса. В сравнении со свободной формой умифеновира, разработанная композиция обладает значительно меньшей цитотоксичностью (45 мкг/мл против 80 мкг/мл). Фосфофеновир обладает противовирусной активность в отношении коронавируса SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero CCL81, его активность сходна с активностью умифеновира, однако индекс селективности значительно выше, что является важным его преимуществом как противовирусного препарата.

В соответствии с требованиями к организации и проведению доклинических исследований [342], на данном этапе проведены исследования мутагенности разработанной композиции с применением метода учета хромосомных аберраций или микроядер в клетках костного мозга млекопитающих и учета генных мутаций с использованием в качестве тест-объекта микроорганизмов.

15.2. Оценка безопасности (мутагенных свойств) наноразмерных частиц для доставки лекарств со встроенным активным компонентом

В рамках договора от 02.11.2022 г. №114/223 с Первым Московским государственным медицинским университетом имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) проведены

доклинические исследования мутагенности наноразмерных частиц со встроенным противовирусным компонентом.

Исследование выполнялось согласно Решению Совета ЕЭК №81 от 03.11.16 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств», U.S. FDA Good Laboratory Practice (GLP) Regulations for Non-clinical Laboratory Studies (21 CFR Part 58).

Исследование выполнялось согласно OECD Principles on Good Laboratory Practice (ENV/MC/CHEM (98) 17).

Проверка мутагенной активности исследуемого в тесте Эймса препарата показал, что раствор метилфенилтиометил-диметиламинометилгидроксиброминдол карбоновой кислоты этиловый эфир (МНН умифеновир, субстанция-порошок для производства нестерильных лекарственных форм, серия О-060920) в диапазоне концентраций от 0,01 мг/мл до 0,001 мкг/мл мутагенной активностью не обладает.

При микроскопическом анализе цитологических препаратов не было выявлено увеличения количества клеток с хромосомными аберрациями в костном мозге подопытных мышей. Показатель количества аберраций на 1 клетку также не отличался от уровня негативного контроля. Во всех изученных дозах препарат Фармкомпозиция в форме саше 2,5 г. (фосфолипидные наночастицы со встроенным активным компонентом противовирусного действия, серия 0322) не оказывал мутагенного действия на соматические клетки подопытных мышей.

Цель исследования:

Доклиническое исследование возможных мутагенных свойств Фармкомпозиции в форме саше 2,5 г. (фосфолипидные наночастицы со встроенным активным компонентом противовирусного действия, серия 0322) и препарата сравнения метилфенилтиометил-диметиламинометил-гидроксиброминдол карбоновой кислоты этиловый эфир (МНН умифеновир), субстанция-порошок для производства нестерильных лекарственных форм (серия: О-060920, годен до 09.2023).

Задачи исследования:

1. Исследование мутагенных свойств в тесте «Учет хромосомных аберраций при многократном введении»;

2. Исследование мутагенных свойств в тесте Эймса.

Комиссия по биоэтике, состоявшаяся 04.11.2022, подтвердила необходимость проведения исследования мутагенности на мышах. Общее количество животных – 40 мышей. Комиссия по биоэтике гарантирует использование животных в научных целях в соответствии с общепризнанными научными, этическими и юридическими нормами и подтверждает ответственность исследователей, деятельность которых подлежит контролю со стороны комиссии по биоэтике.

Данные об исследуемом веществе

Исследуемый препарат

Название: Фармкомпозиция в форме саше 2,5 г. (фосфолипидные наночастицы со встроенным активным компонентом противовирусного действия)

Серия: 0322

Состав: фосфолипиды – 500 мг, Метилфенилтиометил-диметиламинометилгидроксиброминдол карбоновой кислоты этиловый эфир (МНН умифеновир) – 50 мг, вспомогательное вещество мальтоза – 1950 мг.

Препарат сравнения

Название: Метилфенилтиометил-диметиламинометил-гидроксиброминдол карбоновой кислоты этиловый эфир (МНН умифеновир)

Производитель: ООО «НПФ «КЕМ»

Серия: О-060920

Годен до: 09.2023

Лекарственная форма: субстанция-порошок для производства нестерильных лекарственных форм.

Тест-система

Вид, количество, пол, возраст животных

В исследовании было использовано 40 мышей линии C57Bl/6 (20 самок и 20 самцов), массой 18-20 грамм, возрастом 6-8 недель.

Обоснование выбора вида животных

Мыши линии C57B1/6 являются релевантным видом для исследования мутагенности, рекомендованы Руководством по проведению доклинических

исследований лекарственных средств (под ред. Миронова А.Н., М., ФГБУ «НЦЭМСП» – 2012 г., в 2-х томах), Москва 2012. Использование данного вида животных обязательно для получения объективных данных по безопасности оригинального иммунобиологического лекарственного препарата на этапах получения разрешений на клинические исследования и государственной регистрации препарата.

Источник получения животных:

Филиал «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Карантин/Акклиматизация:

Животных содержали в карантине 7 суток, в соответствии с СОП Ц ДКИ-045-

3.

Условия содержания животных:

Во время эксперимента животных содержали в контролируемых условиях:

температура окружающего воздуха 20-24 оС;

относительная влажность 45-65 %;

смена светового периода (08:00-20:00 – день, 20:00-08:00 – ночь);

Санитарные мероприятия будут проведены в соответствии с СОП Ц-ДКИ-056-3, СОП Ц-ДКИ-031-3.

Подстил

В качестве подстила были использованы опилки мягких нехвойных пород древесины (ООО «Лабораторкорм», Россия).

Корм и вода

Пищевой рацион состоял из полнорационного гранулированного комбикорма для лабораторных животных (производства ООО «Провими») (произведенный по ГОСТ 34566-2019 Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия – ГОСТ от 23 августа 2019 г.). Животные получали воду из центрального водопровода (соответствующую СанПиН 2.1.3684-21) и имели свободный доступ к корму и воде.

15.2.1. Дизайн исследования

Тест Эймса

Изучение мутагенных свойств препарата в чашечном тесте Эймса было проведено с использованием тестерных штаммов Salmonella typhimurium TA 97,

ТА98, ТА100, полученных из Петергофской генетической коллекции штаммов микроорганизмов (ПГК) Санкт-Петербургского Государственного Университета. О наличии мутагенного действия препарата судили по возрастанию частоты реверсий к прототрофности по гистидину у индикаторных штаммов.

Оценка мутагенной активности изучаемого препарата была проведена методом учета способности соединения индуцировать генные мутации у индикаторных микроорганизмов в системе метаболической активации in vitro. Использован чашечный метод учета мутаций, предложенный в работе Ames et al 1972 [343] с модификациями.

Штамм TA97 несет мутацию hisD6610 – мутация сдвига рамки считывания типа +1. Штамм TA98 несет мутацию hisD3052 – мутация сдвига рамки считывания типа -1. В качестве положительного контроля в эксперименте без метаболической активации применяли мутагенное вещество 2-нитрофлюорен, в эксперименте с метаболической активацией мутагенное вещество 2-аминоантрацен.

Штамм TA100 несет мутацию hisG46 – миссенс-мутация, ревертирующая под действием мутагенов, которые индуцируют замены пар оснований. В качестве положительного контроля в эксперименте со штаммом TA100 без метаболической активации применяли азид натрия, в эксперименте с метаболической активацией 2аминоантрацен.

Перед работой штаммы проверены на ауксотрофность по гистидину, наличие плазмиды pKM101 и наличие мутации rfa.

Произведено определение рабочей концентрации вещества на основе оценки токсического эффекта на бактериальные клетки штамма TA100 Salmonella typhimurium. Изучаемое вещество растворяли в ДМСО в следующих концентрациях: 100 мг/мл, 1 мг/мл, 0,01 мг/мл, 0,0001 мг/мл, 0 мг/мл. Далее к 3 мл полужидкого агара, содержащего гистидин в концентрации 50 мг/мл, приливали 100 мкл суспензии ночной культуры бактерий, разведенной в 106 раз, затем в пробирку добавляли 100 мкл раствора тестируемого препарата. Для каждой из используемых концентраций вещества использовали три повторности. Содержимое пробирки перемешивали и равномерно распределяли по поверхности нижнего агара (среда VB) в чашке Петри. Через 120 часов инкубации при 37°С производили учет числа бактериальных колоний (таблица 15.5).

15.5 Влияние Таблица _ метилфенилтиометил-диметиламинометилгидроксиброминдол карбоновой кислоты этиловый эфир (субстанция-порошок для нестерильных лекарственных форм, серия *O-060920*) производства на выживаемость бактериальных клеток. Выживаемость определяли в процентах на основе данных о среднем количестве колоний на чашку ± стандартная ошибка среднего

Количество вещества на чашку Петри, мг	Среднее число колоний на чашку*	Выживаемость	Примечания
0	137±2,6	100,0 %	
0,00001	105±17,5	76,6%	
0,001	70,0±14,2	51,0 %	
0,1	3,7±3,2	2,7 %	
10	0		Наблюдали белый осадок на чашках Петри

* Данные представлены как среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего.

Исследуемое вещество в концентрациях 100 мг/мл (10 мг на чашку Петри) и 1 мг/мл (0,1 мг на чашку Петри) вызывало сильный токсический эффект и угнетало рост бактериальных колоний. Таким образом, в качестве рабочей выбрана сублетальная концентрация вещества 0,01 мг/мл (0,001 мг на чашку Петри).

15.2.2. Постановка теста Эймса

Изучаемый препарат растворяли в ДМСО для получения серии разведений 1 (0,01 мг/мл); 1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000. Селективный полуобогащенный верхний агар в пробирках в объеме 3 мл плавили в микроволновой печи, охлаждали в термостатируемой водяной бане до температуры 44-45°С. В пробирки с агаром вносили изучаемые растворы препарата в объеме 100 мкл, 100 мкл суспензии ночной культуры бактерий, 500 мкл микросомальной фракции S9 печени крысы и кофакторы, либо 500 мкл фосфатного буфера в эксперименте без активации. Для каждого разведения изучаемого препарата проводили опыт как с микросомальной активирующей смесью, так и без нее- на каждую дозу препарата делали 3 повторности с фракцией S9 и 3 повторности без фракции S9.

Перечисленные выше смеси перемешивали с помощью аппарата Vortex и тут же наносили на слой минимального нижнего агара на чашках Петри. После полного застывания агара чашки инкубировали в термостате при 37°С.

Через 120 часов инкубации при 37°С производили учет числа прототрофных

по гистидину ревертантов.

Реактивы для проведения теста приведены в Таблице 15.6

(нижний агар)						
Количество на 1 л						
850 мл						
15 г						
20 мл						
40 мл						
Довести до 1 литра						
Количество на 1 л						
650 мл						
10 г						
500 г						
175 г						
100 г						
Довести до 1 литра						
и биотина (верхний агар)						
Количество на 1 л						
850 мл						
6 г						
9 г						
100 мл						
Довести до 1 литра						
Количество на 1 мл						
0,5 мл						
3,3 мг						
1,5 мг						
16,6 мкл						
8,5 мкл						
100 мкл						
374,9 мкл						
1 7,4) ,2 M)						
2. 9,5 мл NaH2PO4 (0,2 M)						

Мутагены: 2-нитрофлуорен (производства Sigma Aldrich арт. N16754), 2-аминоантрацен (производства Sigma Aldrich арт. A38800), азид натрия (расфасован Хеликон арт. Am-0639)

15.2.3. Учет хромосомных аберраций

В эксперименте по определению мутагенности исследуемого препарата были использованы мыши линии C57Bl/6 обоего пола. После прохождения 7 суток карантина, каждому животному был присвоен индивидуальный номер в соответствующей клетке (от 1 до 5), и нанесена красящая метка в соответствии с СОП Ц-ДКИ-017-3. На этикетке клетки указывали следующую информацию: код эксперимента, вид, линию, пол животных, даты начала и окончания эксперимента, ФИО руководителя исследования.

Животных распределяли по группам случайным образом, используя в качестве критерия массу тела, так, чтобы индивидуальная масса животных не отличалась более чем на 10 % от средней массы тела животных в одной группе (таблица 15.7).

Путь введения	Доза, мг/кг	Объем, мл/жив.	Препарат	Количество животных	Код группы	Режим введения, манипуляции		
	5	0,2	Исследуемый	5∂+5♀	077-185			
п/о	50	2,0 препарат		5∂+5♀	077-295	Многократное введени в течение 5 суток, фиксацию клеточного		
	-	2,0	Плацебо	5♂+5♀	077-305	материала через 6 часов после последнего введения		
в/б	20	2,0	Циклофосфамид	5♂+5♀	077-415			

Таблица 15.7 – Распределение животных по группам, описание манипуляций

Исследуемый препарат, плацебо и циклофосфамид вводили перорально в течение 5 суток. Генетический материал забирался спустя 24 часа после пятого введения. С целью подавления формирования ахроматинового веретена клеточного деления и накопления метафазного материала мышам за 4 часа до забоя однократно внутрибрюшинно вводили 0,025%-ный раствор колхицина в объёме 0,5 мл. После проведения эвтаназии в атмосфере углекислого газа у мышей выделяли бедренные кости, помещали их во флаконы с 2% цитратом натрия. Цитогенетические препараты готовили стандартным суховоздушным способом по Preston R.J. et al. Костный мозг вымывали из бедренных костей подогретым до 370С 1% цитратом

натрия. Полученную взвесь клеток костного мозга центрифугировали 10 минут при 1,0 тыс. об/мин, супернатант удаляли. Клеточный осадок ресуспендировали в гипотоническом растворе цитрата натрия (1% раствор), инкубировали 20 минут при 370С и осаждали центрифугированием в течение 10 минут при 1,0 тыс. об/мин. Супернатант удаляли, осадок клеток фиксировали охлажденной смесью спиртуксусной кислоты (в соотношении 3:1) 3 раза. После фиксации клеточные суспензии наносили на влажные охлажденные предметные стекла, высушивали в пламени горелки и окрашивали по Романовскому-Гимзе. Полученные цитологические препараты (по два стекла от каждого животного) шифровали и просматривали под иммерсионной системой светового микроскопа.

Цитогенетический анализ проводили стандартно, на основе рекомендаций Scott D. et al. Для анализа отбирали округлые метафазные пластинки без наложений хромосом с модальным числом 40. Учитывали число одиночных и парных фрагментов, хроматидных и хромосомных обменов, число клеток с множественными повреждениями хромосом (более 5 хромосомных повреждений в клетке). Анализировали по 100 метафаз от каждого животного. Рассчитывали долю поврежденных клеток для каждого животного и в группе в целом. Ахроматические пробелы (гепы) не учитывали.

Анализ данных

Для всех количественных данных вычисляли групповое среднее арифметическое (М) и стандартное отклонение (SD) с использованием пакета анализа данных программы Microsoft Excel (версия 14.0.4760.1000, 32-разрядная). Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения SPSS Statistics 17.0 (версия 17.0.0.236).

15.2.4. Результаты исследования

Тест Эймса

Как видно из данных, представленных в таблице 15.8, у всех индикаторных штаммов происходило увеличение числа колоний ревертантов под действием мутагенных веществ, использованных в качестве положительных контролей, относительно тех же штаммов, не обработанных какими-либо мутагенами (отрицательный контроль – ОКО), что указывает на объективность экспериментальных данных. Изучаемый препарат не вызывал статистически

значимого увеличения числа колоний ревертантов относительно отрицательного контроля. Таким образом, можно заключить, что изучаемый препарат в разведениях от 1 (0,01 мг/мл) до 1:10000 в тесте Эймса мутагенных эффектов не проявляет.

Таблица 15.8 — Влияние раствора Метилфенилтиометил-диметиламинометилгидроксиброминдол карбоновой кислоты этиловый эфир (субстанция-порошок для производства нестерильных лекарственных форм, серия О-060920) на среднее количество колоний ревертантов, определнное в тесте Эймса

	Среднее число ревертантов на чашку								
Развеления	TA	497	TA	.98	TA100				
тазведения	Без активании	Активация S9	Без активании	Активаци я S9	Без активании	Активация S9			
1	226,3±28, 3 n=3	269,7±6,2 n=3	38±3,6 n=3	60±3,5 n=3	162±13,9 n=3	155,7±8,8 n=3			
Контроль									
ОКО	214,3±32, 9 n=3	261,0±6,5 n=3	34,3±6,8 n=3	63,3±4,3 n=3	162,3±9,2 n=3	177,7±7,6 n=3			
2- нитрофлуорен	466,3±28, 7 * n=3		640,3±18,1 * n=3						
2- аминоантраце н		1377,7±15, 5 * n=3		537,7±16* n=3		415,0±28,1 * n=3			
Азид натрия					1287,0±17,9 * n=3				

Примечание – данные представлены как среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего, n – количество чашек Петри в группе; статистический анализ проводился с использованием t-критерия Стьюдента (p<0,01).

* статистически значимые отличия от препарата сравнения.

Учет хромосомных аберраций

Результаты изучения мутагенности исследуемого лекарственного препарата при многократном пероральном введении представлены в таблице 15.9. При воздействии каждой из двух исследованных доз у самцов не отмечено статистически значимого увеличения количества клеток со структурными нарушениями хромосом по сравнению с группой негативного контроля. Характер повреждений хромосом у животных, получавших исследуемый препарат, также не отличался от повреждений, выявленных у мышей из группы отрицательного контроля: основную массу всех перестроек составляли аберрации хроматидного типа (концевые делеции). Клетки с множественными аберрациями у животных, получавших исследуемый препарат, и в группе отрицательного контроля не выявлены. Количество пробелов (гепов) в группах опыта и отрицательного контроля не превышало 2%. В группе положительного контроля – после воздействия циклофосфамида (20 мг/кг), обладающего мутагенной активностью, – количество поврежденных клеток составляло 23,1%, основные типы повреждений были представлены аберрациями хроматидного типа.

Вещество, доза (мг/кг)	№ мыши	Пол	Кол-во исследованных клеток	Кол-во клеток с одиночными аберрациями	Одиночные фрагменты	Парные фрагменты	Обмены	Кол-во клеток с множественными аберрациями	Кол-во поврежденных клеток	Кол-во аберраций на 1 клетку
	1	8	100	0	1	0	0	0	1	0,01
	2	8	100	0	0	1	0	0	1	0,01
	3	8	100	0	0	0	0	0	0	0
	4	8	100	0	1	1	0	0	2	0,02
Исследуемый	5	8	100	0	0	0	0	0	0	0
препарат, 50	1	Ŷ	100	1	1	1	0	0	3	0,03
мг∕кг	2	Ŷ	100	1	0	0	1	0	2	0,02
	3	Ŷ	100	1	0	0	1	0	2	0,02
	4	Ŷ	100	1	0	0	0	0	1	0,01
	5	Ŷ	100	0	1	0	0	0	1	0,01
	Ито	го:	1000	4	4	3	2	0	13	0,13
	1	8	100	0	0	0	0	0	0	0
	2	8	100	1	1	1	1	0	4	0,04
	3	8	100	0	1	0	0	0	1	0,01
	4	8	100	0	1	1	0	0	2	0,02
Исследуемый	5	8	100	1	1	1	1	0	4	0,04
препарат, 5	1	Ŷ	100	0	0	0	0	0	0	0
мг/кг	2	Ŷ	100	0	1	0	0	0	1	0,01
	3	Ŷ	100	1	1	0	0	0	2	0,02
	4	Ŷ	100	0	0	0	0	0	0	0
	5	Ŷ	100	1	1	0	0	0	2	0,02
	Ито	го:	1000	4	7	3	2	0	16	0,16
	1	8	100	0	0	1	0	0	1	0,01
Отрица-	2	8	100	1	1	1	0	0	3	0,03
контроль	3	8	100	0	0	0	1	0	1	0,01
контроль	4	8	100	0	0	0	0	0	0	0

Таблица 15.9 – Данные генетического скрининга клеток костного мозга мышей

Вещество, доза (мг/кг)	№ мыши	Пол	Кол-во исследованных клеток	Кол-во клеток с одиночными аберрациями	Одиночные фрагменты	Парные фрагменты	Обмены	Кол-во клеток с множественными аберрациями	Кол-во поврежденных клеток	Кол-во аберраций на 1 клетку
	5	8	100	1	1	1	1	0	4	0,04
	1	Ŷ	100	1	0	1	0	0	2	0,02
	2	4	100	0	1	0	0	0	1	0,01
	3	9	100	1	0	1	1	0	3	0,03
	4	4	100	1	1	0	0	0	2	0,02
	5	4	100	0	0	0	0	0	0	0
	Итог		1000	5	4	5	3	0	17	0,17
	1	ŃΟ	100	9	9	7	0	0	25	0,25
	2	50	100	5	5	7	1	1	19	0,19
Цикло	3	50	100	9	5	7	0	0	21	0,21
фосфамил 20	4	50	100	5	9	7	0	1	22	0,22
мг/кг	5	50	100	6	6	7	1	0	20	0,2
(положи-	1	4	100	6	6	10	0	0	22	0,22
тельный	2	9	100	7	10	7	1	0	25	0,25
контроль)	3	4	100	10	8	6	1	1	26	0,26
	4	4	100	10	8	9	1	0	28	0,28
	5	4	100	9	7	7	0	0	23	0,23
	Итог	.	1000	76	73	74	5	3	231	2,31

Таким образом, при микроскопическом анализе цитологических препаратов не было выявлено увеличения количества клеток с хромосомными аберрациями в костном мозге подопытных мышей. Показатель количества аберраций на 1 клетку также не отличался от уровня негативного контроля. Во всех изученных дозах препарат Фармкомпозиция в форме саше 2,5 г. (фосфолипидные наночастицы со встроенным активным компонентом противовирусного действия), серия 0322, не оказывал мутагенного действия на соматические клетки подопытных мышей.

Заключение

Исследована фармкомпозиция в форме саше 2,5 г. (фосфолипидные наночастицы со встроенным активным компонентом противовирусного действия, серия 0322) в тесте «Учет хромосомных аберраций при многократном введении» и препарат сравнения Метилфенилтиометил-диметиламинометил-гидроксиброминдол карбоновой кислоты этиловый эфир (МНН умифеновир), субстанция-порошок для производства нестерильных лекарственных форм (серия: O-060920, годен до 09.2023) в тесте Эймса.

Проверка мутагенной активности исследуемого в тесте Эймса препарата показала, что раствор метилфенилтиометил-диметиламинометилгидроксиброминдол карбоновой кислоты этиловый эфир (субстанция-порошок для производства нестерильных лекарственных форм, серия O-060920 МНН умифеновир) в диапазоне концентраций от 0,01 мг/мл до 0,001 мкг/мл мутагенной активностью не обладает.

При микроскопическом анализе цитологических препаратов не было выявлено увеличения количества клеток с хромосомными аберрациями в костном мозге подопытных мышей. Показатель количества аберраций на 1 клетку также не отличался от уровня негативного контроля. Во всех изученных дозах препарат Фармкомпозиция в форме саше 2,5 г. (фосфолипидные наночастицы со встроенным активным компонентом противовирусного действия), серия 0322, не оказывал мутагенного действия на соматические клетки подопытных мышей.

Полученные данные свидетельствуют о то, что композиция может быть допущена к последующим стадиям испытаний.

Помимо классических токсикологических методов исследования осуществлено определение влияния фосфолипидных наночастиц непосредственно

на двухцепочечную ДНК электрохимическим методом с использованием авторской методики.

15.3. Исследование влияния фосфолипидных наночастиц на двухцепочечную ДНК электрохимическим методом

Электрохимическим методом изучено влияние фосфолипидных наночастиц (PhNP) с различным содержанием фосфатидилхолина (PhNP80 и PhNP100) на двухцепочечную ДНК. Для оценки механизма связывания при взаимодействии лиганд-ДНК использовали изменения электрохимического повеления гетероциклических оснований гуанина, аденина и тимина в диапазоне потенциалов 0,2-1,2 В в присутствии PhNP. Сравнительный анализ действия PhNP с разным фосфатидилхолина показал более выраженное содержанием влияние на двухцепочечную ДНК наносистемы PhNP100. На основании полученных экспериментальных данных по снижению амплитуды токов электрохимического окисления азотистых оснований рассчитывали электрохимический коэффициент токсического действия как отношение токов электроокисления дцДНК и дцДНК в присутствии фосфолипидных наночастиц.

Взаимодействие биологически активных соединений с ДНК является важным направлением фармакогеномики [344,345]. Связывание малых молекул с ДНК может резко изменить свойства ДНК, приводя к ее разрушению или к изменению функционирования всего генома. Изучение и понимание взаимодействия лиганд-ДНК является важной частью рационального конструирования биологически активных соединений, прогнозирования их влияния на геномный процессинг, а также фармакогеномных исследований.

Влияние PhNP как потенциальных систем доставки лекарств с содержанием фосфатидилхолина 74,5% (PhNP80) и 96,2% (PhNP100) на ДНК ранее не изучалось. Целью данной работы было проведение исследований влияния фосфолипидных наночастиц на двухцепочечную ДНК электрохимическим методом.

Материалы и методы

В работе использовали следующие реагенты: монозамещенный фосфат калия (Реахим, Москва, Россия), хлорид натрия (Реахим, Москва, Россия), одностенные углеродные нанотрубки 0,4 мас.%, стабилизированные карбоксиметилцеллюлозой 0,6 мас. % (Tuball Batt H2O 0,4 мас.%, OCSIAL Ltd, ООО «Оксиал Аддитивс HCK»,

Новосибирск, Россия, https://ocsial.com), двухцепочечную ДНК сперматозоидов рыб (дцДНК) закупали у Sigma-Aldrich (D3159, Japan).

PhNP получали последовательным суспендированием фосфолипидов сои (Lipoid GmbH, Германия) в водном растворе мальтозы, гомогенизацией полученной эмульсии при высоком давлении (800–1500 бар) с последующей лиофилизацией [346]. Лиофилизированный порошок PhNP с различным содержанием фосфатидилхолина (96,2% в субстанции Липоид С100 и 74,5% в субстанции Липоид С80), представляющий собой композицию соевых фосфолипидов (500 мг) и мальтозы (2000 мг), при регидратации сохранил свои физико-химические свойства.

Размер наночастиц и ζ-потенциал определяли в водном растворе PhNP с помощью фотонного корреляционного спектрофотометра Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания). В каждом случае проводили три измерения, а результат распределения полидисперсности частиц усредняли по объему. Исходные растворы PhNP готовили в деионизированной (18 МОм) воде Milli-Q.

Электрохимические измерения проводили с помощью потенциостата PalmSens (PalmSens BV, Нидерланды, Голландия) с программным обеспечением PSTrace (версия 5.8). Использовали трехконтактные электроды, получаемые методом трафаретной печати (ПГЭ) (ColorElectronics, Mockba, Poccus, http://www.colorel.ru); с рабочим и вспомогательным графитовыми электродами, хлоридсеребряным электродом сравнения. Диаметр рабочего электрода 0,2 см (площадь 0,0314 см2). Все потенциалы даны относительно хлоридсеребряного электрода (Ag/AgCl).

Растворы аналитов готовили в 0,1 М калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 0,05 М NaCl; в электрохимических экспериментах использовали свежеприготовленные растворы.

Электроды модифицировали 2 мкл 1 мг/мл свежеприготовленной водной дисперсии однослойных углеродных нанотрубок (ПГЭ/УНТ) Tuball Batt H2O 0,4 мас. % (предварительно разбавленной в 6 раз дистиллированной водой) и сушили при комнатной температуре в течение 25 минут. После этого модифицированные электроды сканировали в диапазоне потенциалов 0,2–1,2 В (4 сканирования) в 0,1 М калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 0,05 М NaCl, затем наносили 60 мкл

анализируемого вещества, инкубировали в течение 10 мин на электроде (для образования комплекса дцДНК– PhNP) и проводили электрохимические измерения методом дифференциальной импульсной вольтамперометрии (ДПВ) в диапазоне потенциалов 0,2–1,2 В, шаг потенциала 0,005 В, амплитуда импульса 0,025 В, длительность импульса 0,05 с, скорость сканирования 0,05 с. Эксперименты проводили в аэробных условиях при комнатной температуре ($25 \pm 3^{\circ}$ C) с использованием ячейки Фарадея (Metrohm Autolab BV, Нидерланды, Голландия). Для оценки воспроизводимости результатов для каждой концентрации использовали не менее 3 электродов и рассчитывали стандартное отклонение.

Электрохимический коэффициент токсического действия можно оценить при каждой концентрации PhNP как процент изменения высоты пика G, A или T (S%) по уравнению (1), как указано в [347-350]

 $S = (Ss/Sf) \times 100\% (1),$

где Sb — максимальные значения токов окислительных сигналов азотистых оснований после взаимодействия с PhNP и Sf – максимальные значения токов окислительных сигналов азотистых оснований до взаимодействия [347-350]. Для расчета максимального пикового тока сигналов электрохимического окисления азотистых оснований была проведена коррекция базовой линии с использованием пакета программ PSTrace (версия 5.8).

Результаты

Размер фосфолипидных наночастиц (PhNP) и величину ζ -потенциала определяли методом динамического светорассеяния. Было показано, что PhNP100 и PhNP80 имеют размер 30,7 ± 1,6 нм и 8,7 ± 1,2 нм соответственно. Определяли величину ζ -потенциала, которая составила -(3,9±1,1) мВ (PhNP100) и -(35,7±3,0) мВ (PhNP80).

В настоящее время наиболее активно используются одноразовые электроды, изготовленные методом трафаретной печати (печатные электроды, ПГЭ) (рисунок 15.8) [351]. Электроды имеют два типа электрохимического режима: вертикальный (объемом несколько мл) или горизонтальный или планарный режим, что позволяет использовать малые объемы аналита (60 мкл). Этот тип электродов позволяет работать с биологическими объектами без этапа регенерации сенсора. Модификация поверхности электрода наночастицами (наноструктурирование электрода)

позволяет подобрать оптимальные условия, настроить датчик на выбранную электрохимическую реакцию, определяемое вещество и обеспечить необходимые аналитические характеристики метода [352-358]. В работе использовали электроды, модифицированные одностенными углеродными нанотрубками, стабилизированными карбоксиметилцеллюлозой. Широкое окно потенциалов 0,2–1,2 В позволяет регистрировать электрохимическое окисление трех азотистых оснований двухцепочечной ДНК (гуанина, аденина и тимина).



Рисунок 15.8 — Устройство трафаретного электрода 1 — графитовый рабочий электрод; 2 — серебряно-хлорсеребряный электрод сравнения; 3 — графитовый вспомогательный электрод; 4 — серебряные контакты; 5 — изоляция, 6 — поливинилхлоридная подложка

Дифференциальные (ДИВА) импульсные вольтамперограммы электрохимического окисления двухцепочечной ДНК (1 мг/мл) в аэробных условиях представлены на 15.9 (А–С). При первом сканировании были зарегистрированы три четких пика при потенциалах $0,59 \pm 0,01$ B, $0,89 \pm 0,01$ B и $1,12 \pm 0,01$ B (относительно Ag/AgCl) для гуанина (G), аденина (A) и тимина (T) соответственно (рис. 15.9 А). Потенциалы электрохимического окисления азотистых оснований хорошо коррелируют с ранее опубликованными результатами по обнаружению ДНК и разработке ДНК-сенсоров [355, 358]. Следует отметить, что ПГЭ/УНТ позволяет регистрировать электрохимическое окисление не только гуанина и аденина, но и тимина (вставка на рис. 15.9А), что позволяет анализировать дцДНК по трем основаниям, таким как G, A и T. Оптимальное время инкубации образования комплекса дцДНК-PhNP было выбрано равным 10 мин. В присутствии PhNP (19 и 38 мг/мл) амплитуды токов окисления трех азотистых оснований уменьшаются, но потенциалы окисления существенно не сдвигаются (рис. 15.9 Б, В).



Рисунок 15.9 – Дифференциальные импульсные вольтамперограммы двухцепочечной ДНК (А) на электродах для ТФЭ/УНТ, (Б) в присутствии PhNP100 (19 и 38 мг/мл), (В) PhNP80 (19 и 38 мг/мл). Вставка: электрохимическое окисление 100 мкМ тимидин-5'-трифосфата на электроде для ПГЭ/УНТ. Первые производные необработанных данных DPV использовались для расчета интенсивности соответствующих пиковых значений

Зарегистрировано линейное снижение максимальной амплитуды тока пиков ДИВА гуанина, аденина и тимина в присутствии ФНЧ в диапазоне концентраций 14,3-42,2 мг/мл. На рис. 15.10 (А, Б) представлены концентрационные зависимости сигналов азотистых оснований, рассчитанные как $\Delta I=I(дцДНК)-I(дцДНК/ФНЧ)$. Чувствительность, оцененная по наклону калибровочных кривых для PhNP100 (рис. 15.10 А), продемонстрировала в 1,4-2 раза более высокое значение по сравнению с PhNP80 (рис. 15.10 Б), что свидетельствует о более выраженном влиянии этих фосфолипидных наночастиц на двухцепочечную ДНК по сравнению с PhNP80 (рис. 15.10 Б).

Не наблюдалось значительного влияния на сигнал окисления дцДНК ДИВА при использовании 2,3–11,4 мг/мл PhNP80/100, как показано на гистограммах на рисунке 15.11 (A, B).



Рисунок 15.10 – Зависимость максимальной амплитуды ДИВА от тока окисления дцДНК, рассчитанная как $\Delta I = I(duДHK) - I(duДHK/\PhiHY)$, (A) в присутствии PhNP100, (Б) в присутствии PhNP80 в диапазон концентраций 14,3–42,2 мг/мл PhNP на электродах для ПГЭ/УНТ



Рисунок 15.11 – Гистограммы, соответствующие максимальному пиковому току окисления двухцепочечной ДНК, зарегистрированному методом ДИВА в отсутствие и в присутствии PhNP100 при концентрациях 2,3 мг/мл (А) и 11,4 мг/мл (Б) на ПГЭ/УНТ

На основании анализа снижения интенсивности сигналов электроокисления гуанина, аденина и тимина по уравнению (1) рассчитывали электрохимический коэффициент токсического действия PhNP100 (табл. 15.10) и PhNP80 (табл. 15.11). В соответствии с [347-350] образец не оказывает токсического действия при значении S выше 85%; умеренный токсический эффект, если значение S ≈ 50-85%; если S менее 50%, то соединение оказывает токсическое действие.

[PhNP100], mg/mL	S (G), %	S (A), %	S (T), %
2.3	100	100	100
11.4	100	100	100
14.3	95	81	80
19.0	92	75	78
28.5	74	57	60
38.0	24	18	14
42.2	18	11	8

Таблица 15.10 – Влияние PhNP100 на сигналы окисления DPV гуанина (G), аденина (A) и тимина (T). S% – электрохимический коэффициент токсического действия

Таблица 15.11 – Влияние PhNP80 на сигналы окисления ДИВА гуанина (G), аденина (A) и тимина (T). S% – электрохимический коэффициент токсического действия

<u>1) u mushunu (1). 5/0</u>	Siennpositisiti teenti	и коэффициении шок	
[PhNP80], mg/mL	S (G), %	S (A), %	S (T), %
2.3	100	100	100
11.4	100	100	100
14.3	80	76	81
19.0	80	75	79
28.5	55	47	50
38.0	44	30	30
42.2	36	23	18

На основании значений электрохимического коэффициента токсического действия (S) можно сделать вывод, что PhNP80 и PhNP100 в концентрациях до 11,4 мг/мл не оказывают токсического действия на дцДНК (S принят за 100%, т.к. изменение сигнала в присутствии PhNP было незначительным). В диапазоне концентраций 14,3-28,5 мг/мл PhNP80/100 проявляют умеренное токсическое действие на двухцепочечную ДНК (S \approx 50-85%), PhNP80/100 в концентрациях выше 28,5 мг/мл уже оказывают токсическое действие. PhNP80/100 в концентрациях 38,0 и 42,2 мг/мл (выделены цветом в таблицах 15.10 и 15.11) зафиксировано снижение максимальных амплитуд токов окисления азотистых оснований более чем на 50% и большее токсическое действие на дцДНК наблюдали в присутствии PhNP100 по сравнению с PhNP80 (S(PhNP100) < S(PhNP80).

Преимуществом электрохимического метода анализа двухцепочечной ДНК является регистрация трех GCO (гуанина, аденина и тимина). Такой подход позволяет зарегистрировать избирательное действие PhNP на пуриновые и пиримидиновые основания. Как следует из табл. 15.10 и 15.11, наиболее интенсивно действие PhNP100 в концентрациях 14,3 и 19,0 мг/мл проявляется при анализе изменения интенсивности сигналов электрохимического окисления аденина и тимина, тогда как влияние PhNP100 на гуанине проявляется в меньшей степени.
ДИВА, представленные на рис. 15.12, демонстрируют сравнительный анализ влияния PhNP 80/100 на двухцепочечную ДНК в концентрациях (А) 19 и (В) 38 мг/мл.



Рисунок 15.12 – (А) ДИВА двухцепочечной и двухцепочечной ДНК в присутствии 19 мг/мл PhNP80 или 19 мг/мл PhNP100, (Б) ДИВА двухцепочечной ДНК и ДИВА двухцепочечной ДНК в присутствии 38 мг/мл PhNP80 или 38 мг/мл PhNP100

Как видно из рис. 15.12(А, Б), а также из табл. 15.10 и 15.11, влияние PhNP100 на сигналы дцДНК более интенсивно по сравнению с PhNP80 в диапазоне концентраций 19,0–42,2 мг/мл. Такой эффект может быть обусловлен высоким содержанием фосфатидилхолина в PhNP100 – 96,2% по сравнению с PhNP80 – 74,5%).

При интеркаляционном (гидрофобном) характере взаимодействия лигандов с ДНК наблюдается положительный сдвиг потенциалов окисления азотистых оснований; отрицательные сдвиги отражают образование водородных связей и/или электростатических взаимодействий В комплексе ДНК-лиганд [359-363]. Исследованный PhNP80/100 в диапазоне концентраций 2,3-42,2 мг/мл не оказывал существенного влияния на сдвиг потенциалов окисления ДНК. Это наблюдение позволяет сделать вывод, что комплекс дцДНК-PhNP80/100 неинтеркаляционного типа, локализующийся, как правило, в бороздках ДНК за счет образования водородных связей [359-363]. Длинная цепь в структуре ПК (рисунок 15.13), являющегося основным соединением состава PhNP, позволяет подтвердить способ связывания как взаимодействие с бороздками ДНК.



Рисунок 15.13 – Химическая структура фосфатидилхолина (ФХ)

Поскольку PhNP не содержат ароматического кольца, облегчающего интеркалирование, классическое интеркалирующее взаимодействие может быть исключено [363].

Обсуждение результатов

В исследовании проведена электрохимическая вольтамперометрическая детекция взаимодействия наночастиц фосфолипидов с различным содержанием ФХ потенциальной системы доставки лекарств с двухцепочечной ДНК. как Одноразовые ПГЭ широко используются в исследованиях взаимодействия ДНК и лиганда с ДНК благодаря их коммерческой доступности, простоте модификации, воспроизводимости и относительно низкой стоимости. Модификация ПГЭ дисперсией углеродных нанотрубок, стабилизированных карбоксиметилцеллюлозой, позволяет регистрировать пиковый ток окисления и пиковые потенциалы гуанина, аденина и тимина при 0.59 ± 0.01 B, 0.89 ± 0.01 B и 1.12 \pm 0.01 В (относительно Ag/AgCl), соответственно. Такой многопараметрический анализ показал, что чувствительность адениновых и тиминовых азотистых оснований к PhNP80 и PhNP100 более выражена по сравнению с остатком гуанина (рисунок 15.10 А, Б, наклоны кривых). Исследовано также влияние PhNP на основе фосфолипидов сои с различным содержанием фосфатидилхолина, ФХ (PhNP80 – 74,5% ФХ, PhNP100 – 96,2% ФХ) на дцДНК. Сравнительный анализ действия наночастиц фосфолипидов с различным содержанием фосфатидилхолина показал более выраженный эффект наносистемы PhNP100, вероятно, за счет более высокого содержания ФХ (96,2%) и большей размерности наночастиц. Чувствительность для PhNP100 (рисунок 15.10 А, наклон кривых) продемонстрировала в 1,4-2 раза более высокое значение по сравнению с PhNP80 (рисунок 15.10 Б, наклон кривых). Эти результаты указывают на более

выраженное влияние наночастиц PhNP100 на двухцепочечную ДНК по сравнению с PhNP80.

По экспериментальным данным рассчитывали электрохимический коэффициент токсического действия. Результаты отчетливо показали, что PhNP80/100 в концентрациях до 11,4 мг/мл не оказывает токсического действия, в концентрациях 14,3-28,5 мг/мл PhNP80/100 оказывает умеренное токсическое действие на дцДНК, PhNP80/100 в концентрациях выше 28,5 мг/мл уже готов действие, регистрируемое оказывают токсическое ПО снижению тока электрохимического окисления двухцепочечной ДНК. Мы можем подчеркнуть, что воздействие PhNP80 или PhNP100 на ДНК как внутриклеточную мишень является регистрируемым, особенно при концентрациях фосфолипидных наночастиц выше 28,5 мг/мл. Эти данные необходимо учитывать при разработке систем доставки лекарств на основе PhNP. ФХ, как основной компонент фосфолипидных наночастиц, обладают гидрофобными цепями и ионными частями молекул (рисунок 15.13), что позволяет прогнозировать различные типы взаимодействий с ДНК. Положительный сдвиг потенциалов окисления азотистых оснований отражает интеркаляционный способ взаимодействия лекарство-ДНК, который является термодинамически менее благоприятным электрохимическим процессом из-за экранирования азотистых оснований; отрицательные сдвиги окислительного потенциала отражают образование водородных связей и/или электростатических взаимодействий в комплексе ДНК-лиганд [358-362] с более легкими процессами переноса электрона. Однако в наших экспериментах сдвиг потенциалов окисления гуанина, аденина и тимина дцДНК статистически не зарегистрирован в присутствии PhNP80 или PhNP100. Следовательно, интеркалирующий способ взаимодействия PhNPs-ДНК должен быть исключен, и взаимодействие может быть возможно через способ связывания в бороздках ДНК. Хорошо известна точка зрения, что небольшие молекулы, такие как лекарства, органические красители и т. д., связываются с ДНК в режиме связывания с малой бороздкой из-за их небольшого размера, в то время как макромолекулы, такие как белковые молекулы, связываются с ДНК в режиме связывания с большой бороздкой [364]. Соответственно, на основании наших экспериментальных данных было сделано предположение, что фосфолипидные наночастицы взаимодействуют с малой бороздкой двухцепочечной ДНК. Изучение

взаимодействий PhNPs-ДНК является ключевым параметром для построения системы доставки лекарств на основе фосфолипидных наночастиц. В отличие от спектральных методов, где можно зарегистрировать только один параметр, такой как поглощение при 260 нм, электрохимическое окисление пуриновых и пиримидиновых азотистых оснований расширяет понимание специфичности взаимодействий для фармакогеномных исследований и ограничений новых систем доставки лекарств.

Выводы

ДНК-сенсоры имеют потенциал для мониторинга взаимодействия биологически активных веществ или химиотерапевтических средств с ДНК. Изучение взаимодействия лиганд-ДНК является ключом в фармакогеномике. Модификация электродов с помощью одностенных углеродных нанотрубок значительно улучшила электрохимическую характеристику двухцепочечной ДНК с регистрацией электроокисления оснований гуанина, аленина И тимина. Электрохимический мониторинг взаимодействия ДНК с биологически активными соединениями выявил механизм связывания и диапазон нетоксичных концентраций. Результаты ДИВА-анализа взаимодействия PhNP-ДНК выявили диапазон безопасных концентраций фосфолипидных наночастиц, таких как 2,3-11,4 мг/мл. PhNP80/100 в концентрациях выше 38,0 мг/мл проявлял токсическое действие. Насколько нам известно, это первый пример фармакогеномных исследований с оценкой гетероциклических оснований для трех оценки влияния химиотерапевтических средств на ДНК, выполненных электрохимическим методом. Для сравнительного анализа комплексов ДНК-PhNP был проведен электрохимический анализ максимальных токов окисления двухцепочечной ДНК и потенциалов окисления гуанина, аденина и тимина. Оценка роли фосфолипидных наночастиц во взаимодействии с двухцепочечной ДНК на основе электрохимического подхода с помощью анализа ДИВА позволяет предположить связывание с малой бороздкой и исключить участие интеркаляционного режима.

15.4. Повышение эффективности электрокатализа ферментов, преобразующих ксенобиотики

Другим важным направлением применения электрохимического метода является разработка подходов к исследованию системы микросомального окисления

как основного пути детоксикации и метаболизма лекарственных средств, в частности, системы цитохромов P450. Электроды с иммобилизованными рекомбинантными изоформами цитохромов P450 являются эффективными инструментами при поиске новых субстратов, ингибиторов, активаторов этого класса гемопротеинов. Используемый в данной работе электрохимический метод анализа позволяет в режиме экспресс-диагностики получить данные о состоянии одной из самых главных ферментативных систем организма человека. Это система метаболизма, основанная на цитохромах P450, реагирующая на поступление в организм ксенобиотиков.

Ферменты играют важную роль в исследовании биохимии метаболических путей и патологических процессов, в медицинской диагностике, в синтезе лекарственных препаратов (антибиотиков, стероидных гормонов, прекурсоров), в фармакологии в качестве лекарственных препаратов, в разработке (био)сенсорных и диагностических систем, в агротехнике, в промышленном химическом синтезе, в пищевой промышленности [365].

Среди ферментных систем цитохромы Р450 активно исследуются вследствие высокой функциональной и медицинской значимости. Цитохромы Р450 – гемтиолатные монооксигеназы, катализирующие большое число различных типов химических реакций, и присутствующие во всех классах живых организмов. Широкая субстратная специфичность цитохромов Р450 позволяет использовать их для получения фармакологически значимых препаратов [366, 367]. Главным ограничением в реализации такого биотехнологического подхода является использование дополнительных редокс-партнерных белков и НАДФН в качестве источника электронов для реконструируемых систем. В электрохимических системах донором электронов является электрод. Для создания эффективных электрохимических цитохром Р450-систем были разработаны различные типы электродов и материалы для их модификации, основной задачей которых является сохранение нативной структуры фермента и его каталитической активности [368, 369]. Иммобилизация белка на рабочей поверхности электрода необходима для эффективного электронного транспорта и обмена реакционной среды. Однако, при этом существует проблема взаимодействия белка с «твердыми» двумерными (2D) поверхностями, что может приводить к денатурации белка [370]. Ключевым

моментом электроанализа является обоснованный выбор типа электродов для наиболее эффективного процесса переноса электронов и регистрации молекулы, биохимического события, каталитического тока как индикатора электрокатализа [369,371]. При работе с «твердыми» электродами модификация рабочей поверхности (например, мембраноподобными, поверхностно-активными соединениями) не только способствует более эффективному электронному транспорту, но может приводить к стабилизации третичной структуры белка. Новизной подхода, предложенного в данной работе, является включение фермента в трехмерную структуру пористой мембраны, помещенной на рабочий электрод. При этом осуществляется переход от 2D к 3D типу электрода, что может способствовать стабилизации структуры белка и повышению его удельной каталитической активности.



Рисунок 15.14 — Модификация электрода с помощью высокоорганизованных и регулярных нанопор на основе анодного оксида алюминия (Anodisc)

В качестве трехмерного пористого материала (3D) нами были использованы мембраны из анодного оксида алюминия, содержащие сонаправленные поры диаметром 0.1 мкм (Anodisc 13, Whatman 0.1 µm, cat No.6809-7013) и 0.2 мкм (Anodisc 13, Whatman 0.2 µm, cat No.6809-7023). Дизайн электрохимического эксперимента позволяет включить фермент в 3D-нанопоры на плоском электроде, осуществить 2D→3D переход матрицы и эффективно исследовать каталитическую активность цитохрома P450 3A4 (Pucyнок 15.14). Главным преимуществом мембраны на основе анодного оксида алюминия является химическая стабильность, высокоорганизованная и регулярная структура нанопор, а также коммерческая доступность. На рисунке 15.14 приведены микрофотографии используемой мембраны с порами диаметром 0,1 мкм, полученные с помощью сканирующего

электронного микроскопа. Мембрана имеет регулярное расположение пор для эффективного включения исследуемого белка. Средний размер мономеров цитохромов P450 лежит в нанометровом диапазоне [372], что позволяет предположить возможность включение белка в поры.



А



Б

Рисунок 15.15 — Микрофотографии пористой мембраны, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi S 5500 при различных увеличениях 2 мкм (А) и 500 нм (Б)

Электрохимические измерения проводили с помощью потенциостата AUTOLAB 302 N (Metrohm Autolab, Нидерланды), снабженного программным обеспечением NOVA (версия 2.0). В работе использовали трехконтактные электроды с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами и хлоридсеребряным электродом сравнения (ПГЭ – печатный графитовый электрод), полученные методом трафаретной печати, (ColorElectronics Poccuя). Диаметр рабочего электрода 2 мм. Для изготовления мембраны соответствующего диаметра анодный оксид алюминия нарезали на круги с помощью волоконного лазера «МиниМаркер 2». В экспериментах по регистрации электрокаталитической активности цитохрома P450 3A4 использовали циклическую вольтамперометрию (ЦВА) и горизонтальное расположение электродов. Все электрохимические измерения проводили при комнатной температуре в 100 мМ калий-фосфатном буфере с 50 мМ NaCl в качестве фонового электролита, pH 7,4.

Электроактивная площадь ПГЭ и модифицированных электродов была рассчитана по уравнению Рэндлса-Шевчика [373,374] с использованием внешнего электролита 5 мМ раствора гексацианоферрата калия. Было зарегистрировано увеличение электроактивной площади электрода при модификации мембранами из анодного оксида алюминия (Anodisc 0.1 мкм) и ДДАБ по сравнению с немодифицированным электродом и электродом, модифицированным только ДДАБ 15.16). (Рисунок Электроаналитические характеристики электродов, модифицированных мембранами из анодного оксида алюминия (Anodisc 0.1 мкм) и ДДАБ продемонстрировали существенное увеличение электроактивной площади модифицированных электродов (в 2.5 и 103 раза, соответственно) по сравнению с немодифицированным электродом и электродом, модифицированным ДДАБ, что говорит об эффективности использования мембраны с порами субмикронного размера (0,0014 см2, 0,000034 и 0,0035 см2 для ПГЭ, ПГЭ/ ДДАБ и ПГЭ/Anodisc 0,1 мкм/ ДДАБ, соответственно).



Рисунок 15.16 -Циклические вольтамперограммы ПГЭ, и ПГЭ/ДДАБ и ПГЭ/Апоdisc 0,1 мкм/ ДДАБ при скорости развертки потенциала 0,05 В/с. Измерения проводили в горизонтальном режиме, в 100 мкл 5 мМ раствора гексацианоферрата калия. Диапазон потенциалов -0.3 ÷+ 1 В

Электроды иммобилизованными рекомбинантными изоформами с цитохромов Р450 являются эффективными инструментами при поиске новых субстратов, ингибиторов, активаторов этого класса гемопротеинов [375-378]. Антибиотик из группы макролидов эритромицин (ЭР) является субстратом цитохрома Р450 ЗА4 (СҮРЗА4) и используется для сравнительного анализа каталитической активности этой изоформы [378]. Для анализа электрохимического восстановления цитохрома Р450 ЗА4, иммобилизованного на электроде как источнике электронов, на поверхность рабочего электрода помещали мембрану из анодного оксида алюминия соответствующего диаметра, содержащую поры со средним диаметром 0,1 или 0,2 мкм, затем наносили 2 мкл 0,1 М ДДАБ в хлороформе, после испарения хлороформа (10 мин) наносили 1 мкл 142 мкМ цитохрома Р450 ЗА4. На рис. 15.17 А и 15.17 Б приведены сравнительные ЦВА цитохрома P450 3A4 в диапазоне потенциалов -0,1 ÷-0,6 В. При вычитании фоновой ШВА электрода без фермента (ПГЭ/ДДАБ) получены более четкие вольтамперограммы, демонстрирующие смещение потенциала восстановления гемопротеина при использовании пористой мембраны в анодную область потенциалов, что свидетельствует о термодинамически более выгодном процессе электрохимического восстановления иона железа гема цитохрома Р450 ЗА4 [379] в соответствии со схемой Fe(III) + $\bar{e} \rightleftharpoons$ Fe(II) + O2 \rightarrow Fe(II)O2 [367, 375, 378].



Рисунок 15.17 — Циклические вольтамперограммы (ЦВА) цитохрома Р450 3А4 иммобилизованного на ПГЭ/ДДАБ (-), ПГЭ/Anodisc 0,1 мкм/ДДАБ (-) и ПГЭ/Anodisc 0,2 мкм/ДДАБ (-). (Б). Циклические вольтамперограммы цитохрома Р450 3А4, иммобилизованного на ПГЭ/ДДАБ (-), ПГЭ/Anodisc 0,1 мкм/ДДАБ (-) и ПГЭ/Anodisc 0.2 мкм/ДДАБ (-), с вычитанием соответствующей фоновой кривой. Скорость сканирования 0,1 В/с

Эффективность электрокатализа оценивали по накоплению продукта цитохром Р450 ЗА4 реакции N-деметилирования эритромицина – формальдегида [380].

and the off of the tytem		100 0111			
Электрод	Ered, B	Ecat, B	Г0, моль/см ²	Icat/ Ired	Относительная
					эффективность
					катализа, %
ПГЭ/ДДАБ/	-0,432	-0,450	3,94±0,69*10-11	0,99±0,21	100±9
CYP3A4	$\pm 0,008$	$\pm 0,005$			
ПГЭ/Anodisc	-0,368	-0,385	7,11 ±4,79 *10-	$1,12\pm0,8$	232±4
0.1/ДДАБ/	±0,005	±0,021	12		
CYP3A4					
ПГЭ/Anodisc	-0,355	-0,402	6,78 ±2,97*10-	0,77±0,17	132±5
0.2/ДДАБ/	±0,025	$\pm 0,017$	12		
CYP3A4					

Таблица 15.12 – Электрохимические характеристики и сравнение каталитической активности иитохрома P450 3A4

Как следует из таблицы 15.12, использование мембран из анодного оксида алюминия (Anodisc 0.1 мкм и 0.2 мкм) для модификации электрода позволяет сместить потенциал восстановления цитохрома P450 3A4 и потенциал катализа эритромицина в анодную область, что способствует процессу переноса электронов между электродом и активным центром фермента и делает его термодинамически более выгодным. Несмотря на меньшее количество электроактивного белка на ПГЭ/Anodisc 0.1/ДДАБ/СҮРЗА4, (параметр Г0, моль/см2) каталитическая активность такой системы существенно превышает ПГЭ/ДДАБ/СҮРЗА4 (232%). Этот эффект может отражать сохранение каталитической активности фермента в порах пространственно-упорядоченных структур на основе анодного оксида алюминия.

Включение фермента в поры анодного оксида алюминия с диаметром 0,1 и 0,2 мкм позволило повысить эффективность электрокатализа за счет перехода от двумерной поверхности планарного электрода к трехмерной объемной структуре рабочего электрода с субмикронным диаметром пор. Нами был разработан новый подход к повышению каталитической активности цитохрома P450 3A4 с помощью модификации электродной поверхности, позволяющий перевести процесс переноса электронов в цитохром P450 3A4-электрохимических системах в термодинамически более выгодный режим и существенно увеличить (более, чем в 2 раза) каталитическую активность цитохрома P450 3A4 в электрокаталитической реакции

N-деметилирования макролидного антибиотика эритромицина.

Таким образом, апробированная модификация метода электрохимического исследования ферментативной активности цитотохорма P450 обеспечила значимое повышение эффективности электрокатализа, что может быть использовано в разработке средств экспресс-диагностики системы метаболизма, реагирующей на поступление ксенобиотиков (в т.ч. лекарственных средств) в организм человека.



Рисунок 15.18 – Циклические вольтамперограммы цитохрома P450 3A4, иммобилизованного на ПГЭ/Anodisc 0,1 мкм/ДДАБ (-), при добавлении субстрата эритромицина (-), ПГЭ/ДДАБ (-). (Б). Циклические вольтамперограммы цитохрома P450 3A4, иммобилизованного на ПГЭ/Anodisc 0,1 мкм/ДДАБ (-) при добавлении субстрата эритромицина (-), с вычитанием фоновой кривой ПГЭ/ДДАБ. Скорость сканирования 0,1 В/с

Заключение

В результате выполнения работ по пунктам 2.15 Плана-графика и 5.29 Технического задания Соглашения получены следующие результаты.

Для определения пригодности использования наноразмерных частиц в качестве систем доставки проведена апробация встраивания хорошо известных в

медицинской практике лекарственных субстанций, обладающих низкой водорастворимостью и, как следствие, биодоступностью, а также начата разработка композиций с новых фармакологически активных целью определения перспективных кандидатов для последующих фармакологических исследований. Получено две композиции фосфолипидных наночастиц: с противовирусным компонентом и с нестероидным противовоспалитальным препаратом (Акт наработки в Приложении Г.7).

Исследована мутагенность разработанной композиции наноразмерных частиц с включенным активным компонентом противовирусного действия. Показано, что, как сама композиция наноразмерных частиц, так и снабженная активным компонентом, не вызывает мутагенного действия, что установлено по результатам применения теста Эймса и теста «Учет хромосомных аберраций при многократном введении».

Помимо классических токсикологических методов исследования осуществлена оценка влияния фосфолипидных наночастиц непосредственно на двухцепочечную ДНК электрохимическим методом. Установлено, что В концентрациях до 11,4 мг/мл не оказывает токсического действия, в концентрациях 14,3-28,5 мг/мл оказывает умеренное токсическое действие на дцДНК, в концентрациях выше 28,5 мг/мл оказывают токсическое действие, регистрируемое по снижению тока электрохимического окисления двухцепочечной ДНК.

Развивая возможности электрохимического метода измерений, предложена модификация метода исследования микросомального окисления как основного пути детоксикации и метаболизма лекарственных средств, в результате достигнуто значимое повышение эффективности электрокатализа, что может быть использовано в разработке средств экспресс-диагностики системы метаболизма, реагирующей на поступление ксенобиотиков (в т.ч. лекарственных средств) в организм человека.

Работы по пункту 2.15 плана-графика выполнены в полном объеме и соответствуют пунктам 5.29 и 7.1.13 технического задания.

16. РАЗРАБОТКА ТЕХНИЧЕСКОГО ПРОЕКТА БД

Омиксные технологии прочно укоренились в поле естественнонаучных дисциплин, определяя облик столетия. Данные транскриптомных, протеомных и метаболомных экспериментов многочисленны и требуют тщательного анализа, а ученым становится все сложнее ориентироваться в условиях подобного информационного шума. Правильное профилирование и хранение данных становятся залогом успешной работы любой научной команды.

Чтобы уменьшить влияние человеческого фактора на содержание мультиомных экспериментов, в рамках проекта в ИБМХ разработана единая база данных MOLE (Multi-Omics Learned to Extend) для обработки полученных результатов транскриптомных, протеомных и метаболомных экспериментов. База данных состоит из нескольких программных комплексов – «База знаний», обеспечивающий доступ к данным, «Учетная система», предназначенный для внесения информации о результатах выполнения технологических операций, и «Система анализа данных», поддержку которого обеспечивает нейросетевой компонент.

Специалистами в области анализа транскриптомных, протеомных и метаболомных данных были обработаны исходные файлы и произведена тестовая загрузка в БД, результаты работы описаны в соответствующих главах отчета.

16.1. Разработка системы СУБД МОLЕ

16.1.1. Разработка базы данных.



16.1.1.1. Общая схема организационной структуры базы данных

Рисунок 16.1 – Диаграмма зависимостей и запросов. Представлено схематическое отображение взаимодействия пользователя и компонентов системы: действия пользователя запускают каскад технологических операций

Непосредственно взаимодействие пользователя с базой данных осуществляется через вебсайт https://moleavogadro.ru/ (Рисунок 16.1). Управление базой данных доступно как через веб-интерфейс, так и через содержащийся в веб-компоненте REST API (Application Programming Interface). Веб-интерфейс использует API и позволяет интерактивно создавать программные запросы для

последующего обращения к данным (фильтры, сортировки, пагинация).

Собственно система базы данных содержит в себе три основополагающих компонента: эксперименты в виде JSON-файлов, хранилище GridFS для больших файлов и журнал, в котором сохраняется история всех изменений.

Основной базой данных является управляемый, реплицируемый кластер MongoDB, работающий с JSON-файлами. База данных в кластере поддерживает шардирование, репликацию и автоматическое резервное копирование коллекций. При удалении файлов из базы данных их копии до недели будет храниться на серверах организации с возможностью восстановления.

16.1.1.2. Развертывание виртуальных машин

В ходе разработки системы Avogadro MOLE изначально было запланировано использование вычислительных средств Института. Ввиду отсутствия вычислительных машин с графическими ускорителями, которые необходимы для эффективного обучения и работы с моделями глубоких нейронных сетей было принято решение перенести работу на сервера Yandex Cloud, функционал которого позволяет гибко менять используемые конфигурации единожды настроенной виртуальной машины.

Используются два типа виртуальных машин. Первый тип имеет от одного до нескольких графических ускорителей и название Intel Broadwell with Nvidia Tesla v100. 100% vCPU — прерываемые виртуальные машины. Данный тип используется для обучения новых моделей сетей и их тестирования на больших наборах данных, стоимость работы такой виртуальной машины равняется 81.11 руб/час при использовании одного графического ускорителя, 157.75 руб/час и 311.03 руб/час при использовании двух и четырёх ускорителей соответственно (ценовой диапазон приведен на ноябрь 2022). При данном режиме работы возможна одновременная подготовка моделей и работа сайта для запроса к данных MOLE. В ходе работы также был протестирован тип виртуальной машины "Intel Cascade Lake with Nvidia Tesla v100. 100% vCPU — прерываемые BM", однако от него было решено отказаться, т.к. он предоставляет в два раза меньше RAM.

Использование прерываемых виртуальных машин позволяет в 3-4 раза (в зависимости от типа серверного ресурса) удешевить работу с облачными вычислениями, однако при этом гарантировано отключение машины в случайное

время раз в сутки. Исходя из этого, для оптимизации работы используется система мониторинга и автоматического включения и продолжения процессов прерванной виртуальной машины.

Второй тип машин используется для штатной работы системы, в которой пользователь может использовать сервер для запросов данных "Intel Cascade Lake. 100% vCPU — прерываемые BM", стоимостью 10.39 руб/час. Данный тип виртуальный машины используется также при разработке и внедрении нового функционала системы анализа данных и доработке сайта.

16.1.1.3. Проблема выбора базы данных

В ходе работы с данными стала понятна необходимость использования специального инструмента для хранения и контроля версий данных мультиомного профилирования. Был произведен анализ реляционных и нереляционных баз данных, наиболее соответствующих задачам проекта.

Для хранения обработанных экспериментальных данных необходимо было выбрать систему управления базами данных, удовлетворяющую следующим критериям:

1. Поддержка динамического создания схем данных, перечисления ключей экземпляров объектов;

2. Редактируемость: способность редактировать схемы «на лету», когда оператор базы данных может, работая с обработанными данными, изменять их;

3. Возможность сохранять вариативные данные, данные с пропущенными ключами, данные с расходящимися структурами.

В качестве базы данных было решено использовать инструмент Mongo DB, который относится к нереляционным базам данных и предназначен для работы с "большими" данными и "сырыми" файлами, то есть предоставляет возможность загружать напрямую в базу данных результаты мультиомного анализа не только в виде табличных результатов профилирования, но и в сыром виде, как на выходе приборов мультиомного анализа.

В первой итерации экспериментов сервер базы данных работал напрямую с виртуальной машины MOLE. В дальнейшем для оптимизации было решено использовать предоставляемый Yandex Cloud кластер для выделенной работы с базой данных Mongo. Таким образом, операции с данными работают отдельно от

основного сервера, используя специальные для такого типа кластера оптимизации операций. Это позволило снять с сервера нагрузку на фильтрацию данных, удобно работать с выделенными для хранения данных хранилищами данных мультиомного профилирования, оперировать большими объемами данных в параллели и значительно повысить общую скорость работы.

16.1.1.4. Кластерное представление данных

Функционал Yandex Cloud позволяет MongoDB поддерживать работу на выделенном кластере, что является преимуществом с точки зрения использования вычислительных средств и организации памяти.

На первых этапах разработки БД для хранения мультиомных данных MongoDB представлял собой локальный инстанс с веб-сервером на удовлетворяющей системным критериям институтской машине, однако испытания системы показали, что во избежание разделения процессов обучения и прогона моделей глубоких нейронных сетей для работы эффективнее использовать облачный кластер.

Кластерное хранение данных позволяет переложить время репликации журналирования и обеспечения целостности данных на готовые, проверенные системы. При этом использование кластера баз данных в локальной сети с вебсервером и нейросетевым модулем не обнаруживает больших задержек при чтении данных по сравнению с использованием локальной файловой системы. Временные издержки на сетевое подключение и установление соединения составляют не более 10 мс.

Оператору БД при облачном хранении на кластере больше не нужно следить за сохранностью данных посредством создания резервных копий в ручном режиме, эта ответственность переходит на провайдера. Кроме того, затраты вычислительных мощностей также переносятся с локальной системы на кластер.

Исходя из вышеперечисленных соображений, было принято решение отказаться от первоначальной идеи хранения сырых файлов в файловой системе одного серверного компьютера и вместо этого ориентироваться на кластерное хранение.

16.1.1.5. Хранение файлов

Хранение исходных (сырых) файлов в файловой системе подразумевает принятие рисков изменения в имени файла, ошибки в пути хранения, а также не защищено от стирания. Кроме того, при каждой смене физического хранилища и ОС потребуется вручную менять все пути в базе данных. Размер сырых файлов предполагают долгую передачу по сети.

Чтобы нивелировать перечисленные проблемы и риски, для хранения сырых файлов необходимо было выбрать хранилище, удовлетворяющее следующим критериям:

1. Поддержка параллельной выгрузки частей файла. Необходимо для обеспечения машинной выгрузки:

2. Минимальная зависимость от файловой системы и проблемы путей

3. Невозможность изменения структуры хранения по ошибке

4. Устойчивость к отказу дисков, ошибке оператора

По причине использования MongoDB в качестве основного хранилища обработанных данных была выбрана тесно интегрированная с Mongo система – Grid FS.



Рисунок 16.2 – Хранилище файлов GridFS. Предобработка CSV-файлов и сырых RAW-файлов при загрузке в систему происходит по-разному, для хранения бинарных файлов требуется дополнительная утилита

Система создает две коллекции в MongoDB – суффиксы имени –files, chunks. Коллекция raw-files содержит дескрипторы файлов: имена, мету и идентификатор дескриптора, а коллекция raw-chunks содержит бинарные части файлов и идентификатор дескриптора файла для параллельной сборки.

Такое устройство системы позволяет решить перечисленные выше проблемы. Данные можно как загружать, так и выгружать из хранилища с любого места, доступна параллельная загрузка нескольких файлов, и даже при удалении файла его резервные копии будут храниться серверах cloud-провайдера до недели.

16.1.2. Нейросетевой компонент БД

Нейросетевой компонент системы служит для экстраполяции результатов замеров мультиомного профилирования на гены, которые не были задействованы в результате эксперимента in vitro. Данный подход позволяет получить модель, которая способна расширить выборку без затраты временных ресурсов лаборатории и реактивов. Основным использованием является предсказание белковой активности гена по известному РНК-профилированию.

16.1.2.1. Входные данные

a) Идентификатор гена базы данных Uniprot

Запуск модели глубокой нейронной сети производится по известному гену. Все пакеты для импорта или экспорта данных построены на Uniprot ID. К Uniprot исполняется запрос по конкретному ID, и соответствующий json-файл скачивается и кэшируется посредством официального API. Этот файл содержит информацию о позиции гена, номере хромосомы, аминокислотной последовательности и пр., пример содержания подобного файла отражен на рисунке 16.3 (а).



Рисунок 16.3 — (a) — демонстрация содержимого json-файла, официального API Uniprot. Включает в себя Uniprot ID, аминокислотную последовательность, список возможных имен, указание хромосомы, позицию гена в геноме и прочую геноцентричную информацию, которая хранится непосредственно в Uniprot. (б) базы данных геноцентричных маппингов из Uniprot

б) Геноцентричные маппинги из Uniprot

Uniprot поддерживает маппинги (т.е. определение соответствия данных) между 22 базами данных, представленных на рисунке 16.3 (б). Они содержатся в едином файле и используются для маппинга в полном объеме, хотя для векторизации привлекаются только те из них, соответствие признаков гена в которых не один-к-одному, а один ко многим (в том числе GO, PDB и PubMed).

в) Данные эксперимента

Пользователем загружаются данные эксперимента мультиомного профилирования. Например, если перед исследователем стоит задача – предсказать белковую активность гена по РНК-профилированию, то подлежат загрузке данные РНК-секвенирования, ID исследуемой ткани и ID ткани, в которой предполагается измерить количество белков (рисунок 16.4 (а)). В одном месте указывается алфавит РНК-экспериментов, в других белковых. Обучение модели глубокой нейронной сети производится на публичных наборах данных.

```
"tissue29_salivary.gland",
"tissue29_small.intestine",
"tissue29_smooth.muscle",
"tissue29_spleen",
"tissue29_stomach",
"tissue29_testis",
"tissue29_thyroid",
"tissue29_tonsil",
"tissue29_urinary.bladder"
```



oio_dl > test	data > {} prot_abundance_regressor.015_config.json > [] rna_exps_alphabet > 🔤 6
1 {	
2	<pre>"net_name": "prot_abundance_regressor.015",</pre>
3	"inference_shape": [
4	1,
5	10,
6	256,
7	20
8],
9	"denorm_max_label": 13.292217538192814,
10	"rna_exps_alphabet": [
11	"tissue29_adipose.tissue",
12	"tissue29_adrenal.gland",
13	"tissue29_appendix",
14	"tissue29_bone.marrow",
15	"tissue29_colon",

(B)



Рисунок 16.4 – (a) – принцип обозначения экспериментальных данных. Через нижний подчерк первым идет название датасета, затем – название ткани. Таким образом, в примере на рисунке перечислены ткани, которые входят в датасет tissue29. (б) – структура конфига нейронной сети, «inference_shape». Представлено 10-канальное изображение с шириной 256, высотой 20. (в) – файлы подготовленной сети

г) Конфигурационный файл модели нейронной сети

У каждой модели глубокой нейронной сети есть свой конфигурационный файл. В нем указывается имя сети, размерность входного тензора, получаемого при векторизации данных для прохода через сеть (рисунок 16.4 (б)).

На рисунке 16.4 (в) представлен укороченный список экспериментов. Сначала прописываются данные РНК-экспериментов, потом – данные белковых экспериментов. Далее перечисляются базы данных, которые предполагается использовать в картировании для конкретного гена. Сопоставление не идет «одинк-одному»: к одному и тому же гену может относиться сотня ключевых слов из базы данных.

Обучение сети организовано геноцентрично. Тестовыми являются те гены, на

которых сеть не училась ранее. Таким образом, валидация утяжеляется, но ее качество кратно возрастает. Кросс-валидация не применяется во избежание переобучения сети.

Каждая сетевая папка, хранящаяся в системе, состоит из файлов формата «.pt», который представляет собой веса сети (рисунок 16.5) относительно определенной эпохи обучения.

Файл формата «Log.txt» содержит логи обучения и метрики, которые были при обучении. Алфавит базы данных отражает, какие маппинги из баз данных использовались для непосредственного формирования каналов по базам данных, представляет собой алфавит используемых уникальных ID. Для следующего поколения моделей он останется неизменным.

Выбор глубины модели и логика формирования входного тензора сети зависит от задачи и размера обучающей выборки. Реализованный подход к обучению нейронных сетей позволяет использовать несколько графических ускорителей, динамически менять гиперпараметры обучения сети, дообучать и переобучать подготовленные ранее модели глубоких нейронных сетей. Основной текущей сетевой архитектурой являются глубокие сверточные сети семейства ResNet. Так же внедряются модели «с вниманием», получившие известность благодаря решению задач машинного перевода текстов.

prot_abundance_regressor.015/
<pre>prot_abundance_regressor.015/prot_abundance_regressor.015_0015.pt</pre>
<pre>prot_abundance_regressor.015/prot_abundance_regressor.015_log.txt</pre>
prot_abundance_regressor.015/prot_abundance_regressor.015_databases_alphs.json
<pre>prot_abundance_regressor.015/prot_abundance_regressor.015_0007.pt</pre>
<pre>prot_abundance_regressor.015/prot_abundance_regressor.015_gpu.001_log.txt</pre>
<pre>prot_abundance_regressor.015/prot_abundance_regressor.015_config.json</pre>
<pre>prot_abundance_regressor.015/prot_abundance_regressor.015_gpu.000_log.tx</pre>

Рисунок 16.5 – Пример набора файлов модели сети с выбранными на экспорт эпохами 7 и 15

Набор данных, используемых в обучении, всегда ограничен. Один проход всей обучающей выборки через сеть называется эпохой. Во время этого процесса меняются веса, после его окончания веса сеть «замораживаются». В конце эпохи работа сети проверяется на всей или части тестовой выборки в зависимости от настроек конфигурационного файла обучения, фиксируются метрики; сохраняются веса лучших моделей исходя из результатов. Эти эпохи далее отбираются на экспорт



16.1.2.2. Использование моделей глубоких нейронных сетей

Рисунок 16.6 — Схема использования нейросетевых моделей. Основополагающей является связь между тремя нейросетевыми компонентами — аугментации, векторизации и экстраполяции данных — с базой данных и запросами пользователя

При прохождении запроса на экстраполяцию данных сам факт запроса записывается в базу данных, а запрос отправляется на сервер обслуживания моделей (рисунок 16.6).

Сервер обслуживания моделей состоит из двух частей – это модуль загрузки обученных ранее моделей в память для дальнейшего использования, который позволяет работать с несколькими моделями и выгружать их из памяти при отсутствии запросов, и Python HTTP-сервер, который обрабатывает запросы, этот модуль устанавливает взаимодействие между сетевой частью и базой данных.

При получении запроса запускается процесс torchserve, который загружает модели. Модель загружена в оперативную память и готова работать на сервере; при этом сервер по умолчанию запущен в СРU-режиме.

Данные и ID сети передаются далее в компонент аугментации данных, где происходит расширение обучающей выборки. На этом этапе пользователь в запросе может послать данные на модификацию, по умолчанию мутации данных отключены для использования обученной модели.

Затем данные попадают в компонент векторизации данных, где происходит

обработка для входа в нейронную сеть. Данные векторизуются, в результате чего получается входной тензор формата NCHW, где N — число генов в запросе, то есть модель может работать сразу для одного и более генов, количество которых ограничено только имеющейся памятью. Далее в компоненте экстраполяции данных происходит непосредственно прогон модели нейронной сети, эксперименты обрабатываются, после чего данные модельного предсказания через сервер обслуживания пересылаются в базу данных.

В запросе будет указано, что он выполнен, также сформируется ссылка на заказчика экстраполяции. Данные об экстраполяции и ее результаты затем попадут в базу под специальным флагом, маркирующим эксперимент in silico, что позволит отличить их от экспериментальных данных лабораторного мультиомного профилирования.

При необходимости произвести экстраполяцию большого набора данных, если пользователь обладает достаточными правами для обучения, сервер вместо стандартного CPU-режима можно перевести в GPU-режим, для этого виртуальная машина должна перезапуститься, в контексте прогона сети можно использовать несколько графических ускорителей.

16.1.2.3. Обучение моделей глубоких нейронных сетей



Рисунок 16.7 – Схема обучения моделей глубоких нейронных сетей. В общем каскаде технологических операций место компонента экстраполяции данных занимает компонент обучения, возвращающий информацию на сервер обслуживания моделей

В случае, когда необходимо обучить нейросетевую модель на новом наборе экспериментов мультиомного профилирования, пользователь должен загрузить данные на сайт и указать в запросе, на каком эталонном наборе данных (одном или нескольких) будет происходить обучение (рисунок 16.7). С домена moleavogadro.ru в базу данных и на сервер обслуживания моделей отправляются запрос на обучение сети и набор данных для обучения.

При условии, что пользователь обладает достаточными правами для обучения, сервер вместо стандартного CPU-режима перейдет в GPU-режим, для этого виртуальная машина должна перезапуститься, в контексте обучения можно использовать несколько графических ускорителей. Далее аналогичный процесс запускается вновь: в сервер обслуживания моделей поступают данные для обучения, данные и ID сети поступают в компонент аугментации данных. Компонент аугментации данных в момент обучения работает динамически в онлайн-режиме.

Идея вноса нарушений («disturbances») или мутаций применительно к биомедицинским данным была взята из подходов к машинному обучению для решения задач компьютерного зрения в сфере беспилотных средств передвижения. Согласно этой стратегии компонент аугментации данных каждую эпоху случайным образом модифицирует данные так, чтобы сеть могла правильно реагировать на небольшие произошедшие изменения. В качестве подобных модификаций могут применяться, например, случайное обнуление некоторых маппингов признаков баз данных, внесение шума, укорачивание доступной для модели аминокислотной последовательности и пр. Таким образом, параметры варьируются случайным образом для получения стабильной модели.

Затем из компонента аугментации данные передаются в компонент векторизации данных, где происходит переработка данных для работы нейросети. Наконец, входной тензор формата NCHW подается в компонент обучения моделей.

Компонент обучения моделей отличается от компонента запуска моделей. Во время работы компонента обучения происходит собственно обучение и дообучение модели, сохранение лучших эпох, сбор статистики, сохранение log-файлов. Обратно на сервер обслуживания отправляются данные о результатах обучения. В зависимости от результатов вычисления метрик обучения модели на тестовом наборе данных принимается решение о сохранении нового поколения сети в базу данных для дальнейшего использования. Из сервера обслуживания моделей при этом подается папка с весами модели и конфигурационными файлами сети, т.е. с результатами обучения.

Для симуляции мутаций биомедицинских данных компонент аугментации данных каждую эпоху случайным образом модифицирует данные так, чтобы сеть правильно реагировала на небольшие произошедшие изменения, например, случайное обнуление некоторых маппингов признаков баз данных, внесение шума, укорачивание доступной для модели аминокислотной последовательности и пр. Параметры, варьируясь случайным образом, обеспечивают стабильность модели. Затем из компонента аугментации данные передаются в компонент векторизации данных, где происходит переработка данных для работы нейросети. Наконец, входной тензор формата NCHW подается в компонент обучения моделей.

16.2. Подготовка данных для исследовательских испытаний БД

16.2.1. Подготовка данных транскриптомных исследований

В данном разделе отчета представлены результаты исследований, которые интегрируются в цифровой формат системы MOLE. Возможность этого была показана на примере молекулярных данных, полученных с помощью протеомики и метаболомики. Однако в этом случае модель данных совпадала с общепринятом форматом. Более интересен был случай с транскриптомными данными, чему уделено в отчете особое внимание.

При анализе транскриптомных ланных использованы результаты использованием наноразмерной секвенирования с поры. Дополнительные материалы, использованные при анализе приведены в Приложении Д. Эта наиболее близка к российским разработкам и может быть технология воспроизведена в импортозамещающем формате на базе системообразующих предприятий микроэлектронной промышленности.

Анализ траскриптомных данных показал результаты поэтапной трансформации молекулярного профиля человека в цифровой формат: во-первых, гистограммы распределения сплайс-вариантов. Эти гистограммы показали, что количество сплайс-вариантов на один фармакоген не отличается по сравнению со всем геномом человека. Однако эти гистограммы отличаются для клеточных линий по сравнению с печеночной тканью.

Анализ принципиальных компонент показал отличия между клеточными линиями и тканью печени в том случае, если выбрана адекватная метрика. Именно – интервальная оценка числа сплайс-форм в интервалах, нормированных на миллион ридов транскриптов (значения ТРМ). Правомочность этого вывода мы подтвердили, сопоставляя уровень экспрессии сплайс-форм всего транскриптома в белоккодирующих областях генома человека co случайно сгенерированными значениями ТРМ. Более того, таблицы интервальных оценок позволили установить отсечку на значения уровня экспрессии, Которое совпало в пределах порядка с опубликованными данными и составило TPM >=1. Неожиданный результат – такую оценку давали для анализа генов, и оказалось, что она пригодна не только для всех генов, но и для фармакогенов, причем даже для сплайс-вариантов, играющих ключевую роль в метаболизме лекарств.

Были построены диаграммы Венна, чтобы выявить так называемые суперспецифичные и просто специфичные фармакогены. Для супер-специфичных, которые встречаются только в ткани печени или только в одной из клеточных линий, мы показали, что существует 19 генов и 25 транскриптов, отличающихся по уровню сплайсинга. Немногим меньше наблюдалось И для квази-специфичных фармакогенов, которые могли встречаться не в одном типе биоматериала, а в двух: в клеточной линии Huh7 и в клетках HepG2. В таких случаях квази-специфичности обнаружено 18 генов на 22 транскрипта. Также показано, что только 14 генов и 14 транскриптов характеризовались тау-индексом специфичности на уровне более 0,7. тканеспецифичных Установлено. что большинство по сплайс-вариантам фармакогенов экспрессируют хоть и разные по длине транскрипты, но на уровне протеома реализуют себя как одна и та же форма белка.

16.2.1.1. Информация о структуре исходных файлов

Для отработки использовали данные, полученные на секвенаторе MinION (Oxford Nanopore Technology) в одиночных циклах в течение 48 часов с использованием проточных кювет FLO-MIN106 и набора для прямого секвенирования PHK (SQK-RNA002, ONT, Оксфорд, Великобритания), размещенные в открытом доступе, в том числе датасет SRA-Huh7.

Исходные данные представляли собой три типа образцов. Во-первых, клеточная линия HepG2 в количестве технических повторов n = 5. Данные были получены в результате эксперимента, в котором уделялось внимание стандартизации как по экспериментальным условиям, так и по биологическим повторам [381].

Вторая группа данных была получена для клеточной линии Huh7 для трех разных образцов из одного источника (образцы предоставлены ИМБ им. В.А. Энгельгардта).

Третья группа данных представлена образцами здоровой печени (n = 3), полученных при резекции трупной печени без морфологически или гистологически наблюдаемых изменений [382]. Доноры погибли при условиях, не связанных с печеночными патологиями.

В совокупности было 5 технических повторов HepG2, 3 повтора Huh7 и по одному повтору от 3-х доноров печени, что в сумме составляет 11 датасетов

(Таблица 16.1).

Biotype		Size, Gb	Remarks	SRA	Num fastqc
HepG2	Tr1	174	Highly standardized experiments	80	217
	Tr2	84,6		559	306
	Tr3	152		IA70	349
	Tr4	209		RJN 1	725
	Tr5	160		Ъ	594
Huh7	Tr1	71,1	IBMC lab	71	450
				IA89357	
	Tr2	80,7	Cross lab	S I	560
	Tr3	120	Cross lab	Id	570
Human	D1	78,7	Fresh chip	2	493
Liver		21,2		530	
	D3	28,9	Non-fresh chip (lockdown)	A635	198
		8,74		, Z	
	D5	27,7	Fresh chip, long lying sample	PR	231

Таблица 16.1 – Исходные датасеты по клеточным линиям HepG2, Huh7 и по тканям печени человека.

Примечание - Donorl_transcriptome_1 и Donorl_transcriptome_2 – один и тот же эксперимент, в котором прочитали 78 Гб, потом промыли чип, загрузили ту же библиотеку на промытый чип и дополнительно считали еще 21 Гб. Аналогичная ситуация для донора 3 [382].

Таблица 16.1 (колонка «Remarks») показывает особенность исходных данных в отношении образцов печени. Для анализа печени донора 1 использовался оксфордский секвенатор со «свежими» чипами. Однако для донора 3 срок годности MinION-чипа был существенно превышен вследствие карантинных условий 2020 года. Для донора 5 чип был новый, однако ко времени секвенирования образец печени провел в холодильнике на -80 уже более 8 месяцев, по сравнению с донором 1.

16.2.1.2. Схема обработки исходных данных

На схеме, приведенной на Рисунке 16.8, показан алгоритм обработки данных (справа), а также графическое представление исходных данных, в соответствии с Таблицей 16.1.

Обработка применялась ранее данных ДЛЯ всех файлов согласно опубликованной стандартной процедуре [383]. Бейзколлинг осуществляли программой guppy basecaller, качество бейзколлинга контролировали с

использованием программы MinIonQC. Для выравнивания чтений на геном применяли программу minimap2 с опцией учета сплайсинга. Программу samtools использовали для получения данных о количестве картированных на транскриптом ридов. С использованием подпрограммы salmon quant провели подсчет содержания транскриптов в образцах, выраженное в виде количества ридов, а также — в нормированных единицах ТРМ. Из результирующих файлов отобрали белок-кодирующие гены с использованием сборки генома Gencode38 (релиз GRCh40).



Рисунок 16.8 — (а) Графическое представление 11 образцов исходных данных. Данные размещены на сетевом диске ИБМХ/MinilON и распределены по трем папкам, внутри которых есть подпапки по названию образца; (б) Алгоритм обработки данных, полученных оксфордской нанопорой. Для расчетов использовали вычислительную машину Yandex.Cloud, обработка выполнялась на виртуальной машине со следующими характеристиками: платформа — Intel Broadwell with NVIDIA® Tesla® V100, vCPU = 8, GPU = 1, RAM = 64 Gb

В ходе подготовки данных была построена базовая таблица (Таблица 16.2), содержащая результаты вывода программы salmon quant, где каждый ген характеризовался совокупностью транскриптов, а каждому транскрипту соответствовало значение ТРМ. 87 тысяч строк соответствует количеству белок-кодирующих транскриптов человека согласно сборке генома Gencode38 (релиз GRCh40).

	, ,	1			1	1							
	ENSG ENST		11 образцов										
			TPM										
			Hep_	Huh_	Liv_	Hep_	Huh_	Liv_					
1	ENSG00000141552	ENST00000612413	0,0	0,0	15,3	0,0	5,3	13,2	•				
2	ENSG0000259417	ENST00000560778	0,0	0,0	2,7	11,1	14,8	9,9	· 				
3	ENSG00000129757 .15	ENST00000414822 .8	0,0	0,0	9,9	7,8	0,0	3,9					
4	ENSG00000140264 .21	ENST0000249786 .9	409,1	346,0	760, 3	527,1	348,1	329, 7					
8780 9	ENSG00000221988 .13	ENST00000395523 .5	34,0	18,9	33,4	19,5	5,2	5,9					
8781 0	ENSG00000111224 .14	ENST00000228820 .9	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5	2,0					
8781 1	ENSG00000223496 .3	ENST00000435634 .3	24,7	31,1	49,7	35,3	9,6	7,9					
8781 2	ENSG00000176658 .17	ENST00000318217 .10	13,9	13,3	24,4	17,6	6,7	15,8					
8781 3	ENSG00000138801 .9	ENST00000265174 .5	66,4	60,0	35,3	26,8	5,2	5,9					
8781 4	ENSG00000120725 .13	ENST00000394817 .7	27,8	34,4	34,3	28,1	21,1	63,0					

Таблица 16.2 – Таблица значений экспрессии каждого транскрипта.

Таблицу 16.2 преобразовали таким образом, чтобы дискретно охарактеризовать количество транскриптов, встречающихся при заданном пороге отсечения значения ТРМ. Для представления данных были построены срезы по отсечкам по ТРМ равные 0.1, 1, 5, 10, 50 и 100. При каждом уровне отсечения вычисляли количество изоформ, ТРМ для которых выше обозначенного порога и которые одновременно относятся к одному гену (Таблица 16.3). 19700 строк соответствуют количеству генов человека согласно сборке генома Gencode38.

	ENSG	11 образцов × 6 отсечений = 66 колонок																		
		Hep_1							Huh_1						Liv_1					
		Количество изоформ, TPM ≥															· ·			
		0. 1	1	5	1 0	5 0	10 0	0. 1	1	5	1 0	5 0	10 0	0. 1	1	5	1 0	5 0	10 0	
1	ENSG0000014 1552.18	6	6	3	3	1	0	1 1	1 1	8	7	2	0	6	6	5	3	0	0	
2	ENSG0000025 9417.3	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	
3	ENSG0000012 9757.15	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	
4	ENSG0000014 0264.21	3	3	2	2	2	2	5	5	4	3	2	2	6	5	3	2	2	2	
196 95	ENSG0000022 1988.13	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	
196 96	ENSG0000011 1224.14	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	
196 97	ENSG0000022 3496.3	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	
196 98	ENSG0000017 6658.17	1	1	1	1	0	0	2	2	1	1	0	0	2	1	1	0	0	0	
196 99	ENSG0000013 8801.9	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	
197 00	ENSG0000012 0725.13	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	2	2	2	2	0	0	

Таблица 16.3 – Количество изоформ в каждой фракции каждого образца.

Способ вычисления отсечки заключался в том, что значения в таблице 16.3 в каждой колонке накапливались. Например, колонка TPM \geq 1 содержала количество изоформ последующих колонок, т.е. включала данные отсечек с большим порогом (TPM \geq 5, TPM \geq 10, TPM \geq 50 и TPM \geq 100). Таблица 16.3 иллюстрирует метод развертки профиля сплайс-вариантов генов в соответствии с уровнем экспрессии изоформ.

16.2.1.3. Гистограммы распределения сплайс-вариантов

Для образцов ткани печени и клеточных линий была построена гистограмма распределения значений ТРМ с учетом количества изоформ для каждого гена человека. На гистограмме показано, как снижается количество изоформ в результатах секвенирования оксфордской нанопорой (рисунок 16.9 (а) и 16.9 (б)).



Рисунок 16.9 — Гистограмма усредненных между биологическими повторами уровней экспрессии (TPM) транскриптов (ENST) для трех типов биологического материала согласно результатам ОНТ-секвенирования. Гистограммы построены: (а) для набора из 87 тыс. транскриптов генов человека (UniProt, Release 2022_03), FTL – Ferritin Light Chain, ALB – Serum Albumin; (б) для транскриптов фармакогенов по статье Чибера [384], ALB – Serum Albumin. По оси у – накопленная частота транскриптов в логарифмической шкале

Гистограмма является первым этапом, определяющим ход подготовки мультиомной информации (транскриптомной части) к загрузке в разрабатываемую базу данных. Ожидаемо, что максимальное количество изоформ наблюдается у генов при выборе низкой отсечки ТРМ. Также видно, что при анализе всех генов человека, как и для фармакогенов (см. рис. 16.9 (б)) всех генов человека характерен максимум на уровне значений ТРМ немногим более нуля (нулевые значения ТРМ в гистограммы не включены). Ранее интенсивный сплайсинг высокоэкспрессируемых генов был подтвержден в работах по крупномасштабному исследованию транскриптома и протеома [385].

В каждом типе биоматериала наблюдали несколько превалирующих в отношении сплайсинга изоформ, наиболее часто — всего одна сплайсеоформа. То есть один транскрипт по оценке уровня экспрессия с помощью TPM «забивал» минорные изоформы. При построении профиля фармакогенов, что поставлено нашей целью, учитывать в профиле минорные сплайс-формы некорректно, как минимум в силу сомнений в их достоверности.

16.2.1.4. Метрика, учитывающая спласинг фармакогенов. Анализ главных компонент

В качестве изоформ-учитывающей метрики каждый из биологических образцов характеризовали набором дескрипторов. Дескриптором служил набор значений, равных количеству изоформ, детектированных в образце с уровнем

ТРМ выше определенного порогового, либо, количество изоформ со значениями ТРМ в интервале «от-до». Результаты применения метода принципиальных компонент к нашим данным приведены на рисунках 16.10 и 16.11. Для полного набора генов (рисунок 16.10а) в сравнении с выборкой фармакогенов (рисунок 16.10б) применяли анализ главных компонент для перечней дескрипторов, учитывающих изоформы.

Были построены карты для отображения зависимости ТРМ от количества наблюдаемых генов и изоформ. Сократили пространство генов, количество транскриптов в гене и в образце до двух главных компонент и обнаружили, что образцы интактной печени группируются обособленно от образцов клеточных линий.




Рисунок 16.10 – Анализ главных компонент для образцов на основе сопоставления интегральных изоформ-учитывающих метрик при 6 отсечках $TPM \ge 0.1$, $TPM \ge 1$, $TPM \ge 5$, $TPM \ge 10$, $TPM \ge 50$, $TPM \ge 100$. (a) PCA-пространство количества изоформ на ген (размерность = 19700). Точки (66 штук) – образцы с отсечками. Всего количество образцов составляет 11 штук. Доли объясненной дисперсии: PC1=0.59, PC2=0.07. (b) PCA по количеству изоформ на один фармакоген (размерность = 19700). Точки (66 штук) – образцы с отсечками. Доли объясненной дисперсии: PC1=0.46 и PC2=0.19

Анализ принципиальных компонент является вычислительным методом, работающим "без учителя" и основанным на перемножении матриц. В нашем случае, колонками матрицы являются гены, а дескрипторами — образцы. Каждая ячейка исходной матрицы содержала значение, характеризующее: сколько изоформ определенного гена встретилось в образце, при некотором значении отсечки, применяемой к уровню экспрессии транскрипта в единицах ТПМ.

На рисунке 16.10 показано, что точки, характеризующие образцы при заданных отсечках по ТРМ, образуют группы. Представлены три большие группы точек пространства всех транскриптов (см. Рисунок 16.10а), обозначенные буквами А, В и С, а также три большие группы в проекции на плоскость набора фармакогенов (см. Рисунок 16.10б), обозначенные буквами А, В, С. Точки на графике группируются иерархически: каждая большая система содержит малые подсистемы.

Первая компонента (ось Х) объясняет 59% дисперсии значений ТРМ, разделяя

печень и клеточные линии. По оси У вторая компонента (7%) позволила нам разделить образцы с средне- и низкокопийными значениями TPM (0.1-10) между верхним и нижним кластером – образцы печени и клеточные линии, соответственно.

Рисунок 16.10а отражает пространство образцов, каждый из которых охарактеризован набором дескрипторов, полученных на основе анализа уровня экспрессии всех генов человека. Видно, что ПО количеству изоформ высококопийных транскриптов (TPM ≥ 50) интактная печень не отличается от клеточных линий HepG2 и Huh7, см. область А на рисунке. При уменьшении отсечки до TPM ≥ 1 видно, что точки, относящиеся к печени, начинают «отдаляться» от клеточных линий. Это указывает, что зависящие от сплайсинга различия печени от клеточных линий определяется, в первую очередь, фракцией слабоэксперссируемых генов. Можно заметить, что клеточные линии Huh7 и HepG2 по профилю сплайсвариантов схожи (см. Рис. 16.10а, область С). Предположительное объяснение здесь следующее: интенсивность альтернативного сплайсинга характеризует отличие нормальной ткани печени, от клеточных линий, обладающих способностью к неограниченному делению.

Исследуемые клеточные линии были взяты от раковых опухолей, поэтому можно предположить, что более широкий профиль сплайс-вариантов транскриптов, характерен для онко-трансформации. Таким образом, определение профиля экспрессируемых сплайс-вариантов генов может быть диагностическим маркером риска онкологического заболевания, независимо от того, какие именно гены «распушают» свой сплайсинг. Обосновано, что интенсивность альтернативного сплайсинга изменяется при раковой трансформации клетки.

Анализ данных по фармакогенам показал, что они ведут себя неодинаково в разных фракциях по отсечкам ТРМ. Рассматривая часть транскриптома фармакогенов (см. Рис. 16.10(б)), мы наблюдаем, что высококопийные транскрипты печени и клеточных линий при TPM \geq 50 также объединились в отдельную систему А. Наиболее сложную структуру имеет система С. Группа точек, обозначенная С1, характеризует количество сплайс-вариантов HepG2, Huh7 и образцов печени при отсечениях по TPM \geq 5 и TPM \geq 10. Кластер C1 содержит как однородные группы точек C5 – образцы печени, C6 и C7 – образцы HepG2, так и неоднородные: C3 – HepG2 и Huh7, C4 – HepG2 и образцы печени. Подобная группировка точек внутри

кластера C1 показывает, что фармакогены неоднородны по интенсивности альтернативного сплайсинга в пределах разных фракций.

Более значимые различия профиля экспрессии наблюдаются для изоформ, которые экспрессируются в диапазоне 0.1-10 ТРМ, по сравнению с диапазоном ТРМ > 10.

На рисунке 16.11 представлен результат РСА анализа образцов на основе характеристик ТРМ транскриптов.



Рисунок 16.11 – Анализ принципиальных компонент на основе значений ТРМ, полученных методом оксфордской нанопоры. Доля объясненной дисперсии (а) для всех генов PC1=0.78, PC2=0.085, (б) для фармакогенов PC1=0.78, PC2=0.08

При построении рисунка 16.11 использовали значения TPM, суммируя TPM для изоформ каждого гена. На первой компоненте, объясняющей наибольший процент дисперсии (более 70%), наблюдали разделение образцов печени от клеточных линий. Точки клеточных линий компактизировались на рис. 16.11а и

16.11б в кластеры, обозначенные А, тогда как ткань печени – кластер В, обозначен зеленым – находится от кластеров группы А на существенном расстоянии по оси ОХ. Вторая компонента по оси ОУ показывает разделение между типами клеток, имитирующими гепатоциты, — как на Рис. 16.11а, так и на Рис. 16.11б данные клеточных линий HepG2 и Huh7 разделились.

Кластер точек для образцов печени на рис. 16.11 четко отличается от клеточных линий. Данный эффект связан с повышением уровня экспрессии любых генов, а не только фармакогенов – для проверки этого далее были запланированы эксперименты, где в качестве группы генов берутся гены хромосомы 18 человека.

На основе данных, приведенных на рис. 16.11, можно сделать заключение, что профиль сплайсинга позволяет разделить типы биологического материала более явно, чем анализ ТРМ с учетом сплайсинга. От печени одинаково далеко отстоят обе клеточные линии (см. Рис. 16.11а и Рис. 16.11б).

Анализ изоформ дает дополнительную картину при выделении фракций с разными отсечками по ТРМ (Рисунок 16.12).

Увеличение отсечки по значению ТРМ не влияет на распределение числа изоформ как для всей совокупности генов, так и для выборки фармакогенов. Изменяется только балансировка процентов объясненной дисперсии: доля объясненной дисперсии на рисунке 12 составила от 37% до 45% по первой компоненте, и от 20% до 22% по второй компоненте. Из этих данных можно предположить, что в клеточных линиях Huh7 и HepG2 количество изоформ отличается от ткани печени. В целом профили сплайсинга у Liver, HepG2 и Huh7 схожи, клеточные линии хорошо имитируют профиль сплайсинга ткани. Наряду с этим, те же самые клеточные линии, полученные в других условиях, или даже тот же самый образец, разделенный и секвенированный в разных повторах, может давать ошибку при анализе действий фармакологических лекарств.



Рисунок 16.12 – РСА количества сплайс-форм на каждый ген для всех образцов при отсечках: а) $TPM \ge 5$, PC1 = 0.38, PC2 = 0.21; б) $TPM \ge 10$, PC1 = 0.42, PC2 = 0.21; в) $TPM \ge 50$, PC1 = 0.45, PC2 = 0.21

Удалив высокоэкспрессируемые транскрипты из рисунка 10а (TPM ≥ 50 и TPM ≥ 100), были построены PCA для этого пространства профилей (рисунок 16.13).

На рисунке 16.13 наблюдается влияние отсечек на значения по ТРМ. Особенность рисунка в том, что для построения «скаттерплота» в координатах принципиальных компонент использовались случайно-сгенерированные данные.

На врезке показано, как данные, полученные в результате ONTсеквенирования, отличаются от случайных массивов значений TPM, отобранных из характерных для данного секвенирования биоматериалов.

Согласно рисунку 16.13 печень характеризуется более высоким уровнем экспрессии, и поэтому кластеризуется в правом нижнем углу. На другом конце рисунка (левый верхний угол) наблюдается кластер, связанный с низкими значениями TPM, где мы наблюдаем в основном Huh7 и HepG2. В печени гены экспрессируются активнее, тем самым оказывается положительный эффект на богатство изоформ в более высоком диапазоне значений TPM (5-10).



Рисунок 16.13 – Упорядочивание образцов ткани печени и клеточных линий для всех транскриптов по количеству изоформ с уровнем экспрессии (ТРМ) от 0.1 до 10 методом РСА. Рисунок построен с использованием симуляции данных. Доля объясненной дисперсии – 0.3 по оси X и 0.21 по оси У. На врезке — график, показывающий, как соотносится основной рисунок с картой принципиальных компонент, на которой присутствуют точки по симулированным данным

На рисунке 16.13 показано, что образцы печени при отсечке ТРМ ≥ 10 имеют характерный набор показателей, отличающихся по паттерну количества изоформ. Важно подчеркнуть, что на рис. 16.13 поставлен случай, когда экспериментальные значения образуют кластер, удаленный от области случайных значений ТРМ (см. врезку). То есть, вводя в анализ принципиальных компонент некоторое количество симулированных точек, мы видим, что данные сохраняют общие черты кластеризации, которые мы наблюдали на рис. 16.10а (все гены).

Интересно, что кластеризация методом главных компонент по изоформам в целом совпадает с кластеризацией образцов на Рис. 16.10, где использовали в качестве характеристик не количество изоформ, а суммарные значения ТРМ для каждого гена (суммируя ТРМ по всем изоформам и используя сумму как дескриптор гена по всем образцам). Можно заключить, что полученные на Рис. 16.13 кластеры сопоставимы с кластерами, сформированными по значениям ТРМ без учета интегральной метрики.

16.2.1.5. Исследование фракций сплайс-форм фармакогенов при различных значениях ТРМ

Проведен анализ количества изоформ на один ген в каждой из фракций значений ТРМ: от 0,1 до 1, далее [1,5], [5, 10] и т.д. Для каждой фракции провели нормировку с учетом изоформ, встретившихся в анализируемых нами образцах, по отношению к количеству референсных форм, т.е. известных из базы данных UniProt:

score_sum =
$$\frac{\sum \text{ splice-forms } X}{\text{ reference UniProt}}, \ \alpha \leq TPM(x) \leq \beta$$

где X –сплайс-формы, обнаруженные экспериментально в исследуемом в нашей работе биоматериале, α и β – нижняя и верхняя границы интервала ТРМ.

Была составлена таблица, показывающую сумму нормированных изоформ в каждой фракции для всех образцов и отдельно для каждого типа клеток (Таблица 16.4).

В Таблице 16.4 приведены сведения по 9-ти интервалам значений ТРМ, начиная с [0.001; 0.1] и завершая интервалом ТРМ > 1000. Первые два ряда таблицы 16.4 отражают интервалы от минимального ненулевого значения до ТРМ=0,1 и от ТРМ=0,1 до ТРМ=1. Эти интервалы, соответствующие диапазону низкокопийных ТРМ, представлены крайне низкими значениями параметра score относительно последующих строк в таблице с более высокими ТРМ. При отсечке ТРМ до 1.0 при подсчете изоформ не нашлось ни одного случая, когда изоформа экспрессировалась бы выше предела детекции ОNT-прибора во всех исследуемых образцах. Мы предполагаем, что значения ТРМ <= 1,0 не следует принимать во внимание при профилировании сплайс-форм.

Исходя из изложенных наблюдений, был определен транскриптомный порог отсечения для инвентаризации сплайс-форм. Суммарное количество изоформ печени – 7959, когда у HepG2 и Huh7 1597 и 2634 изоформы, соответственно. Эта интегральная оценка уровня экспрессии существенно отличает печень по количеству изоформ и по суммарному значению параметра score от клеточных линий.

Таблица 16.4 — Сумма нормированных изоформ в интервалах ТРМ для всех образцов и отдельно для каждого типа клеток. п — количество генов, найденных в каждом интервале значений ТРМ, score — это сумма присутствущих во всех образцах изоформ, деленная на их референсное количество, ref — количество референсных (по UniProt) изоформ в данном интервале значений ТРМ. Колонка «all samples» кумулятивная по всем типам образцов

Интервал		all sample	es		HepG2			Huh7			Liver	
значений ТРМ	n	score	ref	n	score	ref	n	score	ref	n	score	ref
[0.001:0.1]	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0
[0.101:1.0]	0	0,0	0	0	0,0	0	1	0,5	11	271	203,5	2359
[1.001:5.0]	47	107,7	789	231	313,0	2331	641	505,5	5349	1581	1383,7	12455
[5.001:10.0]	11	13,4	297	59	41,2	962	231	152,0	2336	614	468,4	5162
[10.001:50.0]	423	1393,8	3344	1142	1781,9	7848	1411	1331,8	9205	3816	4008,6	22036
[50.001:100.0]	6	23,0	32	36	57,2	265	109	107,2	743	711	748,8	4028
[100.001:500.0]	74	308,0	367	118	211,8	673	218	226,6	1188	821	920,5	4395
[500.001:1000.0]	1	1,5	14	2	1,9	19	5	6,2	30	42	42,1	261
1000+	5	19,3	20	9	16,9	41	18	24,3	89	103	107,6	528
Сумма:	567	1866,6	4863	1597	2423,8	12139	2634	2354,1	18951	7959	7883,3	51224

(а) транскриптом всех генов человека.

(б) транскриптом фармакогенов.

Интервал	;	all samples			HepG2			Huh7			Liver	
значений ТРМ	n	score	ref	n	score	ref	n	score	ref	n	score	ref
[0.001:0.1]	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0
[0.101:1.0]	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0
[1.001:5.0]	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0
[5.001:10.0]	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0
[10.001:50.0]	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0
[50.001:100.0]	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0
[100.001:500.0]	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0
[500.001:1000.0]	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0
1000+	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0
Сумма:	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0

16.2.2. Подготовка карточек фармакогенов для загрузки в БД MOLE

При подготовке данных для таблиц 16.5-16.7 исключались значения ТРМ меньше или равные 0, то есть строки, в которых не встречалось ни одной изоформы свыше ТРМ=1, были удалены.

Таблица 16.5 – Профиль экспрессии сплайс-форм цитохромов P450, участвующих в биотрансформации ксенобиотиков

Gene	ENST	Hep1	Hep2	Hep3	Hep4	Hep5	Huh1	Huh2	Huh3	Liv1	Liv3	Liv5
	ENST00000379727.8	8	12	0	0	0	0	36	80	0	0	99
CYP1A1	ENST0000395048.6	0	0	2	0	0	140	106	45	5	0	0
	ENST00000617691.4	0	0	0	8	9	0	0	0	0	0	0
CVD20A4	ENST00000356079.9	4	0	11	5	5	24	17	13	7	12	8
CTPZUAI	ENST00000429815.6	0	0	0	8	0	0	5	4	0	0	0
	ENST00000371270.6	0	0	0	0	0	0	0	0	359	334	415
CYP2C8	ENST00000535898.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	148
	ENST0000623108.3	0	0	0	0	0	0	0	0	414	321	354
CYP2S1	ENST00000310054.9	11	18	6	18	18	9	3	3	0	0	0
CVD2E4	ENST00000252945.8	0	0	0	0	0	0	0	0	1975	401	1349
CIPZEI	ENST00000463117.6	0	0	0	0	0	0	0	0	2346	1922	1156
	ENST00000336411.7	0	0	0	0	0	0	0	0	24	8	13
CVD2AA	ENST00000354593.6	0	0	0	0	0	0	0	0	53	12	526
CIPSA4	ENST00000651514.1	2	0	0	0	0	0	0	0	918	185	899
	ENST00000652018.1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	ENST0000003100.13	69	95	115	69	71	224	204	140	57	219	0
CYP51A1	ENST00000450723.5	0	1	2	0	1	0	0	0	0	0	0
	ENST00000691309.1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
	ENST00000248041.12	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0
CYP4F11	ENST00000402119.9	3	3	8	11	15	0	0	0	65	77	43
	ENST00000591841.1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

Таблица 16.6 (a) — Рецепторы, профиль альтернативного сплайсинга полученный в результате применения метода ОНТ на образцах печени и клеточных линиях HepG2 и Huh7

Gene	ENST	Hep1	Hep2	Hep3	Hep4	Hep5	Huh1	Huh2	Huh3	Liv1	Liv5	Liv3
AHR	ENST00000242057.9	29	27	8	0	6	0	51	0	0	16	0
	ENST00000642825.1	0	4	0	12	9	108	0	51	44	72	12
ARNT	ENST00000358595.10	5	12	13	14	9	24	15	16	13	15	30
	ENST00000515192.5	0	0	3	3	3	0	1	0	0	0	0
CEBPA	ENST00000498907.3	97	78	193	123	138	317	482	451	268	249	201
CEBPB	ENST00000303004.5	360	383	122	117	109	117	63	64	94	163	57
HNF1A	ENST00000257555.11	22	23	38	36	28	7	12	19	0	0	0
	ENST00000541395.5	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0
HNF4A	ENST00000316099.10	92	120	101	94	85	99	80	78	98	60	53
	ENST00000316673.8	3	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	ENST00000443598.6	0	0	2	1	2	1	3	2	2	3	0
JUN	ENST00000371222.4	36	34	30	48	55	69	41	41	55	38	18
NR0B2	ENST00000254227.4	429	373	235	293	272	8	18	19	47	99	120
	ENST00000392986.8	0	56	5	3	0	0	0	0	20	59	0
	ENST00000546380.1	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	4
INK104	ENST00000548884.5	77	0	35	29	38	20	33	36	23	0	43
	ENST00000551184.1	0	0	0	0	0	0	1	1	2	3	0
RXRA	ENST00000481739.2	42	41	53	47	55	0	65	24	64	91	65

Таблица 16.6 (б) — Каналы, профиль альтернативного сплайсинга полученный в результате применения метода ОНТ на образцах печени и клеточных линиях HepG2 и Huh7

Gene	ENST	Hep1	Hep2	Hep3	Hep4	Hep5	Huh1	Huh2	Huh3	Liv1	Liv5	Liv3
CACNB2	ENST00000324631.13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
KCNE1	ENST00000399286.3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
KCNE2	ENST00000290310.4	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
KCNJ11	ENST00000339994.5	5	0	2	0	1	0	0	1	0	0	0
KCNQ1	ENST00000155840.12	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
SCN1B	ENST00000262631.11	9	6	9	7	5	0	0	0	0	0	6
	ENST0000638536.1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
SCN4B	ENST00000324727.9	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

Таблица 16.7 — Карточка профиля экспрессии сплайс-форм для некоторых цитохромов P450

Gene		ENST		Hep1	Hep2	Н	ep3	Hep4	4	Hep5	Huh1	Huh2	Huh3	Li	v1	Liv3	Liv5
	ENST00	0003797	27.8	8	1	2	0		0	0	0	36	8	30	0	0	99
CYP1A1	ENST00	0003950	48.6	0	1	0	2		0	0	140	106	4	15	5	0	0
	ENST00	0006176	91.4	0		0	0		8	9	0	0		0	0	0	0
Имя гена статья \на	Д/ азв. ге	лина на (н.о.	Кол-і экзоі (NCB	во нов Кол-г I/G экзон	Ко сп. 30 вај 108 по	1-во іайс- рианто	Кол спл по С (кан М)	-во айс-ва JniProt юнич	p. 1 t +K	Кол-во сплайс- вариантов по габлице в	ID сплайс- варианта UniProt * - comp.map d	ре ID сі варі	плайс- ианта	Кол- во а.о. Ensem	Кол- во н.о. в кДНК Ensem	Кол-во s	plice-
белка NC	BI NO	CBI/GB)	enBa	nk) (Ense	mbl) En	embl				статье	00.1700	Ense	embl	bl	bl	Junctions	5
CYP14	41	5987	7		5	9		3+2		3	E7EMT5	ENS ENS	Г48 Г91	483	2608	отс. 2 экз	0 зон
											P04798-1	L ENS	T27	512	2603		0
Gene	6	ENST		Hep1	Hep2	Н	ep3	Нер	4	Hep5	Huh1	Huh2	Huh3	L	iv1	Liv3	Liv5
	ENST000	0024804	1.12	0		0	2		1	0	0	0)	0	0	0	C
CYP4F11	ENST00	0004021	19.9	3		3	8		11	15	0	0)	0	65	77	43
	ENST00	0005918	41.1	C)	0	0		0	1	0	0)	0	0	0	C
Имя ген статья \ белка N	на \назв. \СВІ	Длина гена (1 NCBI/	а: н.о. GB)	Кол-во экзонов (NCBI/G enBank)	Кол-во экзоно (Ensem	К с в п ы) Е	ол-во плайс ариан o nseml	К - сі ітов (н ы М	(ол- пла ю U кан ()	во йс-вар. IniProt онич.+К	сплайс- вариантов по таблице в статье	ID спл вариа UniPr comp d	айс- анта ot * - .mappe	ID ci Bapi Ense	ілайс- іанта embl	Кол-во a.o. Ensem bl	Кол-во н.о. в кДНК Ensem bl
	4544		,		,	, -						09	HBI6-1	ENS	Г041	524	2977
CYP	4F11	224	91	13	13		5			1+2	3	09	HBI6-2	FNS	г 119	524	3051
subfamily F	F member 11	4 221		.0			5			т· С	5	V9	GYP6	ENS	Г841	199	2531

Выявленные отличия позволят коррелировать результаты широкомасштабных испытаний лекарственных препаратов на клеточных моделях. Анализ показывает, что профиль изоформ и всех генов, и фармакогенов обладает ключевыми сплайс-детерминантами, что видно при анализе принципиальных компонент (Рис.16.10 и Рис.16.11).

результате проведенной работы было показано, профиль В что альтернативного сплайсинга не является уникальным для каждого типа биологического материала. Среди транскриптов выделяются превалирующие сплайс-варианты, которые за редким исключением приводят к трансляции одного и того же белка. Для фармакогенов сохраняется закономерность экспрессии одного превалирующего транскрипта в клеточных линиях и печени. Несмотря на наличие других транскриптов фармакогенов при одном превалирующем, сплайс-варианты не определяют различия в "ферментативном потенциале" биоматериала.

На рисунке 16.14 показан фрагмент тепловой карты профилирования изоформ генома человека.



Рисунок 16.14 — Тепловые карты сплайсинга: «QR-код» профиля экспрессии генов человека, отобраны 100 наиболее представительных генов. На врезке — тепловая карта для 100+ фармакогенов

Карта выстроена по горизонтали в соответствии с группами образцов: сначала – пять высокостандартизированных клеточных линий HepG2. За ними идут три линии Huh7, где стандартизация не соблюдалась в силу технических обстоятельств Таблицу 16.1). (см. Ближе К правому краю карты представлены стандартизированные три образца печени, взятые post mortem. Их молекулярный профиль подвергался абберациям из-за воздействий внешнего характера экспозома. Посмертными донорами были мужчины примерно одного возраста, без внешних признаков трансформации ткани печени. Гибель мужчин никак не была связана с патологией печени, но, следует допустить, что у каждого была личная диета, профиль приёма лекарств — все то, что интегрируется понятием "life-style".

16.2.2.1. Определение тканеспецифичной по сплайс-вариантам выборки фармакогенов

Рассмотрим отличительные особенности экспрессии основных ферментов метаболизма лекарств на конкретных примерах из Таблиц 16.8а-г. Для получения Таблиц 16.8а-г из общей таблицы профиля экспрессии изоформ всех фармакогенов из списка Чиббера были отобраны только те строки, где хотя бы в одном

техническом повторе одного биоматериала встречалось значение TPM > 0. Иными словами, отбрасывались строки, где ТРМ == 0 в каждом техническом повторе каждого биоматериала. Далее разбили все фармакогены на следующие группы: цитохромы Р450, другие ферменты I фазы метаболизма, ферменты II фазы метаболизма, белки-транспортеры и ядерные рецепторы. Из каждой группы отобраны гены, у которых хоть в одном из типов тканей экспрессируются 2 и более изоформы. Для выбранных генов мы указывали их длину (bp) и количество экзонов (ExN) согласно базе данных NCBI/GeneBamk, количество сплайс-вариантов (IsoN), идентификаторы каждой сплайс-формы (ENST00000), длину коирующей ДНК и длину белкового продукта — согласно базе данных Ensembl. Каждому белковому продукту указывали соответствующий идентификатор Uniprot (Uniprot ID), а также количество экспериментально подтвержденных и предсказанных изоформ также по базе данных Uniprot (UP Iso). Предсказанные изоформы белков отмечали звездочкой (*). Канонические изоформы выделяли цветом. Далее мы будем считать, что сплайсвариант характерен для конкретного типа ткани, если он имеет TPM > 0 во всех биологических повторах.

В итоге для группы цитохромов P450 отобрали 5 генов — CYP1A1, CYP2S1, СҮРЗА4, СҮР4F11, СҮР51А1 (см. Таблицу 8а). Для СҮР1А1 характерны три транскрипта, причем два из них, ENST00000379727 и ENST00000395048, приводят к образованию канонической формы фермента. Третий транскрипт приводит к образованию более короткой изоформы фермента (Ensembl ID: ENST00000617691, Uniprot ID: E7EMT5), предсказанной вычислительными методами И не подтвержденной экспериментально. СҮРІАІ экспрессируется в виде одного транскрипта в клеточной линии Huh7 имеет значение ТПМ ... CYP2S1 представлен в виде одного транскрипта только в клеточных линиях HepG2 и Huh7, причем у последней среднее значение ТРМ меньше. СҮРЗА4 экспрессируется в печени в виде трех транскриптов, два из которых не имеют экспериментально подтвержденного белкового продукта (Ensembl IDs: ENST00000336411, ENST00000354593, Uniprot IDs: A0A499FJM4, E7EVM8). СУР4F11 в клеточной линии HepG2 и печени экспрессирует транскрипт, кодирующий вторую изоформу фермента (Ensembl ID: ENST00000402119, Uniprot ID: Q9HBI6-2). Транскрипт канонической формы фермента отсутствует во всех трех типах тканей. СҮР51А1 экспрессируется в виде

канонической изоформы (Ensembl ID: ENST00000003100, Uniprot ID: Q16850-1) у НерG2, Huh7 и двух доноров печени (1 и 5 доноры).

В таблицу 16.8б отбирали гены, относящиеся к другим ферментам I фазы метаболизма. В таблицу были включены HNMT — Histidine N-methyl transferase (4 сплайс-варианта), COMT — Catechol-O-methyl transferase (7 сплайс-вариантов), MAOA — monoamine oxidase A (4 сплайс-варианта), MAOB — monoamine oxidase B (1 транскрипт). В случае гена HNMT в клеточных линиях HepG2 и Huh7 во всех биологических повторах экспрессируются три транскрипта (Ensembl IDs: ENST00000280096, ENST00000280097, ENST00000329366, Uniprot IDs: P50135-3, P50135-1, P50135-2). В транскриптомных профилях печеней первого и пятого доноров также присутствуют три транскрипта. Ранее Barnes W. показал, что вторая изоформа HNMT (Ensembl ID: ENST00000329366, Uniprot ID: P50135-2) с 216 аминоксилотными остатками экспрессируется только в плаценте [386]. В случае гена COMT мы наблюдали, что для печени характерны 6 сплайс-вариантов, для HepG2 и Huh7 — 3 сплайс-варианта.

Несмотря на то, что все образцы печени экспрессируют 6 разных по длине транскриптов, 5 из них приводят к одному и тому же белковому продукту (Ensembl IDs: ENST00000361682, ENST00000406520, ENST00000676678, ENST00000678255, ENST00000678868, Uniprot ID: P21964-1). В случае СОМТ альтернативный сплайсинг происходит за счет некодирующих экзонов, которые входят в 5'UTR, поэтому не возникает новый белковый продукт [387]. 5'UTR часто могут содержать IRES (intrinsic ribosome entry site) [388], что способствует образованию большего количества белкового продукта, поэтому необходимо найти и сравнить сайты IRES в транскриптах клеточных линий и нативной печени. МАОВ в отличие от МАОА представлена во всех трех типах ткани, преимущественно в печени.

В таблицу 16.8в отобрали следующие гены II фазы метаболизма: GSTO1 — glutathione S-transferase omega 1 (4 сплайс-варианта), UGT2B7 — UDP glucuronosyltransferase family 2 member B7 (4 сплайс-варианта), а также SULT1A2 — sulfotransferase family 1A member 2 (2 сплайс-варианта). В отличие от печени, клеточные линии экспрессируют 4 сплайс-варианта GSTO1, один из которых имеет предсказанный белковый продукт (Ensembl ID: ENST00000445155, Uniprot ID: Q5TA02). Вторая изоформа GSTO1 (Ensembl ID: ENST00000369710, Uniprot ID:

Р78417-2) присутствует только в печени первого и пятого доноров. У гена UGT2B7 экспериментально подтвержден белковый продукт только для одного транскрипта (Ensembl ID: ENST00000305231, Uniprot ID: P16662). Отличающий печень от клеточных линий транскрипт имеет только предсказанный белок (Ensembl ID: ENST00000622664, Uniprot ID: A0A087X084). Похожая ситуация и у гена SULT1A2 (см. Таблицу 16.8в).

В таблицу 16.8г отобрали два белка-транспортера SLC29A2 и SLC7A5 и два ядерных рецептора NR1H4 и HNF1A. Для транскриптов выбранных генов белковтранспортеров в базе данных Uniprot не указаны экспериментально подтвержденные белки. Наблюдали, что гены ядерных рецепторов присутствовали во всех биологических повторах только у клеточных линий. Из таблиц 16.8а-г видно, что некоторые транскрипты представлены не во всех образцах клеточных линий и печени, что затрудняет сделать вывод о специфичности генов или транскриптов.

/ /						1										
Name	ENST00000	cDNA	Prot.	UP	Uniprot ID						TPM					
		len.	len.	Iso		Hep1	Hep2	Hep3	Hep4	Hep5	Huh1	Huh2	Huh3	Liv1	Liv3	Liv5
CYP1A1	379727	2603	512	3+2	P04798-1	8	12	0	0	0	0	36	80	0	99	0
5987 bp	395048	2608	512		P04798-1	0	0	2	0	0	140	106	45	5	0	0
ExN: 7	617691	2521	483		E7EMT5*	0	0	0	8	9	0	0	0	5	0	0
IsoN: 9																
CYP2S1	310054	2612	504	2+5	Q96SQ9-1	11	18	6	18	18	9	3	3	0	0	0
14321 bp																
ExN: 9																
IsoN: 6																
CYP3A4	336411	2165	534	1+4	A0A499FJM4	0	0	0	0	0	0	0	0	24	13	8
91812 bp					*											
ExN: 16	354593	2342	353		E7EVM8*	0	0	0	0	0	0	0	7	53	526	12
IsoN: 10	651514	2781	503		P08684	2	0	0	0	0	0	0	0	918	899	185
	652018	1982	454		A0A494C0W7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
					*											
CYP4F11	248041	2977	524	1+2	Q9HBI6-1	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0
22491 bp	402119	3051	524		Q9HBI6-2	3	3	8	11	15	0	0	0	65	43	77
ExN: 13	591841	2531	199		V9GYP6*	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
IsoN: 5																
CYP51A1	003100	3155	509	2+2	Q16850-1	69	95	115	69	71	224	204	140	57	0	219
22651 bp	450723	1729	404		Q16850-2	0	1	2	0	1	0	0	0	0	0	0
ExN: 11	691309	2106	458	1	A0A8I5KRT9	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
IsoN: 5					*											

Таблица 16.8а — Уровень экспрессии выборочных 14 изоформ (сплайс-вариантов) цитохромов P450 — ферментов I фазы биотрансформации ксенобиотиков.

Примечание - ExN и IsoN — количество экзонов и изоформ согласно базе данных NCBI/GeneBank соответственно; cDNA len. — длина кодирующей ДНК; Prot. len. — длина белкового продукта соответствующего транскрипта; UP Iso — количество изоформ согласно базе данных Uniprot. Первое число показывает экспериментально определенные белки, второе число — предсказанные белки;

*предсказанный по транскрипту белок, не подтвержденный экспериментально.

			· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·													
Name	ENST00000	cDNA	Prot.	UP	Uniprot ID						TPM					
		len.	len.	Iso		Hep1	Hep2	Hep3	Hep4	Hep5	Huh1	Huh2	Huh3	Liv1	Liv3	Liv5
HNMT	280096	504	51	3+0	P50135-3	148	112	51	42	42	14	14	9	9	9	18
51892 bp	280097	3132	292		P50135-1	96	92	202	153	142	39	56	69	95	102	67
ExN: 9	329366	835	126		P50135-2	2	7	2	1	1	1	1	1	1	0	4
IsoN: 8	410115	1150	292		P50135-1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	2
COMT	361682	2272	271	2+6	P21964-1	150	165	125	130	147	27	41	51	39	61	203
28204 bp	406520	1339	271		P21964-1	0	7	4	12	7	0	0	0	15	9	79
ExN: 8	428707	2492	292		H7BZ45*	2	1	1	1	1	3	0	1	1	2	2
IsoN: 21	676678	1405	271		P21964-1	4	0	2	3	6	12	2	14	17	47	84
	678255	3119	271		P21964-1	0	0	0	2	0	15	8	2	66	30	150
	678769	2202	302		A0A7I2V37	0	2	0	1	0	0	0	0	2	0	8
					0*											
	678868	2405	271		P21964-1	11	10	40	39	16	0	25	20	50	21	216
MAOA	338702	3931	527	2+2	P21397-1	0	0	7	3	0	5	6	0	33	63	64
91812 bp	542639	5431	394		P21397-2	0	0	0	0	4	0	0	7	69	55	0
ExN: 16	688006	4066	394		P21397-2	0	0	22	13	12	5	0	0	0	0	36
IsoN: 10	689087	3963	394		P21397-2	0	22	0	0	0	0	6	3	38	0	21
MAOB	378069	2570	520	2+0	P27338-1	20	27	38	29	23	61	46	57	188	158	128
115841 bp																
ExN1: 6																
IsoN: 3																

Таблица 16.86 — Уровень экспрессии выборочных 16 изоформ (сплайс-вариантов) ферментов I фазы биотрансформации ксенобиотиков, исключая цитохромы P450.

Примечание: 1 ExN и IsoN — количество экзонов и изоформ согласно базе данных NCBI/GeneBank соответственно; 2 cDNA len. — длина кодирующей ДНК; 3 Prot. len. — длина белкового продукта, соответствующего транскрипта; 4 UP Iso — количество изоформ согласно базе данных Uniprot. Первое число показывает экспериментально определенные белки, второе число — предсказанные белки;

* предсказанный по транскрипту белок, не подтвержденный экспериментально.

Name	ENST00000	cDNA	Prot.	UP	Uniprot ID						TPM					
		len.	len.	Iso												
						Hep1	Hep2	Нер3	Hep4	Hep5	Huh1	Huh2	Huh3	Liv1	Liv3	Liv5
GSTO1	369710	900	208	3+2	P78417-2	46	26	115	110	106	46	54	59	5	0	13
13283 bp	369713	813	241		P78417-1	80	100	274	284	277	592	549	510	365	319	390
IsoN: 7	445155	829	200		Q5TA02*	6	6	16	15	13	5	8	16	2	0	0
	539281	1052	213		P78417-3	2	9	33	32	51	13	21	21	11	71	21
UGT2B7	305231	1888	529	1+3	P16662	47	48	34	48	51	6	1	3	1058	642	787
ExN: 8	502942	866	156		D6RH08*	2	0	1	5	8	0	0	0	0	0	0
Ison: 5	508661	1633	369		E9PBP8*	9	0	0	0	2	0	0	0	9	0	12
	622664	1532	335		A0A087X08 4*	0	0	0	0	0	0	0	0	24	90	3
SULT1A2 5108 bp	335715	1031	295	1+2	P50226	14	6	46	34	39	0	3	0	29	5	16
ExN: 9 IsoN: 4	533150	1991	262		E9PKW4*	24	24	31	36	37	3	5	7	5	0	6

Таблица 16.8в – Уровень экспрессии изоформ (сплайс-вариантов) ферментов II фазы биотрансформации ксенобиотиков.

Примечание: ExN и IsoN — количество экзонов и изоформ согласно базе данных NCBI/GeneBank соответственно; cDNA len. — длина кодирующей ДНК; Prot. len. — длина белкового продукта, соответствующего транскрипта; UP Iso — количество изоформ согласно базе данных Uniprot. Первое число показывает экспериментально определенные белки, второе число — предсказанные белки;

* предсказанный по транскрипту белок, не подтвержденный экспериментально.

Name	ENST00000	cDNA len.	Prot. len.	UP Iso	Uniprot ID						TPM					
						Hep1	Hep2	Hep3	Hep4	Hep5	Huh1	Huh2	Huh3	Liv1	Liv3	Liv5
SLC29A2	357440	2455	456	1+0		0	0	0	0	0	0	50	40	0	0	0
9926 bp ExN: 14 IsoN: 7	546034	2509	456		_	0	1	1	0	0	21	17	36	0	2	0
SLC7A5 39485 bp	261622	4556	507	4+20		323	332	192	204	215	155	110	47	3	9	4
ExN: 11 IsoN: 3	565644	3983	241		H0YH36*	30	0	2	12	13	0	0	63	0	0	0
NR1H4	392986	2739	476	5+4	Q96RI1-1	0	56	5	3	0	0	0	0	20	59	0
ExN: 14	546380	565	45		F8W1M1*	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	4
ISOIN: 11	548884	2884	472		Q96RI1-2	77	0	35	29	38	20	33	36	23	0	43
	551184	294	34		H0YHD5*	0	0	0	0	0	0	1	1	2	3	0
HNF1A 23970 bp	257555	3442	631	8+6	P20823-1	22	23	38	36	28	7	12	19	0	0	0
ExN: 9 IsoN: 13	541395	3332	662		P20823-7	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0

Таблица 16.8г – Уровень экспрессии изоформ (сплайс-вариантов) белков-транспортеров ксенобиотиков и ядерных рецепторов.

Примечание: 1 ExN и IsoN — количество экзонов и изоформ согласно базе данных NCBI/GeneBank соответственно; 2 cDNA len. — длина кодирующей ДНК; 3 Prot. len. — длина белкового продукта, соответствующего транскрипта; 4 UP Iso — количество изоформ согласно базе данных Uniprot. Первое число показывает экспериментально определенные белки, второе число — предсказанные белки;

* предсказанный по транскрипту белок, не подтвержденный экспериментально.

16.2.2.2. Представление сведений о фармакогенах в виде диаграмм Венна

Для поиска экспрессии общих генов и их изоформ мы воспользовались диграммами Венна (Рисунок 16.15). Было выбрано отсечение TPM > 1 как нижний порог экспрессии. Необходимо было найти общие гены среди технических повторов в каждом типе биологической ткани. Экспрессия гена складывалась из сумм значений TPM его транскриптов.



Рисунок 16.15 – Диаграммы Венна, построенные по: (а) множеству генов (ENSG) среди тех.повторов каждой ткани (слева) и между тканями (справа); (б) множеству траскриптов (ENST) среди тех.повторов каждой ткани (справа) и между тканями (слева); (в) множеству соге-генов (ENSG); (г) множеству транскриптов (ENST) генов, которые не вошли в пересечение генов на Рисунке 15в

Анализируя рисунок 16.15а, можно отметить, что у клеточной линии НерG2 среди 5 тех.повторов только 9190 генов (ENSG) оказались с TPM > 1 против 10103 и 8084 генов в клеточной линии Huh7 и клетках печени соответственно. Эти множества из 9190, 10103 и 8084 генов подверглись дальнейшему анализу. На их пересечении оказалось 6446 генов, которые встретились в 3-х тканях и во всех тех.повторах. По этой же аналогии пересекали множества транскриптов генов (ENST), изображенные на Рисунке 16.156. Из всех техповторов были выбраны общие ENST – 8841 в НерG2, 10429 в Huh7 и 6855 в печени. По 3-м тканям было обнаружено 4277 общих изоформ. Как при анализе генов, так и при анализе транкриптов, пересечение НерG2 и Huh7 дает на порядок большее количество общих ENSG и ENST – 1951 и 2527 соответственно, в то время как общих ENSG, например, между печенью и Huh7 585. Наибольшее различие у печени с клеточной линией HepG2 – они имеют наименьшие количества общих генов и их транскриптов – 272 и 418 (Рисунок 16.15а и 16.15б).

Далее общие множества генов (ENSG) n = 6446, и транксриптов (ENST) n =4277 сравнивали друг с другом, заранее конвертировав идентификаторы ENST в их соответствующие идентификаторы ENSG (Рисунок 16.15в). Видно, что, как и ожидалось, гены общих транскриптов полностью вошли в множетсво core-ENSG с рисунка 16.15а. Из них тканеспецифичными оказались 2394 гена. Для проверки этого были построены диаграммы, изображенные на рисунке 16.15г. Из каждого типа клеток были отобраны общие транскрипты генов из этого множества: в HepG2 оказалось 1761 транкрипт, в Huh7 – 2218, в печени – 979. На диаграмме можно увидеть количество транскриптов, которые экспрессируются в каждом тех.повторе. При этом в Huh7 обнаружилось максимальное количество уникальных транскриптов -911, в то время как в печени их оказалось 365. Также можно увидеть, что у HepG2 и Huh7 больше общих транскриптов, чем у печени с какой-либо клеточной линией. Заштрихованное объединение транскриптов на диаграмме справа (рисунок 16.15г) составляет сумму тканеспецифичных транскриптов n = 3439. Среди них есть транскрипты, уникально встречающиеся только в одном типе клеток, И транскрипты, которые экспрессируются в двух тканях.

Для проверки множества сплайс-форм генов (n=3439) на тканеспецифичность мы воспользовались тау-индексом специфичности [389], который рассчитывается по

формуле:

$$\tau = \frac{\sum_{i=1}^{n} (1 - \overline{x})}{n - 1}; \overline{x} = \frac{x_i}{\max_{1 \le i \le n} (x_i)}$$

где n представляет количество типов тканей, а xi представляет среднее значение TPM гена между двумя повторами в ткани i. Этот индекс варьируется по шкале от 0 до 1, где 0 указывает на повсеместность, а 1 указывает на специфичность.

Из 3439 транскриптов всего генома 2231 транскрипт (64%) имеет тау-индекс > 0,5. Такой большой процент указывает, что в составе транскриптома присутствуют тканеспецифичные сплайс-формы, встречающиеся только в клеточных линиях или характерные только для ткани печени. В таблице 16.9 приведены тканеспецифичные фармакогены.

Таблица 16.9(а) — Суперспецифичные фармакогены, изоформы которых экспрессируются только в одной ткани. 0 — изоформа не экспрессируется во всех тех.повторах ткани с TPM > 1; 1 — изоформа экспрессируется во всех тех.повторах ткани с TPM > 1; 7 — индекс $\geq 0,7$ отмечен красным.

gen_name	ENST	HepG2	Huh7	Liver	Tau	Uniprot_ID	bp	Prot.
								len.
MLH1	ENST00000231790.8	0	1	0	0,4	P40692-1	2494	756
	ENST00000435176.5	0	1	0	0,4	P40692-3	2428	658
	ENST00000458205.6	0	1	0	0,7	P40692-2	2608	515
	ENST00000536378.5	0	1	0	0,9	P40692-2	2567	515
NR1H4	ENST00000548884.5	0	1	0	0,6	Q96RI1-2	2884	472
	ENST00000551379.5	0	0	1	0,4	Q96RI1-3	1489	486
PPARG	ENST00000397015.7	0	1	0	0,3	E9PFV2	1772	475
	ENST00000651735.1	0	1	0	0,5	E9PFV2	1774	475
	ENST00000682446.1	0	1	0	0,4	E9PFV2	4064	475
GSTM4	ENST00000369833.5	0	1	0	0,5	A6NNT0	3990	202
INPP1	ENST00000392329.7	0	1	0	0,7	P49441	2044	399
ABCB8	ENST00000477092.5	0	1	0	0,6	C9JTY4	1596	431
XRCC1	ENST00000262887.10	0	0	1	0,8	P18887	2052	633
CES2	ENST00000317091.10	0	0	1	0,7	O00748-1	2871	559
NR3C1	ENST00000343796.6	0	0	1	0,7	P04150-1	7286	777
CES1	ENST00000360526.8	0	0	1	0,7	P23141-2	1946	568
NR1H3	ENST00000467728.5	0	0	1	0,6	Q13133-1	2731	447
EPHX2	ENST00000521400.6	0	0	1	0,6	P34913-1	2776	555
AHR	ENST0000642825.1	0	0	1	0,5	A0A2R8Y7G1	6958	833
ABCB4	ENST00000649586.2	0	0	1	0,6	P21439-2	4293	1279
NR1H2	ENST00000253727.10	1	0	0	0,7	P55055-1	2416	460
ADD1	ENST00000398125.5	1	0	0	0,5	P35611-4	4079	662
PON2	ENST00000433091.6	1	0	0	0,8	Q15165-3	1726	342
SLC16A1	ENST00000458229.6	1	0	0	0,5	P53985-1	3849	500
SLC29A1	ENST00000651428.1	1	0	0	0,5	Q99808-1	2358	456

Таблица 16.9(б) – Специфичные фармакогены, изоформы которых экспрессируются в двух тканях. 0 – изоформа не экспрессируется во всех тех.повторах ткани с ТРМ > 1; 1 – изоформа экспрессируется во всех тех.повторах ткани с ТРМ > 1; τ – индекс ≥ 0,7 отмечен красным.

gen_name	ENST	HepG2	Huh7	Liver	Tau	Uniprot_ID	bp	Prot.
								len.
F5	ENST00000367797.9	0	1	1	0,4	P12259	9132	2224
	ENST00000367796.3	1	0	1	0,8	A0A0A0MRJ7	7039	2229
GSTM4	ENST00000326729.9	1	1	0	0,7	Q03013-2	1321	195
	ENST00000369836.9	1	1	0	0,5	Q03013-1	1394	218
SERPINA7	ENST00000327674.8	1	0	1	0,6	P05543	2642	415
	ENST00000372563.2	1	0	1	0,4	P05543	2360	415
SULT1A2	ENST00000335715.9	1	0	1	0,7	P50226	1031	295
	ENST00000533150.5	1	1	0	0,4	E9PKW4	1991	262
ABCB6	ENST00000265316.9	0	1	1	0,4	Q9NP58-1	2980	842
EGFR	ENST00000275493.7	0	1	1	0,6	P00533-1	9905	1210
ABCB8	ENST00000358849.9	0	1	1	0,4	Q9NUT2-2	4656	718
BRCA1	ENST00000471181.7	0	1	1	0,5	P38398-4	7270	1884
PON2	ENST00000633531.1	0	1	1	0,4	Q15165-2	1653	354
PPARG	ENST00000309576.11	1	1	0	0,7	E9PFV2	1870	475
ABCC10	ENST00000372530.9	1	1	0	0,6	Q5T3U5-1	5043	1492
NR1H3	ENST00000441012.7	1	1	0	0,7	Q13133-1	1852	447
XRCC1	ENST00000543982.5	1	1	0	0,3	F5H8D7	1994	602
LDLR	ENST00000558518.6	1	1	0	0,5	P01130-1	5173	860
NR1H4	ENST0000649582.1	1	1	0	0,5	F8W1M1	810	45
SLC29A1	ENST00000371755.9	1	0	1	0,6	Q99808-1	2083	456
CES2	ENST00000417689.6	1	0	1	0,5	000748-2	3868	543
CES1	ENST00000422046.6	1	0	1	0,6	P23141	2178	566

В таблице 16.9а представлено 22 транскрипта 18-ти генов, которые были экспрессированы с TPM > 1 в двух из трех тканей во всех тех.повторах. 3 гена из 19 альтернативно сплайсируются – MLH1 (DNA mismatch repair protein), NR1H4 (Nuclear Receptor Subfamily 1 Group H Member 4), PPARG (Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma). Все изоформы MLH1 и PPARG экспрессируются в клеточной линии Huh7, а изоформы гена NR1H4 встречаются в Huh7 и печени.

В таблице 16.96 представлено 25 транскриптов 19-ти генов, которые были экспрессированы с ТРМ > 1 в одной из трех тканей во всех тех.повторах. Четыре гена из 18 альтернативно сплайсируются: F5 (Фактор коагуляции V), GSTM4 (Glutathione S-transferase Mu 4), SERPINA7 (Тироксинсвязывающий глобулин), SULT1A2 (Сульфотрансфераза 1А2).

Таблицы 16.9а и 16.9б имеют 10 общих генов, выделенных попарно цветом (одинаковые цвета обозначают, что отмеченный им один и тот же ген имеет разные транскрипты). При этом транскрипты этих генов не пересекаются между таблицами.

16.2.2.3. Протокол загрузки сведений о фармакогенах в базу данных МОLE

Полученные таблицы 16.9а и 16.9б, содержащие сведения о тканеспецифичных и супер-тканеспецифичных фармакогенах, выгружались в базу данных MOLE.

Каждая таблица была сохранена в текстовом формате с разделителем «табуляция» для удобного парсинга файла в базе данных. Была создана и добавлена в базу данных json-схема для данного типа эксперимента, которая содержит нужные названия заголовков – «gen_name», «ENST», «HepG2», «Huh7», «Liver», «Tau», «Uniprot», «bp», «Prot.len.». Данная схема представлена на рисунке 16.16.

```
ł
"name": "some superspecific gene experiment",
"headers" : {
  "geneName" : "string",
  "ensembl" : "string",
  "uniprot" : "string"
},
"dataSources" : [
  {
     "name": "file",
     "delimiter" : "\t",
     "parser": "tsv",
     "headerNamesFlattenMapping": [
       "geneName",
       "ensembl",
       "hepg2",
       "huh7".
       "liver",
       "tau".
       "uniprot"
     "fileIncludesHeaders" : true
  }
  id": "633d9d2450aeba06ffb94d49".
```

Рисунок 16.16 – JSON-схема эксперимента, созданная для загрузки в MOLE результирующих таблиц 16.9а и 16.9б транскриптомной части проекта

В JSON-схеме с помощью ключевых слов создаются правила валидации структуры объекта и типов его полей. Ключевое слово «headers» задает 3 считываемых поля «geneName», «ensembl» и «uniprot» в тексовом типе данных («string»). Ключевое слово «dataSources» задает 4 считываемых поля «name» (cootветвует имени загружаемого файла), «delimiter» («\t» обозначает табуляцию), «parser» (соответсвует формату «Tabulation separated values» входных данных) и «headerNamesFlattenMapping», который подразделяется на 7 полей,

соответствующих таблицам 16.9а и 16.96. Ключевое слово «fileIncludesHeaders» соответсвует true, что обозначает, что входной файл имеет заголовок. Последнее ключевое слово «_id» соответствует идентификатору загружаемого эксперимента в базу данных MOLE.

После авторизации в базе данных MOLE осуществляли переход на страницу создания эксперимента, нажав с домашней страницы ссылку «Эксперимент». Вводимые названия экспериментов – «tissue_specific_farmacogenes» (для таблицы 16.9a) и «tissue_SUPERspecific_farmacogenes» (для таблицы 16.9б) – а также соответствующие файлы формата «.txt» представлены на рисунке 16.17a и 16.17б.



Рисунок 16.17 – (а) Ввод необходимых файлов для таблицы 9а; (б) Ввод необходимых файлов для таблицы 9б

После информации об эксперименте осуществляли ввода проверку перейдя json-схеме соответствия данных базы данных, на страницу предварительного просмотра данных. Убедившись в правильности считывания колонок и соответствующих полей, импортировали эксперименты.

Теперь на странице «Администрирование» во вкладке «some superspecific gene» можно наблюдать загруженные данные, которые представлены на рисунке 16.18.

=	Users	₹ ADD	DFILTER										^
	Experiments												
	Schemas											± €	EXPC
=	Hepg2s		ld ↑	Experiment name	Gene name	Ensembl	Hepg2	Huh7	Liver	Tau	Uniprot	Вр	
≡	Huhs		633fd1f09664467513382bbb	tissiue SUPERspecific farmacogenes	CES1	ENST0000360526.8	0	0	1	0.7	P23141-	1 946	56
=	Huhmutants			_ , _ 0							2		- 1
=	Metabolomes		633fd1f09664467513382bb9	tissiue_SUPERspecific_farmacogenes	CES2	ENST00000317091.10	0	0	1	0,7	O00748- 1	2 871	5(
≡	Genemappings		633fd1f09664467513382bb3	tissiue_SUPERspecific_farmacogenes	PPARG	ENST00000651735.1	0	1	0	0,5	E9PFV2	1 774	45
=	Quant sfs		633fd1f09664467513382bbd	tissiue_SUPERspecific_farmacogenes	EPHX2	ENST00000521400.6	0	0	1	0,6	P34913- 1	2 776	5!
	Gencode feature counts Metabolome samples		633fd1f09664467513382baf	tissiue_SUPERspecific_farmacogenes	MLH1	ENST00000536378.5	0	1	0	0,9	P40692- 2	2 567	5'
=	Proteome samples		633fd1f09664467513382bb5	tissiue_SUPERspecific_farmacogenes	GSTM4	ENST00000369833.5	0	1	0	0,5	A6NNT0	3 990	20
=	Some superspecific gene		633fd1f09664467513382bac	tisslue_SUPERspecific_farmacogenes	MLH1	ENST0000231790.8	0	1	0	0,4	P40692- 1	2 494	7!
			633fd1f09664467513382bae	tissiue_SUPERspecific_farmacogenes	MLH1	ENST00000458205.6	0	1	0	0,7	P40692- 2	2 608	5'
			633fd1f09664467513382bb2	tissiue_SUPERspecific_farmacogenes	PPARG	ENST00000397015.7	0	1	0	0,3	E9PFV2	1 772	45
			633fd1f09664467513382bba	tissiue_SUPERspecific_farmacogenes	NR3C1	ENST00000343796.6	0	0	1	0,7	P04150- 1	7 286	71
								Rows per page:	10 👻	11-3	20 of 25 <	1 2	3

Рисунок 16.18 – Просмотр загруженных данных о фармакогенах в базе данных MOLE

В данном разделе 16.2.10 при подготовке транскриптомных данных для погрузки в БД МОLЕ исследована гипотеза о различии альтернативного сплайсинга в клетках печени человека и в клеточных линиях, которые применяются для моделирования процессов метаболизма лекарств. Полученные данные показали, что выдвинутая гипотеза не подтвердилась, несмотря на то, что использовали очень простые методы анализа данных – гистограммы, отображение в пространстве принципиальных компонент, диаграммы Венна, тепловые карты. Известно, что прототип лекарства, показавший себя в ходе испытания на клетках, далеко не всегда находит дальнейший путь в практику. Различия между клеточными линиями и тканями человека, очевидно, существуют, но наши данные показывают, что эти различия не связаны со сплайсингом. Клеточные линии экспрессируют так же палитру сплайс форм, что и печеночная ткань, преимущественно состоящая из гепатоцитов.

Второй вопрос – это применение технологии прочтения длинных ридов, ONT. Изначально мы рассматривали этот инструмент как альтернативу платформы Illumina, чтобы обогатить за счет длинных прочтений информацию о сплайс-формах. Однако исследование показало, что ONT-секвенирование не решает проблему обогащения сплайс-вариантов.

Получено, что гистограммы распределения числа транскриптов генома человека и для выборки фармакогенов в целом сходны по форме, но не похожи по

содержанию. Ткани отличаются, на рисунке 16.9 видны различия: уровень экспрессии ниже в клеточных линиях, чем в ткани печени. Анализ принципиальных компонент (см. Рис.16.10 и Рис.16.11) показывает, что случайно симулированные последовательности не похожи на реальные данные секвенирования. Однако различия между образцами биоматериала столь ничтожны, что пропадают на фоне симулированных данных. Результаты анализа, приведенные на рисунке 16.13, показали, что спектр сплайс-вариантов позволяет с трудом различить печень и клеточные.

В 16.2.2 данном разделе показана последовательная фильтрация информационного массива в режиме сопоставления данных всего генома человека с данными о фармакогенах. В этом отношении важным является метод интервальных оценок, позволяющий векторизовать сведения о сплайс-формах, данные приведены Таблице 16.5. Полученные многомерные вектора, где каждый образец В характеризуется значениями экспрессии соотнесенных с генами сплайс-форм, позволили отобразить общую картину сплайсинга в пространстве принципиальных компонент. Затем были вынесены отобранные гены и их сплайс-формы в виде диаграмм Венна, установлена их тканеспецифичность, отобраны из исходного массива (более 350 фармакогенов) те, что имеют отношение к различиям между клеточными линиями и донорской печенью. Этот результирующий список приведен в Таблицах 16.9а и 16.9б.

В заключение, необходимо рассмотреть вопрос чувствительности технологии секвенирования методом ОНТ. Ранее было показано, что в среднем на клетку наблюдается 150 млн. молекул мРНК, причем есть молекулы, которые встречаются в двух копиях на 100 клеток, а есть гены-стахановцы, генерирующие в одной клетке 10-20 тыс. копий при геноцентричном подсчете [382][390]. В перспективе необходимо определить, связано ли наблюдаемое нами отсутствие многобразия сплайс-форм с недостаточной чувствительностью технологии секвенирования, или же отражается биологическое явление, потенциально препятствующее использованию клеточных моделей в целях оценки безопасности разрабатываемых лекарственных препаратов.

Обработанные таким образом транскриптомные данные были успешно загружены, обработаны и сохранены в БД МОLE.

16.2.3. Симуляция для цифровизации процесса альтернативного сплайсинга

Результаты работы, описанные в данном разделе направлены на симулирование транскриптомных библиотек, полученных с использованием платформы Oxford Nanopore. При разработке инструментария исходили из того, что нанопоровое секвенирование, как правило, открывает новые возможности в транскриптомных исследованиях благодаря высокой доступности получения прочтений, соответствующих полной длине молекулы мРНК. Была проведена валидация с использованием процедур обработки данных, полученных на платформе Oxford Nanopore, используются симулированные транскриптомные библиотеки. При этом корректность валидации в наших экспериментах зависит от точности воспроизведения специфики реальных данных. В данной работе было установлено, что существующий на данный момент симулятор транскриптомных нанопоровых библиотек transNanoSim [391] некорректно воспроизводит ключевую для изоформного анализа характеристику нанопоровых библиотек – распределение длины прочтений (для каждой изоформы).

Для решения данной проблемы был разработан симулятор TNRSim (https://github.com/Artemiy-Saharov/TNRSim).

Несмотря на то, что нанопоровое секвенирование позволяет получать прочтения, длина которых значительно превышает характерную длину для молекул мРНК, не все прочтения в транскриптомных нанопоровых библиотеках содержат полную последовательность изоформ, что, в основном, связано с фрагментацией молекул мРНК в процессе пробоподготовки [392]. Исходя из предположения о том, что обрыв молекулы мРНК равновероятен на каждом нуклеотиде, можно сделать вывод, что распределение длины усечённых прочтений будет геометрическим. Данное предположение подтверждается в реальных библиотеках.

Рисунок 16.19 показывает гистограммы распределения для нескольких генов и библиотек с разной степенью фрагментации; разным цветом показаны усечённые и полные риды.



Рисунок 16.19 — Примеры распределения длины прочтений в нанопоровых транскриптомных библиотеках с низкой степенью фрагментации (HepG2 new tran4) и высокой (Huh7_1)

16.2.3.1. Определение параметров фрагментации

Для продолжения нашей работы было допущено, что в сложных транскриптомах формы распределения длины усечённых ридов искажают пики ридов целой длины более коротких изоформ и одновременное присутствие в геномном выравнивании усечённых ридов нескольких изоформ. В связи с данными искажениями оценка параметров распределения по его форме осложнена.

Параметры распределения длины ридов могут быть оценены через соотношение количества ридов полной длины (размер самого правого пика) и количества усечённых ридов на выбранной длине (берётся количество усечённых прочтений непосредственно перед пиком). Пусть:

- Nm количество прочитанных молекул РНК
- Nt количество усечённых (truncated) прочтений
- Nf количество полных (full) прочтений
- nl количество прочтений на длине l
- р вероятность обрыва молекулы РНК

Из вышеприведенных обозначений определим систему уравнений:

$$Nm = Nt + Nf$$
$$Nf = Nm - Nt$$
$$nl = p * Nm * (1 - p)^{l}$$
$$Nt = \sum_{l=1}^{L} p * Nm * (1 - p)^{l}$$
$$Nf = Nm \left(1 - p * \sum_{l=1}^{L} (1 - p)^{l}\right)$$

В системе уравнений определены две заранее известные по результатам секвенирования величины: количество целых прочтений и количество усечённых прочтений непосредственно перед пиком. Подобрав значения р и Nm, получили степень фрагментации PHK. Данный показатель был схож у всех транскриптов в библиотеке, кроме митохондриальных, и является характеристикой библиотеки.

$$\begin{cases} Nf = Nm\left(1 - p * \sum_{l=1}^{L} (1 - p)^{l}\right)\\ nl = p * Nm * (1 - p)^{l} \end{cases}$$

Таким образом, разработанный алгоритм TNRSim использует геометрическое распределение для корректного симулирования длины усечённых прочтений. Это показано на рисунке 16.20, где мы видим, что, в отличие от ранее применяемой программы TransNanoSim, распределения длин имеют четко выраженное бимодальное распределение.



Рисунок 16.20 — Сравнение распределения длины прочтений в реальных и симулированных транскриптомных нанопоровых библиотеках. (a) — результат обработки клеточной линии HepG2_4, (б) — применение программы TransNanoSim к данным, представленным на гистограмме (a), (в) — результат обработки клеточной линии Huh7_1, (г) — результаты, полученные разработанным нами симулятором TNRSim

Степень фрагментации является важным параметром с точки зрения изоформного анализа, так как отнесение усечённых фрагментов к той или иной изоформе может быть осложнено.

Была протестирована программа NanoCount (version=1.0.0) при двух разных степенях фрагментации: низкой (0.0004, как у HepG2_new-библиотек) и высокой (0.0015, как у Huh7-библиотек). Для теста была симулирована библиотека, содержащая 5 разных изоформ одного гена (ENSG00000145362.21).

Как видно на графике (рисунок 16.21), в библиотеке с высокой степенью фрагментации практически все гены получили примерно одинаковое количество прочтений, в то время как в библиотеке с высокой степенью фрагментации разброс по количеству прочтений выше. Обе библиотеки имеют крайне высокое количество ложноположительных изоформ, однако в случае с библиотекой с высокой степенью фрагментации результат может быть улучшен благодаря отсечению по количеству прочтений на изоформу, что невозможно для библиотеки с низкой степенью фрагментации, так как по результатам её анализа почти все изоформы получили примерно одинаковое количество прочтений.



Рисунок 16.21 — Сравнение количества прочтений на изоформу между результатами NanoCount и симулированными данными (вертикальная ось в логарифмическом масштабе)

Подобная картина наблюдается для программы Salmon (version 1.9.0), однако, в общем, Salmon лучше справился с задачей изоформного анализа, показав меньшее число ложноположительно обнаруженных изоформ (рисунок 16.22).



Рисунок 16.22 – Сравнение количества прочтений на изоформу между результатами Salmon и симулированными данными

16.2.3.2. Описание модели ошибок

Нанопровые секвенаторы производят прочтения с высоким уровнем ошибок. Для корректного тестирования алгоритмов обработки нанопровых данных необходимо правильное воспроизведение ошибок ланной платформы секвенирования. Модель ошибок TNRSim, как и transNanoSim, основана на статистической характеризации реальных прочтений и разделяет с ней некоторые идеи [393]. В процессе симуляции прочтение формируется как череда из совпадающих с референсом участков (match) и ошибок. Нанопоровый секвенатор совершает ошибки трёх типов: замены (mismatch), вставки (insertion) и делеции (deletion). Длина совпадающих участков (рис. 16.26) выбирается с использованием взвешенного выбора. Длина ошибок берётся из смешанного распределения: Пуассон-геометрического в случае замен (рис. 16.25) и Вейбулл-геометрического в случае вставок (рис. 16.23) и делеций (рис. 16.24).

Mismatch: Pm ~ αmPoisson(λm)+(1-αm)Geometric(pm) Insertion: Pi ~ αiWeibull(λi,κi)+(1-αi)Geometric(pi) Deletion: Pd ~ αdWeibull(λd,κd)+(1-αd)Geometric(pd) Где αm/i/d – параметр, отвечающий за смешанность распределения,

λm – математическое ожидание, λi/d – коэффициенты масштаба, а кi/d – коэффициенты формы распределения Вейбулла, pm/i/d – вероятность события в геометрическом распределении.



Рисунок 16.23 – Распределение длины инсерций



Рисунок 16.24 – Распределение длины делеций



Рисунок 16.25 – Распределение длины замен



Рисунок 16.26 – Распределение длины корректных участков

16.2.3.3. Симуляция замен

TNRSim использует модель замен, учитывающую разную вероятность ошибки на разных нуклеотидах, что позволяет получить более корректное воспроизведение реальных данных. Коэффициент корреляции Спирмена между матрицей замен для реальных прочтений и симулированных TNRSim составляет 0.95, в то время как между реальными данными и симулирвованными transNanoSim он равен 0.70 (Таблица 16.10).

	Реалы	ные про	очтения	I	TNRSim						transNanoSim					
ref	А	Т	G	C	А		Т	G	C	А		Т	G	C		
rea																
a						1										
Α	0.95	0.02	0.01	0.00	Α	0.96	0.01	0.01	0.00	Α	0.97	0.01	0.00	0.00		
	6	2	9	3		1	8	2	8		1	1	7	9		
Т	0.01	0.94	0.00	0.00	Т	0.01	0.94	0.00	0.01	Т	0.00	0.96	0.00	0.00		
	4	5	4	8		2	5	4	8		8	4	6	8		
G	0.02	0.01	0.97	0.00	G	0.01	0.00	0.98	0.00	G	0.01	0.01	0.97	0.01		
	5	2	5	3		9	9		5		2	4	8	1		
С	0.00	0.02	0.00	0.98	С	0.00	0.02	0.00	0.96	С	0.01	0.01	0.00	0.97		
	4	2	2	6		8	8	4	8			1	8	2		

Таблица 16.10 – Матрицы замен

16.2.3.4. Улучшенная модель симуляции показателя качества

В fastq-файле каждый нуклеотид имеет показатель качества, кодирующий вероятность ошибки на данном нуклеотиде. Для прочтений Oxford Nanopore было замечено, что для показателя качества свойственна автокорреляция. Для корректного воспроизведения данной особенности в TNRSim используется авторегрессионная модель:

 $Q(n) = a^*Q(n-1) + c + noise$

Где Q(n) – качество текущего нуклеотида, Q(n-1) – качество предыдущего нуклеотида, а – коэффициент автокорреляции, с – постоянная величина, noise – случайная величина, получаемая из бимодального триангулярного распределения.

Как видно на рисунке 16.27, для transNanoSim отсутствует автокорреляция показателя качества, так как при симуляции данный показатель просто берётся из усечённого логнормального распределения (truncated log-normal distribution), в то время как TNRSim воспроизводит специфику реальных данных, благодаря использованию автокорреляционной модели.


Рисунок 16.27 – Автокорреляция показателя качества

16.2.4. Подготовка эпитранскриптомных данных

16.2.4.1. Исходные данные

Структура исходных данных изложена в разделе 16.2.1.1 отчета. Резюмируя: данные получены на секвенаторе MinION (Oxford Nanopore Technology, Оксфорд, Великобритания). Представлены тремя типами образцов: это, во-первых, клеточная линия HepG2 (количество тех.повторов n = 5), во-вторых, клеточная линия Huh7 (n = 3), в-третьих, образцы здоровой печени (n = 3), полученные при резекции печени без морфологически или гистологически наблюдаемых изменений.

16.2.4.2. Master of Pores: схема обработки исходных данных

На схеме, приведенной на рисунке 16.28, представлен алгоритм обработки данных. Бейзколлинг осуществляли программой guppy_basecaller. Для выравнивания чтений на геном применяли программу minimap2 с опцией учета сплайсинга. С использованием подпрограммы multi_to_single провели разделение исходных fast5 файлов на одиночные риды. Далее с помощью программного обеспечения Tombo была произведена аннотация fast5 результатами бейзколлинга, после чего с помощью команды tombo resquiggle мы произвели внутреннюю аннотацию fast5 файлов. Далее следовал поиск 5mc модификаций с помощью tombo detect_modifications. Из результирующих файлов были отобраны только те, в которых были найдены замены.

Алгоритм обработки данных:



Рисунок 16.28 – Графическое представление алгоритма обработки данных. Исходные данные размещены на сетевом диске ИБМХ/MinilON. Для расчетов использовали вычислительную машину Яндекс.Cloud

В ходе подготовки данных была построена базовая таблица, содержащая результаты вывода программы tombo, где каждый ген характеризовался совокупностью транскриптов, а каждому транскрипту соответствовало положение 5mc модификации, ее вероятность и последовательность, где была произведена модификация.

16.2.4.3. Анализ данных

Для образцов ткани печени и клеточных линий была построена гистограмма распределения положения метилированных остатков в геноме. На рисунке 16.29 видно характерное снижение количества модификаций в результатах ONT-секвенирования в зависимости от позиции.



Рисунок 16.29 – Гистограмма профиля метилирования (a) для набора всех генов в геноме человека и (б) для фармакогенов по статье Чибера [4]

Гистограмма является первым этапом, определяющим ход подготовки информации (эпитранскриптомной мультиомной части) К загрузке В разрабатываемую базу данных. Ожидаемо, что максимальное количество модификаций наблюдается в гене на начальных позициях, что показывает возможную роль модификаций в регуляции транскрипции и трансляции. Также следует обратить внимание, что донорская печень показала наибольший профиль метилирования.

Для того чтобы оценить степень экспрессии фармакогенов с найденными модификациями, было произведен расчет ТРМ для каждого образца. Мы сравнили результирующие таблицы с метилированными фармакогенами, у которых значение ТРМ было больше 0, и оказалось, что большинство модификаций находится на ненулевых значениях ТРМ.



Рисунок 16.30 – (а) Гистограмма распределения ТРМ при отсечке ТРМ>20, (б) гистограмма распределения модификаций от значения ТРМ. При сравнении гистограмм можно заметить, что на высокой отсечке ТРМ распределение всех ридов начинает совпадать с распределением модифицированных ридов

На рисунке 16.30 проведено сравнение общего распределения ненулевых ТРМ и тех, в которых были найдены модификации. Было установлено, что модификации происходят в ридах с TPM >600 и очень мало представлены в ридах с низкими значениями TPM (TPM<20). Далее мы попытались найти самые консервативные участки метилирования, то есть те, которые повторяются у всех образцов. Были получены результирующие таблицы (Таблица 16.11 (а, б, в)) с консервативными модификациями. Заметим, что консервативные модификации происходят только в которые высокоэкспрессируемых транскриптах, определяют синтетическую функцию печени. Аналогичные расчеты были проведены для клеточных линий HepG2 и Huh7. Было показано, что количество консервативных модификаций в клеточных линиях больше, чем у донорской печени, что отличается от общего профиля метилирования. Также был найден один транскрипт, у которого есть повторяющаяся всех образцах метилирования. BO позиция Им оказался ENST00000295897.9, транскрипт, кодирующий синтез альбумина, модификация была в 1030 позиции, выпала на экзонную последовательность и потенциально может влиять на его трансляцию.

Таблица 16.11 (a) – Консервативные модификации, которые встречаются во всех образцах донорской печени, с не нулевым значением ТРМ. В таблице видно, что большинство модификаций приходится на очень большие значения ТРМ

	ENST	ENSG	GEN_NAME	GEN_LEN	BIO_TYPE	MOD	PROB	ТРМ
0	ENST00000295897.9	ENSG00000163631.17	ALB-201	2285	protein_coding	1030	1.00	76216.848277
1	ENST0000295897.9	ENSG00000163631.17	ALB-201	2285	protein_coding	1201	0.99	76216.848277
2	ENST0000295897.9	ENSG00000163631.17	ALB-201	2285	protein_coding	1149	0.99	76216.848277
3	ENST00000295897.9	ENSG00000163631.17	ALB-201	2285	protein_coding	289	0.98	76216.848277
4	ENST0000295897.9	ENSG00000163631.17	ALB-201	2285	protein_coding	2015	0.97	76216.848277
5	ENST0000295897.9	ENSG00000163631.17	ALB-201	2285	protein_coding	196	0.96	76216.848277
6	ENST00000415165.6	ENSG00000163631.17	ALB-203	1483	protein_coding	650	0.94	14098.764899
7	ENST00000509063.5	ENSG00000163631.17	ALB-214	1911	protein_coding	1587	0.98	203.923506
8	ENST0000367990.7	ENSG00000158874.11	APOA2-201	474	protein_coding	411	0.99	12394.161143
9	ENST0000367990.7	ENSG00000158874.11	APOA2-201	474	protein_coding	450	0.99	12394.161143
10	ENST0000367990.7	ENSG00000158874.11	APOA2-201	474	protein_coding	392	0.99	12394.161143
11	ENST00000252486.9	ENSG00000130203.10	APOE-201	1166	protein_coding	513	0.95	6820.919260
12	ENST00000511370.1	ENSG00000163631.17	ALB-216	1519	protein_coding	718	0.91	94.224444
13	ENST0000359492.6	ENSG00000118137.10	APOA1-202	932	protein_coding	543	0.98	8958.038645
14	ENST0000621085.4	ENSG00000163631.17	ALB-219	1418	protein_coding	965	0.98	2407.658387

Таблица 16.11 (б) – Консервативные модификации, которые встречаются во всех образцах клеточной линии Huh7, с ненулевым значением ТРМ. В таблице можно заметить, что основные гены, подверженные модификациям, похожи по значениям на донорскую печень

	ENST	ENSG	GEN_NAME	GEN_LEN	BIO_TYPE	MOD	PROB	TPM_x	TPM_y
0	ENST00000295897.9	ENSG00000163631.17	ALB-201	2285	protein_coding	1030	1.00	5903.297402	5903.297402
1	ENST00000295897.9	ENSG00000163631.17	ALB-201	2285	protein_coding	864	1.00	5903.297402	5903.297402
2	ENST00000295897.9	ENSG00000163631.17	ALB-201	2285	protein_coding	628	1.00	5903.297402	5903.297402
3	ENST00000295897.9	ENSG00000163631.17	ALB-201	2285	protein_coding	604	1.00	5903.297402	5903.297402
4	ENST00000295897.9	ENSG00000163631.17	ALB-201	2285	protein_coding	1201	0.99	5903.297402	5903.297402
39	ENST00000379047.7	ENSG00000181019.13	NQO1-203	2527	protein_coding	2410	0.95	165.047179	165.047179
40	ENST00000259396.9	ENSG00000229314.6	ORM1-201	764	protein_coding	716	0.95	456.261123	456.261123
41	ENST00000503124.5	ENSG00000163631.17	ALB-209	1741	protein_coding	580	0.92	378.566868	378.566868
42	ENST0000003100.13	ENSG0000001630.18	CYP51A1-201	3155	protein_coding	2822	0.94	204.144430	204.144430
43	ENST00000227507.3	ENSG00000110092.4	CCND1-201	4238	protein_coding	2535	0.90	224.746556	224.746556

Таблица 16.11 (в) — Консервативные модификации, которые встречаются во всех образцах клеточной линии HepG2, с ненулевым значением TPM. В таблице можно заметить, что основные гены, подверженные модификациям, похожи по значениям на донорскую печень, но их стало больше и появились нехарактерные для доноров печени транскрипты (TGFB, NQO1 и др.)

	ENST	ENSG	GEN_NAME	GEN_LEN	BIO_TYPE	MOD	PROB	ef_len	_×	TPM_x	_у	TPM_y
0	ENST00000295897.9	ENSG00000163631.17	ALB-201	2285	protein_coding	1030	1.00	2285	100.0	12179.859149	100.0	13571.622708
1	ENST00000295897.9	ENSG00000163631.17	ALB-201	2285	protein_coding	604	1.00	2285	100.0	12179.859149	100.0	13571.622708
2	ENST00000295897.9	ENSG00000163631.17	ALB-201	2285	protein_coding	628	1.00	2285	100.0	12179.859149	100.0	13571.622708
3	ENST00000295897.9	ENSG00000163631.17	ALB-201	2285	protein_coding	864	1.00	2285	100.0	12179.859149	100.0	13571.622708
4	ENST00000295897.9	ENSG00000163631.17	ALB-201	2285	protein_coding	1149	0.99	2285	100.0	12179.859149	100.0	13571.622708
47	ENST00000464492.5	ENSG00000158874.11	APOA2-204	530	protein_coding	320	0.90	530	100.0	77.364287	100.0	48.963755
48	ENST00000372563.2	ENSG00000123561.15	SERPINA7-202	2360	protein_coding	285	0.94	2360	100.0	277.943180	100.0	252.948440
49	ENST00000221930.6	ENSG00000105329.11	TGFB1-201	2780	protein_coding	2086	0.90	2780	100.0	148.206699	100.0	133.332103
50	ENST00000395384.9	ENSG00000103485.19	QPRT-202	2200	protein_coding	1737	0.93	2200	100.0	178.587685	100.0	204.592388
51	ENST00000261733.7	ENSG00000111275.13	ALDH2-201	9561	protein_coding	1734	0.90	9561	100.0	73.822850	100.0	125.554651

Чтобы установить, влияют ли модификации на трансляцию, мы проанализировали консервативные модификации и отобрали те, где модификации приходились на зоны прикрепление к рибосоме. В ходе парсинга базы данных Ensemble были созданы таблицы с такими транскриптами. Исходя из таблицы 16.12, можно увидеть, что большинство модификаций приходятся на зоны открепления от рибосомы, т.е. модификация находится в концевой зоне гена. Мы предположили, что эти модификации могут способствовать откреплению от рибосомы и более эффективной трансляции.

Таблица 16.12 — Консервативные модификации, которые встречаются во всех образцах клеточной линии HepG2 и находятся в зонах открепления от рибосомы. Исходя из таблицы, можно сделать вывод, что большинство таких модификаций находятся в зонах открепления от рибосомы(5'UTR)

	ENST	ENSG	GEN_NAME	GEN_LEN	BIO_TYPE	MOD	PROB	ТРМ
0	ENST00000259396.9	ENSG00000229314.6	ORM1-201	764	protein_coding	716	0.94	866.892749
1	ENST0000303004.5	ENSG00000172216.6	CEBPB-201	1839	protein_coding	1640	0.95	359.710009
2	ENST00000303004.5	ENSG00000172216.6	CEBPB-201	1839	protein_coding	1612	0.95	359.710009
3	ENST00000295897.9	ENSG00000163631.17	ALB-201	2285	protein_coding	1935	0.98	12179.859149
4	ENST00000395080.8	ENSG00000118785.15	SPP1-203	1561	protein_coding	1098	0.96	319.626651
5	ENST00000395384.9	ENSG00000103485.19	QPRT-202	2200	protein_coding	1737	0.93	178.587685
6	ENST00000221930.6	ENSG00000105329.11	TGFB1-201	2780	protein_coding	2086	0.90	148.206699
7	ENST00000367990.7	ENSG00000158874.11	APOA2-201	474	protein_coding	450	1.00	6667.330382
8	ENST00000431067.4	ENSG00000228278.5	ORM2-201	759	protein_coding	716	0.94	582.754025
9	ENST00000359492.6	ENSG00000118137.10	APOA1-202	932	protein_coding	888	0.97	273.622244

Для того чтобы подтвердить эту теорию, произвели поиск других транскриптов, относящихся к тем же ENSG, и сравнили их ТРМ. Исходя из рисунка 16.31, видно, что эти группы достоверно отличаются. Несмотря на это, необходимы дополнительные методы для подтверждения данной гипотезы.



Рисунок 16.31 — Гистограмма сравнения ТРМ метилированных транскриптов и неметилированных. На рисунке показано значимое отличие в экпрессии модифицированных и немодифицированных транскриптов (p=0,0065). Статистический анализ проводился непараметрическим методом.

16.2.5. Подготовка данных протеомных экспериментов

16.2.5.1. Информация о структуре исходных файлов

В качестве иллюстративного примера работы с протеомными данными, в базу данных MOLE были депонированы данные масс-спектрометрии ворсинок хориона при нормальной и замершей беременности (см раздел 12.1). Беременность начинается с момента оплодотворения созревшей в яичнике яйцеклетки. Оплодотворенная яйцеклетка продвигается в полость матки и постепенно превращается в многоклеточный зародыш – плодное яйцо, густо покрытое нежными ворсинками. Хорион — ворсинчатая оболочка плодного яйца, которая к 16-й неделе беременности трансформируется в плаценту. Основной функцией хориона является обмен веществ между будущим ребенком и матерью. Хромосомный набор хориона соответствует кариотипу плода, поэтому, в случае замершей беременности, молекулярное исследование ворсинок хориона может выявить причины нарушения. Замершая беременность является видом невынашивания беременности, при котором, чаще всего в первом триместре, происходит остановка развития и гибель эмбриона. Биопсия хориона рутинно используется в пренатальной диагностике замершей беременности, риск прерывания беременности вследствие забора биопсии не превышает 1%. Исследование клеток из ворсин хориона позволяет с высокой точностью диагностировать хромосомные болезни, генные заболевания И внутриутробные инфекции.

Для испытаний базы данных была выбрана ткань хориона из-за роли ее компонентов в формировании развивающегося организма. Согласно транскриптомному анализу, 65% всех белков человека экспрессируются в плаценте [394]. В плаценте 288 генов проявляют повышенную экспрессию, в сравнении с другими типами тканей. Хорион, как плодная часть плаценты — уникальная ткань для протеомного профилирования, детекции низкопредставленных белков, исследования белковых семейств.

Образцы ворсинок хориона были получены в Центре планирования семьи и репродукции Департамента здравоохранения города Москвы. Привлечение пациентов было одобрено этическим комитетом Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н. И. Пирогова (протокол No 159 от 21.11.2016). Всеми участницами исследования было подписано добровольное

информированное согласие. Пациентки с нормальной беременностью (плановый аборт) не имели акушерских осложнений или замершей беременности в анамнезе, имели как минимум одного ребенка. Диагноз замершей беременности был поставлен на основании результатов трансвагинального УЗИ. Было получено пять образцов биопсии хориона пациенток после планового аборта и три — от пациенток с замершей беременностью.

Жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС) была проведена на приборе Q Exactive HF-X Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, США). Каждый образец был проанализирован в трех технических повторах. Схема ЖХ-МС/МС экспериментов представлена на Рисунке 16.32. Неудачные пуски не использовались в работе, были отобраны 20 файлов (Рис. 16.32).



Рисунок 16.32 – Схема ЖХ-МС/МС экспериментов анализа ворсинок хориона при нормальной (плановый аборт) и замершей (операционное хирургическое вмешательство) беременностях. Было получено пять образцов биопсии хориона пациенток после планового аборта и три — от пациенток с замершей беременностью. Для экстракции белков было применено три протокола: экстракция с 2%/4% SDS + протеолиз в геле + концентрирование в 1DE геле и экстракция мочевиной + протеолиз в растворе. Каждый из трех протоколов был применен как для образиов после планового, так и после вынужденного абортов. Неудачные масс-спектрометрические эксперименты не использовались (перечеркнуты на схеме)

16.2.5.2. Обработка исходных данных

Для современной масс-спектрометрии все ещё не решены проблемы, связанные с анализом и характеристикой низкопредставленных, «миссинг» белков. Протеомно-поисковой алгоритм Andromeda («движок» MaxQuant), во время предварительной обработки данных, может отбрасывать часть сигналов белков с низким содержанием, чтобы уменьшить количество проводимых статистических тестов и упростить коррекцию по частоте ложных обнаружений [395]. Таким образом, при обработке в MaxQuant низкопредставленная часть протеома может остаться «за бортом». Для работы с низкопредсталенными белками была апробирована комбинация алгоритмов X!Tandem и MS-GF+, так как ранее было показано, что в таком сочетании чувствительность протеомной идентификации высока, временные и вычислительные ресурсы используются эффективно [396].

Для обработки с X!Tandem и MS-GF+, была использована графическая оболочка SearchGUI. Поиск проводился по референсной базе данных SwissProt.

Полученные списки белков были «сведены» в одну консенсусную таблицу, с указанием принадлежности к датасету и номера техповтора. Из списка были исключены белки, которые являются частыми контаминантами [397]. Для выделения надежно идентифицированных и квантифицированных белков был разработан биоинформатический пайплайн каскадной фильтрации [394]. Основные этапы фильтрации приведены ниже:

1. Отбор белков, ассоциированных с тканью плаценты по Human Protein Atlas;

2. Отбор белков, надежно идентифицированных по 2 уникальным валидированным пептидам как минимум в 1 техническом повторе 1 образца 1 датасета;

3. Отбор белков, идентифицированных в 2/3 технических повторах 1 образца 1 датасета;

4. Отбор белков, идентифицированных в 2/3 технических повторах 2/3 образцов
1 датасета;

5. Отбор белков, квантифицированных с коэффициентом вариации значений меньше 0.16.

В Таблице 16.13 показано изменение количества белков в датасетах по ходу фильтрации. На финальном этапе удалось получить «надежные» списки схожих

размеров, которые можно сравнивать. Такая фильтрация может быть полезной в работе с неравными, небольшими протеомными выборками, так как нивелируются различия, обусловленные контаминанцией, неполной «уверенностью» протеомнопоисковых алгоритмов в идентификациях, разной поддержкой датасетов информацией техповторов.

Таблица 16.13 – Изменение количества белков в датасетах по ходу фильтрации. Колонки обозначены цифрами, которые означают этап фильтрации

Датасет	0	1	2	3	4	5
1	1377	1232	884	738	591	120
2	756	690	460	379	379	176
3	594	547	298	216	216	113
4	871	782	546	299	299	112
5	764	662	449	361	361	154
6	824	723	447	368	368	110

Таким образом, наряду с «сырыми данными», консенсусная таблица и финальные списки этапа 5 фильтрации были выбраны для загрузки в MOLE, как «инпут» и «аутпут» биоинформатического анализа.

16.2.5.3. Подготовка протеомных данных, полученных при облучении клеточной линии субтоксической дозой ультрафиолета

Иным примером результатов протеомного эксперимента являются данные, полученные после облучения клеточной линии HaCaT двумя дозами ультрафиолета в пересчете на площадь культивируемой ткани: 6 мДж/см2 — субтоксическая доза, 24 мДж/см2 — токсическая доза. Дизайн исследования подразумевал получение двух биологических образцов, не подвергавшихся никаким внешним физическим воздействиям (контрольная группа), трех биологических образцов, облученных первой дозой УФ, и еще трех биообразцов, облученных второй дозой УФ. Анализ протеомов был проведен на ЖХ-МС/МС платформе Q Exactive HF-X Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, США). Исходные данные каждого образца были получены в трёх технических повторах. На Рисунке 16.33 представлен дизайн эксперимента. Для выделения протеома ткани использовался протокол экстракции с 2% SDS + протеолиз в геле + концентрирование в 1DE.



Рисунок 16.33 — Схема получения исходных данных в трех выборка: контроль (слева), первая доза экспозиции УФ (в центре), вторая доза экспозиции (справа)

Исходные raw-файлы загружались в программу MaxQuant. Поиск белков проводился по базе данных SwissProt. В качестве выходных данных с помощью MaxQuant получили файл «ProteinGroups.txt». Дальнейший анализ выходных данных ранее производился в Excel или в интегральной среде разработке на языке R — RStudio. Анализ полученных протеомов после УФ-экспозиции производился в программе с открытым исходным кодом Perseus [398].

Загрузка производилась при помощи Generic matrix upload. В качестве основных данных (Main) были выбраны колонки, содержащие в себе LFQ интенсивности. Ход обработки и анализа загруженного файла «ProteinGroups.txt» отображается в центральном поле в виде графа (см. Рисунок 16.34). Синие узлы графа представляли собой получаемые в ходе обработки и анализа таблицы (матрицы), а зеленые узлы — операции, совершенные с таблицей. Алгоритм обработки и анализа данных в программе Perseus подразумевает собой следующую последовательность операций, совершаемую над загруженной таблицей: загрузка файла «ProteinGroups.txt»; удаление плохо идентифицированных белков в модификации; белков, определенных обратной результате удаление по последовательности пептида; удаление белков-контаминантов; логарифмическая трансформация интенсивностей; удаление не валидных значений; импутацию значениями согласно нормальному распределению интенсивностей в каждом образце; добавление аннотации белков; анализ дифференциальной экспрессии при помощи встроенного пакета R — edgeR.



Рисунок 16.34 – Фрагмент хода обработки и анализа файла «ProteinGroups.txt» в программе Perseus. Желтым цветом обозначена «точка входа» в алгоритм обработки и анализа данных. Зеленым цветом отображаются примененные функции фильтрации и преобразования загруженной таблицы. Синим цветом указываются результирующие таблицы. Графики, построенные по полученным данным, отображаются в виде небольшого оранжевого окна на синем узле графа

Аннотация найденных белков производилась по специальному файлу, предлагаемому разработчиками Perseus. Файл аннотации mainAnnot.homo sapiens.txt белков человека был загружен с https://datashare.biochem.mpg.de/s/qe1IqcKbz2j2Ruf/. Файл был помещен в папку Perseus_v2.0.7.0\bin\conf\annotations. Данный файл содержит поля с указанием индентификаторов по базам данных, таких как Ensembl, KeGG, Reactome, GO, UniProt и др.

Перед анализом дифференциальной экспрессии была проведена кластеризация образцов. Результат был визуализирован при помощи функции «Hierarchical clustering».



Рисунок 16.35 — Иерархическая кластеризация образцов по интенсивностям хроматографических пиков. Перед построением графика значения интенсивностей преобразованы логарифмированием по основанию 10. Красным цветом обозначены высокие значения интенсивностей (8,5-9,5), черным цветом — интенсивности в интервале от 7,49-8,49, зеленым цветом — низкие значения интенсивностей (от 7,5 и ниже)

По оси Х кластеризованы анализируемые образцы, обозначенные сокращенными групповыми именами. На оси У указаны кластеризованные метаболические и сигнальные пути по базе данных KeGG. Некоторые белки не были отнесены к метаболическим процессам, поэтому на графике видны пустые ветки на иерархическом дереве путей KeGG. На фрагменте тепловой карты обращают на себя внимание процессы «Ribosome», «mRNA surveillance pathway», «Oxidative phosphorylation», «Glutathione metabolism», «Proteasome», «Cysteine and methionine metabolism». Видно, что при обработке клеток субтоксической дозой (образцы с префиксом UV1) в 4 из 6 указанных метаболических путях обнаружено повышение интенсивностей белков (черный и красный цвета) в сравнении с контролем (префикс Control) образцами, подвергшимися облучению токсической И лозой ультрафиолета (префикс UV2). Эти 4 метаболических пути связаны с процессами синтеза белка и клеточным дыханием. Два процесса, где наблюдалось снижение интенсивностей белков, связаны с метаболизмом аминокислот и глутатиона. Для образцов, облученных токсической дозой ультрафиолета, характерно снижение интенсивностей в указанных 6 метаболических путях.

Анализ дифференциальной экспрессии был проведен при помощи пакета edgeR, интегрированного в программу Perseus. После анализа в каждом случае были отобраны клеточные процессы с p-value < 0.05.

При сравнении контрольной и подвергшейся облучению УФ 1 дозой выборок клеточные процессы «Ribosome» и «Spliceosome» приобрели значения log(FC) около -2. Это значит, что экспрессия белков в указанных процессах уменьшилась в 4 раза по сравнению с контролем. При этом иные белки, относящиеся к метаболическому пути «Ribosome» по KeGG вошли в диапазон значений log(FC) > 2. Также увеличение экспрессии наблюдалось у белков, относящихся к «Oxidative phosphorylation».

В случае анализа дифференциальной экспрессии белков выборок подвергшисхся УФ дозой 1 и УФ дозой 2 метаболические пути, связанные с репарацией ДНК «Non-homologous end-joining» и «Base excision repair», были со значительным увеличением регуляции.

При сравнении контрольной и подвергшейся облучению УФ 2 дозой выборок увеличилась экспрессия белков (log(FC) > 2) у процессов, связанных с метаболизмом аминокислот (цистеина, метионина, аспартата, глутамата, аргинина, пролина и аланина), биосинтезом транспортной РНК, сборкой рибосом, сборкой протеосом, метаболизмом пуриновых оснований, а также сигнальным каскадом инсулина. Метаболические пути «Spliceosome», «Proteasome» и «mTOR signaling pathway» приобрели значения log(FC) < 2.

Списки белков, относящихся к указанным метаболическим путям, были приведены к общему формату данных, указанному ниже для загрузки в базу данных MOLE.

16.2.5.4. Протокол загрузки файлов в базу данных MOLE

На момент составления отчетной документации проекта загрузить файлы в MOLE не удалось. Описание загрузки со скриншотами приведено ниже. Для доступа к MOLE машина Molednn запущена (Рис. 16.36).

imolednn Виртуальная машина	Обзор	
	Идентификатор	epdoae2q3mcol40b6c4e
▶ Обзор	Статус	Running
🚡 Диски	Имя	molednn
Файловые хранилища	Дата создания	16.07.2022, в 14:01
Резервные копии PREVIEW	Внутренний FQDN	molednn.ru-central1.internal
Ξ Операции	Зона доступности	.ru-central1-b
мониторинг	Ресурсы	
_ Серийная консоль	Платформа	Intel Cascade Lake
🖹 Последовательный порт	Гарантированная доля vCPU	
	vCPU	4
	RAM	
Јокументация	Объём дискового пространства	
оздать виртуальную машину арифы Compute Cloud	Прерываемая	да

Рисунок 16.36 – На ЯндексКлауд запущена Molednn, с ice lake 50% (без GPU)

Было указано название датасета – «chorion proteins», подгружен файл с записями о белках в поля «сырой файл» и «обработанный файл», выбрана схема загрузки «proteome samples» (Puc. 16.37).

Создать эксперимент	
Имя эксперимента* chorion-proteins	Схема парсинга
Обработанный файл выбрать файл Тable_S1.xlsx	proteome_samples
Сырой файл выбрать файл Table_S1.xlsx	Парсер - tsv
Имя схемы proteome_samples 🛟	Разделитель - Табуляция ?
Проверить данные по схеме	Заголовки

Рисунок 16.37 – Указаны файлы для загрузки, имя эксперимента и схема загрузки «proteome_samples»

Однако, при нажатии кнопки «Проверить данные по схеме» появляется ошибка (Рис. 16.38). Для загрузки файлов был использован Firefox версии 105.0.2 (64-битная).

MOLE Домашняя Эксперимент Администрирование Avogadro

Произошла системная ошибка

Load failed

Свяжитесь с администратором для решения этой проблемы

Рисунок 16.38 – Ошибка загрузки данных в БД

16.2.6. Подготовка данных метаболомных экспериментов

16.2.6.1. Обоснование выбора биологического материала и аналитического метода получения мультиомных данных

Патологические процессы, связанные с нарушениями метаболизма, например, ожирение, отражаются на изменении клеточного и системного метаболома. Наиболее легко доступным биологическим материалом, характеризующим системный метаболом является плазма крови человека. Согласно Human Metabolome Database (HMDB) [399] в плазме крови выявлено около 20 тыс. метаболитов. Такая информационная ёмкость в рамках мультиомного исследования позволит определить системные изменения при развитии заболевания. Масс-спектрометрия прямого ввода (DIMS) с масс-анализатором QTOF зарекомендовала себя как метод выбора для нецелевого анализа плазмы крови человека. Преимущество DIMS-QTOF заключается в высокой скорости проведения аналитического эксперимента: всего 1 минута на образец [400]. Получаемые спектры насыщены пиками (детектируется более 10 тысяч пиков) соединений и их производных — солевых форм метаболитов, а также их возможных фрагментов. Такого рода спектры дают информацию о характерных признаках — значениях отношения массы к заряду, которые отличают исследуемый образец от других. Выявление статистически значимых признаков, по которым выстраивается дальнейший план целевого (таргетного) анализа — одна из главных задач нецелевого анализа метаболома.

При помощи масс-спектрометрии прямого ввода также осуществляется метаболомное профилирование — определение совокупности конкретных метаболитов в биологическом образце. Вследствие отсутствия дополнительных характеристик метаболитов, например, времени удержания и фрагментации, для аннотации пиков используется биологический контекст в виде метаболических путей или модулей. При помощи биологического контекста метаболиты подтверждаются байесовским или статистическим подходом [401]. Мы применяем статистический подход, который аннотирует метаболиты по распределению связанных признаков в одном метаболическом модуле (графе).

Как нецелевой анализ, так и метаболомное профилирование на первом этапе обработки данных требует достаточно точную идентификацию пиков в массспектрах. При испытании ранее разработанной стандартной операционной процедуры (СОП) обработки метаболомных данных масс-спектрометрии прямого ввода было обнаружено, что XCMS определяет значительно меньшее количество пиков, в сравнении с проприетарным программым обеспечением COMPASS DataAnalysis (Bruker Daltonics, MA, USA). В связи с этим, был проведен дополнительный поиск программного обеспечения, которое выдает сопоставимый результат.

16.2.6.2. Модификация стандартной операционной процедуры обработки массспектров прямого ввода

Предыдущая версия СОП основывалась на обработке в программном модуле XCMS результатов масс-спектрометрии прямого ввода по опубликованному пайплайну для данных FT-ICR [402]. В данных DIMS с масс-анализатором QTOF этот метод позволил обнаружить в среднем всего по 450 пиков на образец, что на порядок величины меньше, чем результаты обработки этих же спектров в программе DataAnalysis (Bruker Daltonics) (см. Таблицу 16.14).

Для создания новой версии СОП (Приложение Е) основывались на сходстве принципов получения масс-спектров прямого ввода и масс-спектров матричноактивационной лазерной десорбции-ионизации (MALDI-MS). С использованием программных пакетов языка R MALDIquant и MetaboAnalystR (модуль Mummichog)

реализована типовая последовательность обработки масс-спектрометрических данных, включая этапы выявления пиков, аннотации соединений по пикам и картирования их на метаболические пути. Наиболее представленные по количеству аннотированных соединений метаболические пути сопоставлены между двумя подходами: с применением DataAnalysis/MatLab (коммерческое решение) и MALDIquant/Mummichog (общедоступные программы) [403]. В качестве эталона выбрали результаты обработки и анализа масс-спектров прямого ввода, полученных в ИБМХ Лоховым П.Г и соавторами при помощи програмыы DataAnalysis, поступившей вместе с прибором maXis Impact II (Bruker Daltonics) [401].

В таблице 16.14 представлены результаты комбинаций фильтров скользящего среднего и Савицкого-Голея с двумя методами подавления шума: median absolute deviation (MAD) и SuperSmoother. На примере метода скользящего среднего показана зависимость числа пиков от параметра полуширины окна сглаживания. При грубом сглаживании (hws = 1) получали сравнительно большее количество пиков, до 10 тыс. в среднем. При более широком окне (hws = 4) число пиков было в на 30-40% ниже, чем взятое за эталон значение. Если сглаживать не скользящим средним, а алгоритмом Савицкого-Голея, то число пиков и разброс среднего значения 9274 \pm 297 практически точно совпадают с данными, полученными в DataAnalysis (9333 пика). Для СОП выбрали метод Савицкого-Голея (обозначено в Таблице 16.14 фоном).

cestastenounum uni	neneuonoemen n o	требеления шум	л			
Алго	ритм	Число н	по найденных пиков (± ст.откл.)			
Сглаживание	Установление	MALDIquant	COMPASS	XCMS		
	шума		DataAnalysis			
MovingAverage	MAD1	9908 ± 354	9333 ± 416	447 ± 141		
(hws = 2)	SuperSmoother2	10768 ± 698				
MovingAverage	MAD	8887 ± 144				
(hws = 3)	SuperSmoother	8113 ± 261				
MovingAverage	MAD	5778 ± 164				
(hws = 4)	SuperSmoother	6728 ± 348				
SavitzkyGolay	MAD	9274 ± 297	-			
(hws = 4)	SuperSmoother	9834 ± 584				

Таблица 16.14 — Количество найденных пиков с использованием разных алгоритмов сглаживания интенсивностей и определения шума

Примечание: 1 MAD – медианное абсолютное отклонение

2 SuperSmoother – непараметрическая регрессионная оценка Фридмана

Фильтр MovingAverage, применяемый стандартно в функции MALDIquant::smoothIntensity как в комбинации с MAD, так и с программой SuperSmoother покрывает всего 60% общего числа пиков, определенных COMPASS DataAnalysis [401]. То есть, более половины пиков совпадают, что потребовало подбора параметров модели сглаживания. В случае установления шума при помощи MAD наблюдали, что при снижении параметра half window size с 4-х до 2-х наблюдали резкое увеличение числа масс-спектрометрических пиков до 9908. Комбинации MovingAverage с SuperSmoother и MAD при half window size = 2 приводили к идентификации низкоинтенсивных шумовых пиков, что делает его использование для QTOF данных некорректным.

Сопоставление количества найденных с использованием подходов COMPASS/MatLab (коммерческое решение) и MALDIquant/Mummichog (общедоступные программы) пиков показало, что оптимальным является установление параметров (MovingAverage (hws = 4)/ SuperSmoother, при котором разница между количеством найденных пиков минимальна.

Совпадающее количество пиков не означает, что эти пики, полученные разными инструментами, идентичны по значениям m/z. Поэтому для корректного сопоставления ранее опубликованного и предлагаемого здесь подход осуществлено картирование метаболомных профилей на биохимические пути.

На рисунке 16.39а показано, что применение подхода COMPASS/MatLab выявляет 390 метаболитов (p-value < 0.01) в образцах плазмы крови добровольцев с третьей стадией ожирения. Разработанный алгоритм применения MALDIquant/Mummichog позволяет идентифицировать определить в тех же образцах 920 метаболитов (с огрублением p-value до 0.99). То есть это все пики, соотнесенные с метаболитами, а не только те, которые относятся к различиям нормы и стадий ожирения. Как видно на рисунке 16.39а, наблюдение безусловно связано с загрублением по параметру p-value, однако нельзя также исключать меньшую эффективность алгоритма устранения шума при обработке масс-спектров согласно алгоритму MALDIquant. Приобретая большую универсальность по отношению к разным масс-спектрометрическим платформам, MALDIquant показывает более низкую специфичность определения пиков, то есть определяет «шумовые» массспектрометрические пики с низкой интенсивностью, которые не соответствуют

реально содержащимся в пробе соединениям.

Кроме зашумлённости выдаваемых программой MALDIquant результатов всего 30% пересечения множеств метаболитов на рисунке 16.39а связано с особенностями работы модуля Mummichog.



Рисунок 16.39 – (а) Пересечение множеств аннотированных метаболитов, относящихся к третьей стадии ожирения. Розовый круг обозначает множество метаболитов, определенных с учетом биологического контекста, осуществленного в среде разработки MatLab с последующим применением теста Вилкоксона. В список вошли метаболиты со значением p-value < 0.01. Зеленый круг обозначает множество метаболитов, аннотированных при помощи алгоритма Mummichog, как части программного пакета MetaboAnalystR в RStudio. (б) Conoставление множеств детектированных двумя алгоритмами метаболитов, относящихся к синтезу стероидных гормонов. Розовый круг – количество метаболитов, найденных алгоритмом, учитывающим биологический контекст, зелёный круг – количество метаболитов, найденных Mummichog

Для сопоставления результатов работы подходов в качестве примера отобрали метаболиты, участвующие в биосинтезе стероидных гормонов, найденные в образцах пациентов с третьей стадией ожирения (см. рисунок 16.39б)

Одной из возможных причин неполного пересечения перечня найденных метаболитов могут быть сравнительно низкая специфичность определения пиков

подхода MALDIquant/Mummichog: для увеличения покрытия используется огрубление по p-value, что может приводить к ложноположительным результатам, возникающим из-за разметки шумовых пиков в качестве целевых. Другой возможной причиной несовпадений множеств может быть разница алгоритмических подходов при сопоставлении параметра m/z и наименования метаболита. MALDIquant/Mummichog использует более широкое комбинаторное поле за счет аддуктов.

Пересечение множеств метаболитов, полученных с использованием COMPASS/MatLab (n=40) и MALDIquant/Mummichog (n=59) составляет 50% (n=33) от общего количества найденных двумя подходами метаболитов (n=66), см. рисунок 16.396.

На Рисунке 16.40 приведены ранжированные перечни метаболических путей, полученные инструментом MSEA (модуль определения степени обогащения наборов метаболитов в биохимических путях) для данных, полученных подходом COMPASS/MatLab (рисунок 16.40а) и MALDIquant/Mummichog (40б). Слева на рисунке 16.40 показан результат MSEA, полученный с использованием подхода COMPASS DataAnalysis и алгоритма аннотации в MatLab. Справа приведена (см. рисунок 16.40б) построенная аналогичным образом диаграмма для случая, когда вместо COMPASS и MatLab применяли MALDIquant в сочетании с Mummichog.



Рисунок 16.40 — Metabolite set enrichment analysis (MSEA, [404]): метаболом, характеризующий третью стадию ожирения. Результаты анализа набора метаболитов в выборке пациентов с ожирением 3 стадии с использованием вебплатформы MetaboAnalyst 4.0 [401] (a) и с использованием MetaboAnalyst 5.0 (б). Градиент цвета от красного к жёлтому показывает уровень значимости (p-value), характеризующий достоверность выявления метаболических путей на основе данных DIMS

Применение подхода COMPASS/MatLab позволило выявить метаболические пути с высокими значениями достоверности (p-value < 0.01). Первый из метаболических путей – биосинтез стероидов отличается по интенсивности в когортах с ожирением и нормой более чем на четыре порядка (см. параметр Fold Enrichment). Результаты MALDIquant/Mummichog не выявляют с наибольшей достоверностью метаболические пути, относящиеся к нарушениям метаболизма при ожирении: обогащение выборки метаболитов незначительное в рамках одного порядка величины, а статистические различия недостоверны (p-value > 0.2). Например, в диаграмме слева метаболический путь биосинтеза стероидов имел наибольшую достоверность, однако на диаграмме справа видно, что этот путь не имеет статистической значимости и едва набирает значение Fold Enrichment = 0.6.



Рисунок 16.41 — Сопоставление результатов применения методов MSEA and Pathway Analysis пайплайнов по COMPASS и MALDIquant. (a) Результаты анализа набора метаболитов, показанные ранее на рисунке 40a, в выборке людей с ожирением 3 стадии. (б) Результаты работы модуля Pathway Analysis вебплатформы MetaboAnalyst 5.0, полученные с использованием аннотированных программой Mummichog метаболитов из масс-спектров прямого ввода образцов плазмы крови, относящихся к третьей стадии ожирения. Match Status означает, сколько идентифицированных метаболитов попало в метаболический путь

Рисунок 16.41 содержит диаграмму MSEA (Рисунок 16.41а), сопоставленную с результатами поиска метаболических путей инструментом Pathway Analysis (рисунок 16.41б), результаты работы которого отранжированы по значениям p-value. Например, биосинтез желчных кислот не случаен относительно метаболических нарушений при ожирении (p-value < 10-8). При сопоставлении первых пяти метаболических путей, показанных на рисунке 16.416, с результатами MSEA (рисунок 16.41а) с учетом особенностей биохимического происхождения метаболитов в организме, к биосинтезу стероидов («steroidogenesis») отнесли «primary bile acid biosynthesis» и «steroid biosynthesis», поскольку входящие в оба метаболических пути соединения по химической природе входят в класс стероидов и являются производными холестерола.

Аналогичным образом, опираясь на структурные формулы метаболитов, соотнесены другие два пункта обогащения наборов метаболитов (MSEA). С помощью метода MALDIquant/Mummichog масс-спектрометрически выявили соединения, участвующие в метаболизме андрогенов, эстрогенов, андростендиона, а также эстрона. Перечисленные соединения являются стероидными гормонами и могут быть сопоставлены биосинтезу стероидных гормонов (рисунок 16.41). Статистическая значимость определенных при помощи модуля Pathway Analysis веб-платформы MetaboAnalyst 5.0 путей характеризуется p-value < 0,003. 16 соединений попали в путь, обозначенный в базе данных KeGG как «Retinol metabolism». К метаболизму ретинола относятся биохимические процессы, связанные с превращением витамина А в организме человека. Известно, что ретиноевые кислоты влияют на пролиферацию адипоцитов как белой, так и бурой жировой ткани.

16.2.6.3. Информация о структуре исходных файлов

В результате измерений получили исходные данные общим объемом 5,12 ГБ, распределенных сответсвенно числу образцов по 100 папкам с расширением «.d» (см. Рис. 42). В каждой «.d»-папке находились сведения о настройках режима измерения масс-спектров, а также бинарный файл с массивами значений зарегистрированных масс-зарядных характеристик ионов и их интенсивностей.

Исходный формат преобразовывался программой MSConvert в mzML. Полученные mzML-файлы содержали в себе 60 масс-спектров, соответствующие 60 сканам прибора, производимым за 1 минуту анализа одного образца. Файлы в формате mzML загружались на виртуальную машину metabolomics.



Рисунок 16.42 – (а) Содержание .d-папки. (б) Структура файла .mzML, полученного после конвертации при помощи MSConvert исходной папки .d

16.2.6.4. Обработка исходных данных

Обработка исходных данных в формате mzML производилась на виртуальной машине metabolomics на платформе Яндекс.клауд в интерактивной среде разработки RStudio. Масс-спектры импортировались в объекты языка R при помощи пакета MALDIquantForeign. Определение пиков, выравнивание найденных пиков по образцам и формирование списков масс осуществлялось при помощи программы MALDIquant. Аннотация списков масс выполнялась с использованием программного пакета MetaboAnalystR модулем Mummichog. Формирование итоговой таблицы представленности метаболитов в образцах осуществлялось разработанными скриптами для поиска связанных с метаболитами белков и генов. Результирующая таблица загружалась в базу данных MOLE.

16.2.6.5. Протокол загрузки файлов в базу данных МОLE

Итоговые таблицы, сохраненные в tsv-файлах, загружались в базу данных MOLE. Таблицы содержали в себе следующие колонки: «Query», «Match», «HMDB», «UniProt» и «GeneEnsemblId». Одна таблица отображала низкомолекулярный состав одного биологического образца плазмы крови человека. Пример содержания результирующего файла приведен в таблице 16.15 и на рисунках 16.42-16.44.

Таблица 16.15 _ Структура таблицы, содержащей информацию 0 низкомолекулярном профиле одного биологического образца плазмы крови человека. Колонка «Query» содержит в себе идентификаторы метаболитов по базе данных KeGG; «Match» — названия метаболитов; «HMDB» — идентификаторы метаболитов по Human Metabolome Database; «UniProt» — идентификаторы по UniProt белков, связанных с найденными метаболитами; базе данных «GeneEnsemblId» — идентификаторы по базе данных Ensembl генов, кодирующих белки, указанные в колонке «UniProt»

Query	Match	HMDB	UniProt	EnsemblGeneId
C0428	L-1-Pyrroline-3-hydroxy-5-	HMDB000136	P30038	ENSG0000015942
1	carboxylate	9		3
C0428	1-Pyrroline-4-hydroxy-2-	HMDB000223	P14920	ENSG000000272
2	carboxylate	4		6
C0012	D-Galactose	HMDB000014	None	None
4		3		

На вкладке «Эксперимент» в поле «Имя эксперимента» вводили «DIMS_metabolome_normal_vs_obesity», в поле «Обработанный файл» загружали «InputInDataBase_1_3.tsv», «Сырой файл» — «Plasma Sample 01 50-fold Los 10 PM_27082019_3.mzML». Для данного вида таблиц выбрали в базе данных JSON-

схему эксперимента — «metabolome».

(a)	(б)
Создать эксперимент	импортировать эксперимент очистить форму Предварительный просмотр
-Vara accreptionaria * DIMS_metabolome_normal_vs_obesity	("experimentName":"DIMS_metabolome_normal_vs_obesity";"query":"C00819";"match":"D- Glutamine";"hmdb":"HMDB0003423"; uniprot":"O94925";"ensembl":"ENSG00000115419")
Обработанный файл Выберитенной inputInDatormal.csv	("experimentName"."DIMS_metabolome_normal_vs_obesity","query"."C00243","match"."Alpha- Lactose","hmdb"."HMDB0000186","uniprot"."C9NZD2","ensembl":"ENSG00000139433")
Сырой файл Вависполодовия Plasma S9_3.mzML	Copedor annual chain "Tella" ("experimentName":"DIMS_metabolome_normal_vs_obesity","query":"C00449","match":"Saccharopine","hmdb":"Hi G00000008311")
Имя схемы Instabolizme Проверить данные по схеме	("experimentName"."DIMS_metabolome_normal_vs_obesity", query"."C00430", "match"."5-Aminolevulinic acid", "hmbb"."HMDB0001149", "uniprot"."P13716", "ensembl"."ENSG00000148218")
	<u>косноса с миниси</u> уласти улас Проверить датечие по слеме

Рисунок 16.43 – (а) Создание эксперимента DIMS_metabolome_normal_vs_obesity по JSON-схеме «metabolome». В качестве обработанного файла загружали InputInDataBase_1_3.tsv, соответствующего метаболомному профилю 3 образца плазмы крови (Plasma Sample 01 50-fold Los 10 PM_27082019_3.mzML). (б) Предварительный просмотр обработанных данных демонстрирует структуру получаемого JSON-файла по загруженному обработанному файлу. Каждый ключ соответствует имени колонки таблицы из файла, а значение — содержимому ячейки таблиц

В разделе «Администрирование» в подразделе «Metabolomes» в результате загрузки файла в базу данных MOLE отображены метаболиты из обработанного файла (рисунок 16.44).

≣	Metabolomes		ld ↑	Experiment name	Query	Match	Hmdb	Uniprot
≣	Genemappings		633c3222a8db46059a7abdd2	DIMS_metabolome_normal_vs_obesity	C14825	9,10-Epoxyoctadecenoic acid	HMDB0004701	Q6NWL
≣	Quant sfs		633c3222a8db46059a7abdd3	DIMS_metabolome_normal_vs_obesity	C02050	Linoleoyl-CoA	HMDB0001064	Q86TX:
≣	Gencode feature counts					trans-3,4-Dihydro-3,4-		
=	Metabolome samples		633c3222a8db46059a7abdce	DIMS_metabolome_normal_vs_obesity	C19490	dihydroxy-7,12- dimethylbenz[a]anthracene	HMDB0060517	P07098
=	Proteome samples		633c3222a8db46059a7abdd1	DIMS_metabolome_normal_vs_obesity	C02593	Tetradecanoyl-CoA	HMDB0001521	A4FU6!
			633c3222a8db46059a7abdcf	DIMS_metabolome_normal_vs_obesity	C05766	Uroporphyrinogen I	HMDB0002211	P10746
			633c3222a8db46059a7abdcd	DIMS_metabolome_normal_vs_obesity	C00430	5-Aminolevulinic acid	HMDB0001149	P13716

Рисунок 16.44 — Отображение метаболитов из загруженного обработанного файла, соответствующего третьему образцу плазмы крови, разделе «Администрирование» в подразделе «Metabolomes». Каждому найденному метаболиту из эксперимента в базе данных присваивается уникальный идентификатор, указанный в колонке «Id»

Разработанная по п.2.16 ПГ м в соответствие с пп.5.17 и 7.1.2.3 ТЗ единая база данных MOLE (Multi-Omics Learned to Extend) для обработки полученных результатов транскриптомных, протеомных и метаболомных экспериментов

описана в пакете Программной документации: файлы «Пункт_ПГ-2.16-ххх», где «ххх» – краткое название документа.

Работы по пункту 2.116 плана-графика выполнены в полном объеме и соответствуют пунктам 5.17, 6.1.6 и 7.1.2.3 технического задания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках отчетного периода проведено исследование возможностей УНУ для регистрации отдельных использования «Авогадро» молекул (нанопоровый детектор) И белков (АСМ-детектор). нуклеиновых кислот Полученные результаты являются фундаментальной основой для дальнейших экспериментов и систематических наблюдений за отдельными молекулами, что позволит перейти на новый уровень анализа патологических состояний организма. Далее суммированы ключевые результаты, полученные за отчетный период в соответствии с Планом-графиком и Техническим заданием Соглашения.

Сформирована аннотированная коллекция биологических образцов биоматериала, включающая плазму и сыворотку крови пациентов, клеточные линии и образцы ткани. Сбор образцов проведен в соответствие с документами, разработанными на первом этапе работ – «Перечнем требований к образцам и характеристикам доноров для формирования коллекций» и «Протоколом сбора, хранения, транспортировки биологических образцов, отвечающих особенностям эксплуатации УНУ «Авогадро». В коллекцию включены стандартизированные образцы, пригодные для последующего мультиомного экспериментального анализа методами на основе молекулярных детекторов, а также с применением высокопроизводительных методов анализа (масс-спектрометрии). Образцы коллекции использованы в экспериментальной части работ текущего этапа.

Для реализации экспериментальных работ с применением молекулярного детектора ACM изготовлены чипы с функционализированной поверхностью. В процессе работ утверждены изменения в ранее разработанный «Лабораторный регламент получения ACM-чипов с функционализированной поверхностью». Изменения касаются уменьшения концентрации кросс-линкера в растворе для активации поверхности, что оптимизирует процедуры функционализации.

В части разработки методических основ высокочувствительного анализа с применением ACM разработана и апробирована «Методика детекции белков с необратимого использованием связывания на поверхности АСМ-чипа И последующим масс-спектрометрическим анализом в биологических образцах». Определено влияние этапов подготовки пробы на результаты массспектрометрической идентификации белков, выловленных на поверхность АСМ-

чипа. Показана высокая чувствительность анализа с применением ACM/MC подхода: белок сыворотки крови – альбумин детектирован в буферном растворе при концентрации 10⁻¹³ М.

Разработано и частично протестировано специальное ПО для обработки данных, полученных с помощью молекулярного детектора – ACM. Показана работоспособность программного продукта, полное тестирование его будет осуществлено на следующем этапе работ по разработанной Программе и методике испытаний. Работоспособность разработанного ПО показана на примере обработки ACM-изображений наночастиц золота – тестовых объектов, имеющих размер того же порядка, что и биомакромолекулы. Верификация результатов обработки ACMданных проведена с использованием независимых методов – электронной микроскопии и спектрофотометрии.

В части исследований с применением другого молекулярного детектора (нанопроводного детектора, НП-детектора), разработана «Методика анализа содержания нуклеиновых кислот с использованием нанопроводного биосенсора в биологических образцах». Разработанная методика использована для обнаружения микроРНК, ассоциированных с онкологическими заболеваниями различной локализации. Проведен направленный анализ четырех типов микроРНК, ассоциированных с раком предстательной железы (выбраны по результатам анализа литературных данных). Инструментальная составляющая усилена разработкой специального ПО для обработки данных, а также модификацией 20-ти канального НП-детектора (прибора ИС-20СД), входящего в состав УНУ «Авогадро». В составе работ, направленных на повышение качества и информативности результатов экспериментов с применением НП-биосенсора, выполнены исследования по разработке нового типа чипов к НП-детектору, включающих наноструктуры.

Экспериментальные работы с применением нанопорового молекулярного детектора проведены в рамках утверждённой на предыдущем этапе схемы анализа транскриптома в биологических образцах. Разработана методика анализа транскриптома в биологических образцах с использованием нанопорового детектора, включающая четыре этапа: (1) экстракцию суммарной РНК (сРНК) из биологического материала, (2) выделение матричной РНК (мРНК), которая обеспечивает трансляцию генетической информации в белковые продукты, (3)

приготовление библиотеки для секвенирования и (4) секвенирование библиотеки с использованием нанопорового детектора. По результатам работ подобраны оптимальные условия выполнения каждого этапа. Выполнено профилирование клеточной линии Huh7 с использованием нанопорового детектора УНУ «Авогадро» согласно разработанной методике.

Для развития инструментальной составляющей УНУ «Авогадро» проведена работа по разработке нанопорового детектора, предназначенного для анализа свойств единичных белков. В текущем году выполнены работы по формированию мембраны с отверстиями заданного размера и исследованию влияния белков на свойства такой мембраны.

Проведено молекулярное профилирование биологических образцов и разработана «Стандартная операционная процедура молекулярного профилирования протеомного состава биологического образца с использованием масс-спектрометрического детектора». Разработан протокол для повышения чувствительности масс-спектрометрической идентификации белков в ворсинах хориона человека. На основе мета-анализа данных направленного протеомного масс-спектрометрического анализа образцов плазмы здоровых людей сформирован набор референсных значений концентраций белков в плазме крови здорового человека. Сформулированы основные принципы для выбора потенциальных белков для создания панелей мониторинга состояния здоровья человека.

Выполнены экспериментальные работы и разработан СОП проведения панорамного молекулярного профилирования метаболомного состава биологического образца с использованием масс-спектрометрического анализа. Определена область применения разработанного СОП с рекомендациями по применению, включая персонализированную метаболомику. Проведена апробация разработанного СОП для исследования метаболомного профиля биологических образцов, полученных от пациентов с подтвержденным диагнозом «почечноклеточный рак».

Наноразмерные объекты – частицы для доставки лекарств – использованы в качестве тестовых объектов в рамках работ по интеграции молекулярных детекторов в систему разработки новых наноразмерных лекарственных препаратов. Проведена наработка частиц, определены их свойства классическими аналитическими

методами. Разработан и валидирован метод одновременного количественного определения фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина в растворе методом ВЭЖХ. Показана возможность использования АСМ в качестве инструмента для частиц, наноразмерных характеристики предназначенных для доставки лекарственных препаратов. Подобраны условия нековалентной сорбции фосфолипидных наночастиц на поверхности. Частицы визуализированы как в виде единичных объектов, так и в остатке смесей раствора. В работе использована разработанная на первом этапе работ Методика АСМ-визуализации наноразмерных частиц, применяемая для изучения физико-химических свойств наночастиц для доставки лекарств. Образцы охарактеризованы по высоте сорбированных объектов и их жесткости. Для оценки результатов АСМ-анализа использован дополнительный электронной микроскопии. Исследована возможность метод применения наноразмерных частиц в качестве систем доставки биологически активных компонентов. Получено две композиции фосфолипидных наночастиц: с противовирусным компонентом и с нестероидным противовоспалитальным препаратом. Исследована мутагенность разработанной композиции наноразмерных частиц с включенным активным компонентом противовирусного действия. Показано, что, как сама композиция наноразмерных частиц, так и снабженная активным компонентом, не вызывает мутагенного действия.

В рамках проекта разработана единая база данных MOLE (Multi-Omics Learned to Extend). База данных (БД) состоит из нескольких программных комплексов – «База знаний» (обеспечивает доступ к данным), «Учетная система» (предназначен для внесения информации о результатах выполнения технологических операций) и «Система анализа данных» (обработка данных, нейросетевой компонент). Специалистами в области анализа транскриптомных, протеомных и метаболомных данных были обработаны исходные файлы и произведена тестовая загрузка в БД.

В рамках отчетного периода все предусмотренные Планом-графиком работы выполнены полностью в строгом соответствии с требованиями Технического задания Соглашения.

Основные результаты проекты размещены на сайте ИБМХ по ссылке https://www.ibmc.msk.ru/articles/075-15-2021-933

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Anderson N. L. The clinical plasma proteome: a survey of clinical assays for proteins in plasma and serum //Clinical chemistry. $-2010. - T. 56. - N_{\odot} \cdot 2. - C. 177-185.$

2. Dey K. K. et al. Deep undepleted human serum proteome profiling toward biomarker discovery for Alzheimer's disease //Clinical proteomics. – 2019. – T. 16. – №. 1. – C. 1-12.

3. Erickson B. K. et al. A strategy to combine sample multiplexing with targeted proteomics assays for high-throughput protein signature characterization //Molecular cell. $-2017. - T. 65. - N_{\odot}. 2. - C. 361-370.$

 Naulin Gysling P. A., Alveal Fuentealba N., Barrera Rojas N. P. Toward atomic force microscopy and mass spectrometry to visualize and identify lipid rafts in plasmodesmata. – 2014.

5. Еремеев А.В., Светлаков А.В., Полстяной А.М., Богомазова А.Н., Филоненко Е.С., Шеина Ю.И., Киселев С.Л., Лагарькова М.А. Получение новой линии ЭСК человека в отсутствие фидера и сыворотки. Доклады Академии наук. 2009. Т. 426. № 2. С. 270-272.

6. Naryzhny S. N. et al. Experimental estimation of proteome size for cells and human plasma //Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. – 2015. – T. 9. – №. 4. – C. 305-311.

7. Плешакова Т. О. и др. Обнаружение ядерного антигена вирусного гепатита С с помощью чипов к атомно-силовому микроскопу с иммобилизованными аптамерами //биотехнология: состояние и перспективы развития. – 2017. – С. 345-346.

8. Squire P. G., Moser P., O'Konski C. T. Hydrodynamic properties of bovine serum albumin monomer and dimer //Biochemistry. – 1968. – T. 7. – №. 12. – C. 4261-4272.

9. Кузнецова Ксения Глебовна. Влияние химической обработки остатков цистеина в белках на результаты протеогеномного анализа. Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»; 2020.

10. Valueva AA, Shumov ID, Kaysheva AL, et al. Covalent Protein Immobilization onto Muscovite Mica Surface with a Photocrosslinker. Minerals. 2020;10(5):464. doi:10.3390/min10050464

11. Хомутов Геннадий Борисович. Особенности Структурной Ор-Ганизации, Ионные Взаимодействия и Физико-Химические Свойства Мембран и Планарных Биомиметических Наносистем : 03.00.02.

12. Hultberg B, Lundblad A, Masson PK, Ockerman PA. Specificity studies on alphamannosidases using oligosaccharides from mannosidosis urine as substrates. Biochim Biophys Acta. 1975;410(1):156-163. doi:10.1016/0005-2744(75)90216-8.

13. Crestfield AM, Moore S, Stein WH. The preparation and enzymatic hydrolysis of reduced and S-carboxymethylated proteins. J Biol Chem. 1963;238:622-627.

14. Berman HM. The Protein Data Bank. Nucleic Acids Res. 2000;28(1):235-242. doi:10.1093/nar/28.1.235.

15. Sayle RA, Milner-White EJ. RASMOL: biomolecular graphics for all. Trends Biochem Sci. 1995;20(9):374. doi:10.1016/s0968-0004(00)89080-5.

16. Militello V, Vetri V, Leone M. Conformational changes involved in thermal aggregation processes of bovine serum albumin. Biophys Chem. 2003;105(1):133-141. doi:10.1016/S0301-4622(03)00153-4.

17. Introduction to Gold Nanoparticle Characterization. – URL: https://www.cytodiagnostics.com/pages/introduction-to-gold-nanoparticle-characterization (дата обращения: 05.01.2023).

18. He Y.Q., Liu S.P., Kong L., Liu Z.F. A study on the sizes and concentrations of gold nanoparticles by spectra of absorption, resonance Rayleigh scattering and resonance non-linear scattering//Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2005, Vol. 61, No. 13, P. 2861-2866.

19. nanoComposix Gold Nanoparticles: Optical Properties. – URL: https://nanocomposix.com/pages/gold-nanoparticles-optical-properties (дата обращения: 05.01.2023).

20. Nečas D., Klapetek P. Gwyddion: an open-source software for SPM data analysis//Open Physics, 2012, Vol. 10, Gwyddion, No. 1, P. 181-188.

An introduction to molecular biotechnology: molecular fundamentals, methods, and applications in modern biotechnology / ed. Wink M. Weinheim: Wiley-VCH, 2006. 768 p.
 Buckingham L., Flaws M.L. Molecular diagnostics: fundamentals, methods, & clinical applications. Philadelphia: F.A. Davis, 2007. 462 p.

23. Tan S.C., Yiap B.C. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present // Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2009. Vol. 2009. P. 1–10.

24. Gjerde D.T., Hoang L., Hornby D. RNA purification and analysis: sample preparation, extraction, chromatography. Weinheim: Wiley-VCH-Verl, 2009. 195 p.

25. Griffiths L., Chacon-Cortes D. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives // BSAM. 2014. P. 1.

26. Esser K.-H., Marx W.H., Lisowsky T. maxXbond: first regeneration system for DNA binding silica matrices // Nat Methods. 2006. Vol. 3, № 1. P. i–ii.

27. Department of Biology, Davidson College. Geneclean® http://www.bio.davidson.edu/courses/Molbio/MolStudents/spring99/lauren/geneclean.ht ml.

28. Nicosia A., Tagliavia M., Costa S. Regeneration of total RNA purification silicabased columns // Biomed. Chromatogr. 2010. Vol. 24, № 12. P. 1263–1264.

29. Berensmeier S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids // Appl Microbiol Biotechnol. 2006. Vol. 73, № 3. P. 495–504.

Bio-Nobile Oy. QuickPickTM Plasmid DNA. Turku, Findland: Bio-Nobile Oy; 2003.
 QIAGEN Inc. QAsymphony® DNA Handbook. Alameda, Calif, USA: QIAGEN; 2008.

32. Sambrook J., Russell D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 3 p.

33. Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on // Nat Protoc. 2006. Vol. 1, N_{2} 2. P. 581–585.

34. Kang J.-E. et al. Effects of RBC removal and TRIzol of peripheral blood samples on RNA stability // Clinica Chimica Acta. 2011. Vol. 412, № 19–20. P. 1883–1885.

35. Perry R.P. et al. On the lability of poly(A) sequences during extraction of messenger RNA from polyribosomes // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Nucleic Acids and Protein Synthesis. 1972. Vol. 262, N_{0} 2. P. 220–226.

36. Ruggieri J. et al. Techniques for Nucleic Acid Purification from Plant, Animal, and Microbial Samples // Sample Preparation Techniques for Soil, Plant, and Animal Samples / ed. Micic M. New York, NY: Springer New York, 2016. P. 41–52.

37. Rio D.C. et al. Purification of RNA Using TRIzol (TRI Reagent) // Cold Spring Harb Protoc. 2010. Vol. 2010, № 6. P. pdb.prot5439.

38. Hummon A.B. et al. Isolation and solubilization of proteins after TRI ZOL ® extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage // BioTechniques. 2007. Vol. 42, № 4. P. 467–472.

39. Wu C.-C. et al. Label-Free Detection of BRAF V599E Gene Mutation Using Side-Gated Nanowire Field Effect Transistors // J. Electrochem. Soc. 2018. Vol. 165, № 13. P. B576–B581.

40. Janissen R. et al. InP Nanowire Biosensor with Tailored Biofunctionalization: Ultrasensitive and Highly Selective Disease Biomarker Detection // Nano Lett. 2017. Vol. 17, № 10. P. 5938–5949.

41. Li J. et al. Monitoring of Dynamic Processes during Detection of Cardiac Biomarkers Using Silicon Nanowire Field-Effect Transistors // Adv. Mater. Interfaces. 2020. Vol. 7, № 15. P. 2000508.

42. Precazzini F. et al. Measurements Methods for the Development of MicroRNA-Based Tests for Cancer Diagnosis // IJMS. 2021. Vol. 22, № 3. P. 1176.

43. Bayraktar R., Van Roosbroeck K., Calin G.A. Cell-to-cell communication: microRNAs as hormones // Mol Oncol. 2017. Vol. 11, № 12. P. 1673–1686.

44. Olejniczak M., Kotowska-Zimmer A., Krzyzosiak W. Stress-induced changes in miRNA biogenesis and functioning // Cell. Mol. Life Sci. 2018. Vol. 75, № 2. P. 177–191.

45. Iorio M.V., Croce C.M. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review // EMBO Mol Med. 2012. Vol. 4, № 3. P. 143–159.

46. Yang N. et al. MicroRNAs: Pleiotropic Regulators in the Tumor Microenvironment // Front. Immunol. 2018. Vol. 9. P. 2491.

47. Kong Y.W. et al. microRNAs in cancer management // The Lancet Oncology. 2012.
Vol. 13, № 6. P. e249–e258.

48. Friedman R.C. et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs // Genome Res. 2009. Vol. 19, № 1. P. 92–105.

49. Norouzi M. et al. Recent advances on nanomaterials-based fluorimetric approaches for microRNAs detection // Materials Science and Engineering: C. 2019. Vol. 104. P. 110007.
50. Brett M. R. et al. Epidemiology of ovarian cancer: a review // Cancer Biology & Medicine. 2017. Vol. 14, № 1. P. 9–32.

51. Koutsaki M. et al. The miR-200 family in ovarian cancer // Oncotarget. 2017. Vol. 8, № 39. P. 66629–66640.

52. Iorio M.V. et al. MicroRNA Signatures in Human Ovarian Cancer // Cancer Research. 2007. Vol. 67, № 18. P. 8699–8707.

53. Sommerová L. et al. [MicroRNA Analysis in Epithelial Ovarian Cancer] // Klin Onkol. 2017. Vol. 30, № Supplementum1. P. 180–183.

54. Yoshimura A. et al. Exosomal miR-99a-5p is elevated in sera of ovarian cancer patients and promotes cancer cell invasion by increasing fibronectin and vitronectin expression in neighboring peritoneal mesothelial cells // BMC Cancer. 2018. Vol. 18, № 1. P. 1065.

55. Oliveira D.N.P. et al. Diagnostic plasma miRNA-profiles for ovarian cancer in patients with pelvic mass // PLoS ONE / ed. Kumar V. 2019. Vol. 14, № 11. P. e0225249.

56. Wang W. et al. The Value of Plasma-Based MicroRNAs as Diagnostic Biomarkers for Ovarian Cancer // The American Journal of the Medical Sciences. 2019. Vol. 358, №
4. P. 256–267.

57. Fitriawan A.S. et al. Expression of Circulating MicroRNA-141 in Epithelial Ovarian Cancer // MJMS. 2020. Vol. 27, № 6. P. 27–38.

58. Choi P.-W. et al. Characterization of miR-200 family members as blood biomarkers for human and laying hen ovarian cancer // Sci Rep. 2020. Vol. 10, № 1. P. 20071.

59. Dahiya N. et al. MicroRNA Expression and Identification of Putative miRNA Targets in Ovarian Cancer // PLoS ONE / ed. Hoheisel J. 2008. Vol. 3, № 6. P. e2436.

60. Nam E.J. et al. MicroRNA Expression Profiles in Serous Ovarian Carcinoma // Clinical Cancer Research. 2008. Vol. 14, № 9. P. 2690–2695.

61. Kim S. et al. Serum exosomal miRNA-145 and miRNA-200c as promising biomarkers for preoperative diagnosis of ovarian carcinomas // J. Cancer. 2019. Vol. 10, N_{2} 9. P. 1958–1967.

62. Ljungberg B. et al. European Association of Urology Guidelines on Renal Cell Carcinoma: The 2019 Update // European Urology. 2019. Vol. 75, № 5. P. 799–810.

63. Crispen P.L. et al. Lymph Node Dissection at the Time of Radical Nephrectomy for High-Risk Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Indications and Recommendations for Surgical Templates // European Urology. 2011. Vol. 59, № 1. P. 18–23.

64. Li M. et al. MicroRNAs in renal cell carcinoma: A systematic review of clinical implications (Review) // Oncology Reports. 2015. Vol. 33, № 4. P. 1571–1578.

65. Heinemann F.G. et al. Serum miR-122-5p and miR-206 expression: non-invasive prognostic biomarkers for renal cell carcinoma // Clin Epigenet. 2018. Vol. 10, № 1. P. 11.
66. Wang C. et al. A panel of five serum miRNAs as a potential diagnostic tool for early-stage renal cell carcinoma // Sci Rep. 2015. Vol. 5, № 1. P. 7610.

67. Fedorko M. et al. Combination of MiR-378 and MiR-210 Serum Levels Enables Sensitive Detection of Renal Cell Carcinoma // IJMS. 2015. Vol. 16, № 10. P. 23382–23389.

68. Teixeira A.L. et al. Higher circulating expression levels of miR-221 associated with poor overall survival in renal cell carcinoma patients // Tumor Biol. 2014. Vol. 35, № 5. P. 4057–4066.

69. Dias F. et al. Plasmatic miR-210, miR-221 and miR-1233 profile: potential liquid biopsies candidates for renal cell carcinoma // Oncotarget. 2017. Vol. 8, № 61. P. 103315–103326.

70. Xu Q. et al. Roles and mechanisms of miR-195–5p in human solid cancers // Biomedicine & Pharmacotherapy. 2022. Vol. 150. P. 112885.

71. Jin L. et al. Identification of miR-195-3p as an oncogene in RCC // Molecular Medicine Reports. 2017. Vol. 15, № 4. P. 1916–1924.

72. Trilla-Fuertes L. et al. miRNA profiling in renal carcinoma suggest the existence of a group of pro-angionenic tumors in localized clear cell renal carcinoma // PLoS ONE / ed. Roemer K. 2020. Vol. 15, № 2. P. e0229075.

73. Jung M. et al. MicroRNA profiling of clear cell renal cell cancer identifies a robust signature to define renal malignancy // Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2009. Vol. 13, № 9b. P. 3918–3928.

74. Tang K., Xu H. Prognostic value of meta-signature miRNAs in renal cell carcinoma: an integrated miRNA expression profiling analysis // Sci Rep. 2015. Vol. 5, № 1. P. 10272.

75. Zhang Q. et al. MicroRNA-3619-5p suppresses bladder carcinoma progression by directly targeting β -catenin and CDK2 and activating p21 // Cell Death Dis. 2018. Vol. 9, No 10. P. 960.

76. Bi J. et al. Circ-BPTF promotes bladder cancer progression and recurrence through the miR-31-5p/RAB27A axis // Aging. 2018. Vol. 10, № 8. P. 1964–1976.

77. Zhang L. et al. Dysregulated genes targeted by microRNAs and metabolic pathways in bladder cancer revealed by bioinformatics methods // Oncol Lett. 2018.

78. Dong F. et al. Dysregulation of miRNAs in bladder cancer: altered expression with aberrant biogenesis procedure // Oncotarget. 2017. Vol. 8, № 16. P. 27547–27568.

79. Li X. et al. Bladder cancer diagnosis with a four-miRNA panel in serum // Future Oncology. 2022. P. fon-2022-0448.

80. Wang J. et al. Evaluation of Serum miR-17-92 Cluster as Noninvasive Biomarkers for Bladder Cancer Diagnosis // Front. Oncol. 2021. Vol. 11. P. 795837.

81. Lin G. et al. Identification of circulating miRNAs as novel prognostic biomarkers for bladder cancer // Mathematical Biosciences and Engineering. 2020. Vol. 17, № 1. P. 834–844.

82. Adam L. et al. Plasma microRNA profiles for bladder cancer detection // Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations. 2013. Vol. 31, № 8. P. 1701–1708.

83. Du M. et al. Circulating miR-497 and miR-663b in plasma are potential novel biomarkers for bladder cancer // Sci Rep. 2015. Vol. 5, № 1. P. 10437.

84. Tölle A, Buckendahl L, Jung K. Plasma miR-15b-5p and miR-590-5p for distinguishing patients with bladder cancer from healthy individuals. Oncol Rep. 2019 Oct;42(4):1609-1620.

85. Pignot G. et al. microRNA expression profile in a large series of bladder tumors: Identification of a 3-miRNA signature associated with aggressiveness of muscle-invasive bladder cancer // Int. J. Cancer. 2013. Vol. 132, № 11. P. 2479–2491.

86. Mo M. et al. Roles of mitochondrial transcription factor A and microRNA-590-3p in the development of bladder cancer // Oncol Lett. 2013. Vol. 6, № 2. P. 617–623.

87. Avgeris M. et al. Uncovering the clinical utility of miR-143, miR-145 and miR-224 for predicting the survival of bladder cancer patients following treatment // Carcinogenesis. 2015. Vol. 36, N_{2} 5. P. 528–537.

88. Braicu C. et al. Connecting the dots between different networks: miRNAs associated with bladder cancer risk and progression // J Exp Clin Cancer Res. 2019. Vol. 38, № 1. P. 433.

 Wang L. et al. Prostate Cancer Incidence and Mortality: Global Status and Temporal Trends in 89 Countries From 2000 to 2019 // Front. Public Health. 2022. Vol. 10. P. 811044.

90. Loberg R.D. et al. Pathogenesis and Treatment of Prostate Cancer Bone Metastases: Targeting the Lethal Phenotype // JCO. 2005. Vol. 23, № 32. P. 8232–8241.

91. Schröder F.H. et al. Screening and Prostate-Cancer Mortality in a Randomized European Study // N Engl J Med. 2009. Vol. 360, № 13. P. 1320–1328.

92. Hoey C. et al. Circulating miRNAs as non-invasive biomarkers to predict aggressive prostate cancer after radical prostatectomy // J Transl Med. 2019. Vol. 17, № 1. P. 173.

93. Alhasan A.H. et al. Circulating microRNA signature for the diagnosis of very highrisk prostate cancer // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2016. Vol. 113, N_{2} 38. P. 10655–10660. 94. Zedan A.H. et al. microRNA expression in tumour tissue and plasma in patients with newly diagnosed metastatic prostate cancer // Tumour Biol. 2018. Vol. 40, N_{2} 5. P. 101042831877586.

Schitcu V.H. et al. MicroRNA Dysregulation in Prostate Cancer // PGPM. 2022. Vol.
 Volume 15. P. 177–193.

96. le Sage C. et al. Regulation of the p27Kip1 tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation // EMBO J. 2007. Vol. 26, № 15. P. 3699–3708.

97. Liu J. et al. Upregulation of microRNA-191 can serve as an independent prognostic marker for poor survival in prostate cancer // Medicine. 2019. Vol. 98, № 29. P. e16193.
98. Hsu T.-I. et al. MicroRNA-18a is elevated in prostate cancer and promotes tumorigenesis through suppressing STK4 in vitro and *in vivo* // Oncogenesis. 2014. Vol. 3, № 4. P. e99–e99.

99. Nayak B. et al. Role of miRNA-182 and miRNA-187 as potential biomarkers in prostate cancer and its correlation with the staging of prostate cancer // Int. braz j urol. 2020. Vol. 46, N_{2} 4. P. 614–623.

100. Valera V.A. et al. microRNA Expression Profiling in Young Prostate Cancer Patients// J. Cancer. 2020. Vol. 11, № 14. P. 4106–4114.

101. Brase J.C. et al. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer // Int. J. Cancer. 2011. Vol. 128, № 3. P. 608–616.

102. Waseem M. et al. MicroRNA-183-5p: A New Potential Marker for Prostate Cancer // Ind J Clin Biochem. 2019. Vol. 34, № 2. P. 207–212.

103. Selth L.A. et al. Discovery of circulating microRNAs associated with human prostate cancer using a mouse model of disease // Int. J. Cancer. 2012. Vol. 131, № 3. P. 652–661.

104. Lin H.-M. et al. Phase 2 study of circulating microRNA biomarkers in castrationresistant prostate cancer // Br J Cancer. 2017. Vol. 116, № 8. P. 1002–1011.

105. Ouyang Y. et al. Downregulation of microRNA-429 inhibits cell proliferation by targeting p27Kip1 in human prostate cancer cells: 2 // Molecular Medicine Reports. 2015. Vol. 11, No 2. P. 1435–1441.

106. Davis, F.F.; Allen, F.W. Ribonucleic Acids from Yeast Which Contain a Fifth Nucleotide. J. Biol. Chem. 1957, 227, 907–915.

107. Grosjean, H. RNA Modification: The Golden Period 1995-2015. RNA N. Y. N 2015,21, 625–626, doi:10.1261/rna.049866.115.

108. Frye, M.; Jaffrey, S.R.; Pan, T.; Rechavi, G.; Suzuki, T. RNA Modifications: What Have We Learned and Where Are We Headed? Nat. Rev. Genet. 2016, 17, 365–372, doi:10.1038/nrg.2016.47.

109. Boccaletto, P.; Stefaniak, F.; Ray, A.; Cappannini, A.; Mukherjee, S.; Purta, E.; Kurkowska, M.; Shirvanizadeh, N.; Destefanis, E.; Groza, P.; et al. MODOMICS: A Database of RNA Modification Pathways. 2021 Update. Nucleic Acids Res. 2022, 50, D231–D235, doi:10.1093/nar/gkab1083.

110. Roundtree, I.A.; Evans, M.E.; Pan, T.; He, C. Dynamic RNA Modifications in Gene Expression Regulation. Cell 2017, 169, 1187–1200, doi:10.1016/j.cell.2017.05.045.

111. Zhou, J.; Wan, J.; Gao, X.; Zhang, X.; Jaffrey, S.R.; Qian, S.-B. Dynamic m(6)A MRNA Methylation Directs Translational Control of Heat Shock Response. Nature 2015, 526, 591–594, doi:10.1038/nature15377.

112. 13. Chan, C.T.Y.; Dyavaiah, M.; DeMott, M.S.; Taghizadeh, K.; Dedon, P.C.; Begley, T.J. A Quantitative Systems Approach Reveals Dynamic Control of TRNA Modifications during Cellular Stress. PLoS Genet. 2010, 6, e1001247, doi:10.1371/journal.pgen.1001247.

113. Jonkhout, N.; Tran, J.; Smith, M.A.; Schonrock, N.; Mattick, J.S.; Novoa, E.M. The RNA Modification Landscape in Human Disease. RNA N. Y. N 2017, 23, 1754–1769, doi:10.1261/rna.063503.117.

114. Delaunay, S.; Frye, M. RNA Modifications Regulating Cell Fate in Cancer. Nat. Cell Biol. 2019, 21, 552–559, doi:10.1038/s41556-019-0319-0.

115. Nance, K.D.; Meier, J.L. Modifications in an Emergency: The Role of N1-Methylpseudouridine in COVID-19 Vaccines. ACS Cent. Sci. 2021, 7, 748–756, doi:10.1021/acscentsci.1c00197.

116. Taoka, M.; Nobe, Y.; Yamaki, Y.; Sato, K.; Ishikawa, H.; Izumikawa, K.; Yamauchi, Y.; Hirota, K.; Nakayama, H.; Takahashi, N.; et al. Landscape of the Complete RNA Chemical Modifications in the Human 80S Ribosome. Nucleic Acids Res. 2018, 46, 9289–9298, doi:10.1093/nar/gky811.

117. Legrand, C.; Tuorto, F.; Hartmann, M.; Liebers, R.; Jacob, D.; Helm, M.; Lyko, F. Statistically Robust Methylation Calling for Whole-Transcriptome Bisulfite Sequencing Reveals Distinct Methylation Patterns for Mouse RNAs. Genome Res. 2017, 27, 1589–1596, doi:10.1101/gr.210666.116.

118. Hoernes, T.P.; Hüttenhofer, A.; Erlacher, M.D. MRNA Modifications: Dynamic Regulators of Gene Expression? RNA Biol. 2016, 13, 760–765, doi:10.1080/15476286.2016.1203504.

119. Tan, K.-T.; Ding, L.-W.; Wu, C.-S.; Tenen, D.G.; Yang, H. Repurposing RNA Sequencing for Discovery of RNA Modifications in Clinical Cohorts. Sci. Adv. 2021, 7, eabd2605, doi:10.1126/sciadv.abd2605.

120. Torsin, L.I.; Petrescu, G.E.D.; Sabo, A.A.; Chen, B.; Brehar, F.M.; Dragomir, M.P.; Calin, G.A. Editing and Chemical Modifications on Non-Coding RNAs in Cancer: A New Tale with Clinical Significance. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, E581, doi:10.3390/ijms22020581.

121. Zou, S.; Toh, J.D.W.; Wong, K.H.Q.; Gao, Y.-G.; Hong, W.; Woon, E.C.Y. N(6)-Methyladenosine: A Conformational Marker That Regulates the Substrate Specificity of Human Demethylases FTO and ALKBH5. Sci. Rep. 2016, 6, 25677, doi:10.1038/srep25677.

122. Shi, H.; Wei, J.; He, C. Where, When and How: Context-Dependent Functions of RNA Methylation Writers, Readers, and Erasers. Mol. Cell 2019, 74, 640, doi:10.1016/j.molcel.2019.04.025.

123. Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, Salmon-Divon M, Ungar L, Osenberg S, Cesarkas K, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Kupiec M, Sorek R, Rechavi G. Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. Nature. 2012 Apr 29;485(7397):201-6.

124. Lorenz, D.A.; Sathe, S.; Einstein, J.M.; Yeo, G.W. Direct RNA Sequencing Enables
M6A Detection in Endogenous Transcript Isoforms at Base-Specific Resolution. RNA N.
Y. N 2020, 26, 19–28, doi:10.1261/rna.072785.119.

125. Barbieri, I.; Kouzarides, T. Role of RNA Modifications in Cancer. Nat. Rev. Cancer 2020, 20, 303–322, doi:10.1038/s41568-020-0253-2.

126. Yang, C.; Hu, Y.; Zhou, B.; Bao, Y.; Li, Z.; Gong, C.; Yang, H.; Wang, S.; Xiao, Y. The Role of M6A Modification in Physiology and Disease. Cell Death Dis. 2020, 11, doi:10.1038/s41419-020-03143-z.

127. Deng, L.-J.; Deng, W.-Q.; Fan, S.-R.; Chen, M.-F.; Qi, M.; Lyu, W.-Y.; Qi, Q.; Tiwari, A.K.; Chen, J.-X.; Zhang, D.-M.; et al. M6A Modification: Recent Advances, Anticancer Targeted Drug Discovery and Beyond. Mol. Cancer 2022, 21, 52, doi:10.1186/s12943-022-01510-2.

128. Gott, J.M.; Emeson, R.B. Functions and Mechanisms of RNA Editing. Annu. Rev. Genet. 2000, 34, 499–531, doi:10.1146/annurev.genet.34.1.499.

129. Bazak, L.; Haviv, A.; Barak, M.; Jacob-Hirsch, J.; Deng, P.; Zhang, R.; Isaacs, F.J.; Rechavi, G.; Li, J.B.; Eisenberg, E.; et al. A-to-I RNA Editing Occurs at over a Hundred Million Genomic Sites, Located in a Majority of Human Genes. Genome Res. 2014, 24, 365–376, doi:10.1101/gr.164749.113.

130. Nishikura, K. A-to-I Editing of Coding and Non-Coding RNAs by ADARs. Nat. Rev.Mol. Cell Biol. 2016, 17, 83–96, doi:10.1038/nrm.2015.4.

131. Yang, Y.; Okada, S.; Sakurai, M. Adenosine-to-Inosine RNA Editing in Neurological Development and Disease. RNA Biol. 2021, 18, 999–1013, doi:10.1080/15476286.2020.1867797.

132. Nguyen, T.A.; Heng, J.W.J.; Kaewsapsak, P.; Kok, E.P.L.; Stanojević, D.; Liu, H.; Cardilla, A.; Praditya, A.; Yi, Z.; Lin, M.; et al. Direct Identification of A-to-I Editing Sites with Nanopore Native RNA Sequencing. Nat. Methods 2022, 19, 833–844, doi:10.1038/s41592-022-01513-3.

133. Penzo, M.; Guerrieri, A.N.; Zacchini, F.; Treré, D.; Montanaro, L. RNA Pseudouridylation in Physiology and Medicine: For Better and for Worse. Genes 2017, 8, E301, doi:10.3390/genes8110301.

134. Esteve-Puig, R.; Bueno-Costa, A.; Esteller, M. Writers, Readers and Erasers of RNA Modifications in Cancer. Cancer Lett. 2020, 474, 127–137, doi:10.1016/j.canlet.2020.01.021.

135. Guzzi, N.; Muthukumar, S.; Cieśla, M.; Todisco, G.; Ngoc, P.C.T.; Madej, M.; Munita, R.; Fazio, S.; Ekström, S.; Mortera-Blanco, T.; et al. Pseudouridine-Modified TRNA Fragments Repress Aberrant Protein Synthesis and Predict Leukaemic Progression in Myelodysplastic Syndrome. Nat. Cell Biol. 2022, 24, 299–306, doi:10.1038/s41556-022-00852-9.

136. Guzzi, N.; Muthukumar, S.; Cieśla, M.; Todisco, G.; Ngoc, P.C.T.; Madej, M.; Munita, R.; Fazio, S.; Ekström, S.; Mortera-Blanco, T.; et al. Pseudouridine-Modified TRNA Fragments Repress Aberrant Protein Synthesis and Predict Leukaemic Progression in Myelodysplastic Syndrome. Nat. Cell Biol. 2022, 24, 299–306, doi:10.1038/s41556-022-00852-9.

137. Ma, J.; Song, B.; Wei, Z.; Huang, D.; Zhang, Y.; Su, J.; de Magalhães, J.P.; Rigden, D.J.; Meng, J.; Chen, K. M5C-Atlas: A Comprehensive Database for Decoding and Annotating the 5-Methylcytosine (M5C) Epitranscriptome. Nucleic Acids Res. 2022, 50, D196–D203, doi:10.1093/nar/gkab1075.

138. Malbec, L.; Zhang, T.; Chen, Y.-S.; Zhang, Y.; Sun, B.-F.; Shi, B.-Y.; Zhao, Y.-L.; Yang, Y.; Yang, Y.-G. Dynamic Methylome of Internal MRNA N7-Methylguanosine and Its Regulatory Role in Translation. Cell Res. 2019, 29, 927–941, doi:10.1038/s41422-019-0230-z.

139. Agris, P.F.; Vendeix, F.A.P.; Graham, W.D. TRNA's Wobble Decoding of the Genome: 40 Years of Modification. J. Mol. Biol. 2007, 366, 1–13, doi:10.1016/j.jmb.2006.11.046.

140. Richner, J.M.; Himansu, S.; Dowd, K.A.; Butler, S.L.; Salazar, V.; Fox, J.M.; Julander, J.G.; Tang, W.W.; Shresta, S.; Pierson, T.C.; et al. Modified MRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection. Cell 2017, 168, 1114-1125.e10, doi:10.1016/j.cell.2017.02.017.

141. Wong, S.-S.; Webby, R.J. An MRNA Vaccine for Influenza. Nat. Biotechnol. 2012, 30, 1202–1204, doi:10.1038/nbt.2439.

142. Arzumanian VA, Dolgalev GV, Kurbatov IY, Kiseleva OI, Poverennaya EV. Epitranscriptome: Review of Top 25 Most-Studied RNA Modifications. Int J Mol Sci. 2022 Nov 10;23(22):13851. doi: 10.3390/ijms232213851.

143. International Journal of Biological Macromolecules 27 (2000) 187–194 Interaction of albumins from different species with phospholipid liposomes. Multiple binding sites system Mariana N. Dimitrova a , Hideo Matsumura a,* , Anastassia Dimitrova b , Vassil Z. Neitchev b a Electrotechnical Laboratory, AIST, MITI, Tsukuba 305 8568, Japan b Institute of Biophysics, Bulgarian Academy of Sciences, 1113 Sofia, Bulgaria Received 30 August 1999; accepted 9 January 2000.

144. Am J Physiol Heart Circ Physiol 283: H398–H405, 2002. First published March 7, 2002; 10.1152/ajpheart.00558.2001. Interaction of albumin with the endothelial cell surface KURT OSTERLOH,1,2,3 UWE EWERT,3 AND AXEL R. PRIES1,4 1 Department of Physiology, Freie Universita^{*}t Berlin, 14195 Berlin; 2 Magnettech, 12489 Berlin; 3 Bundesanstalt fu^{*}r Materialforschung und Pru^{*}fung, 12205 Berlin; and 4 Institute of Anesthesiology, Deutsches Herzzentrum Berlin, 13353 Berlin, Germany Received 3 July 2001; accepted in final form 27 February 2002.

145. Archakov, Bachmanova Cytochrome P-450 and Active Oxygen. A.I.Archakov, G.I/ Bachmanova. Taylor and Francis, London, New York, Philadelphia. 1990.P.-339.

146. Mueller, P.; Rudin, D.; Tien, H.; Wescott, W. Reconstruction of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. Nature 1962, 194, 979–980.

147. Johnson, M.E.; Simon, S.; Kauffman, J.W.; Macdonald, R.C. A synthetic lecithin containing branched-chain fatty acids: Physical properties and membrane studies. Biochim. Biophys. Acta (BBA) Biomembr. 1973, 291, 587–591. ; Wang, S.; Larson, R.G. Water channel formation and ion transport in linear and branched lipid bilayers. Phys. Chem. Chem. Phys. 2014, 16, 7251–7262.

148. Archakov A, Zgoda V, Kopylov A, Naryzhny S, Chernobrovkin A, Ponomarenko E, Lisitsa A. Chromosome-centric approach to overcoming bottlenecks in the Human Proteome Project. Expert Rev Proteomics. 2012 Dec;9(6):667-76. doi: 10.1586/epr.12.54.
149. King HA, Gerber AP. Translatome profiling: methods for genome-scale analysis of mRNA translation. Brief Funct Genomics. 2016 Jan;15(1):22-31. doi: 10.1093/bfgp/elu045. Epub 2014 Nov 6.

150. Ilgisonis E, Vavilov N, Ponomarenko E, Lisitsa A, Poverennaya E, Zgoda V, Radko S, Archakov A. Genome of the Single Human Chromosome 18 as a "Gold Standard" for Its Transcriptome. Front Genet. 2021 Jun 14;12:674534. doi: 10.3389/fgene.2021.674534. 151. Vavilov N, Ilgisonis E, Lisitsa A, Ponomarenko E, Farafonova T, Tikhonova O, Zgoda V, Archakov A. Number of Detected Proteins as the Function of the Sensitivity of Proteomic Technology in Human Liver Cells. Curr Protein Pept Sci. 2022;23(4):290-298. doi: 10.2174/1389203723666220526092941.

152. Lian X, Guo J, Gu W, Cui Y, Zhong J, Jin J, He QY, Wang T, Zhang G. Genome-Wide and Experimental Resolution of Relative Translation Elongation Speed at Individual Gene Level in Human Cells. PLoS Genet. 2016 Feb 29;12(2):e1005901. doi: 10.1371/journal.pgen.1005901.

153. Rogers DJ, Tanimoto TT. A Computer Program for Classifying Plants. Science. 1960Oct 21;132(3434):1115-8. doi: 10.1126/science.132.3434.1115.

154. Fitzpatrick H. et al. Bovine serum albumin adsorption to mica surfaces //Colloids and surfaces. $-1992. - T. 65. - N_{\odot} \cdot 1. - C. 43-49.$

155. Hao, P., Ren, Y., Alpert, A. J., & Sze, S. K. (2011). Detection, evaluation and minimization of nonenzymatic deamidation in proteomic sample preparation. Molecular & cellular proteomics : MCP, 10(10), O111.009381.

156. Lundblad R.L. Techniques in protein modification.1994:243 p.

157. Кайшева Анна Леонидовна. Масс-спектрометрический анализ белков на функционализированных чипах для атомно-силового микроскопа. Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича" (ИБМХ); 2022.

158. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. Nat Biotechnol. 2008;26(12):1367-1372. doi:10.1038/nbt.1511

159. Cox J., Neuhauser N., Michalski A., Scheltema R.A., Olsen J.V., Mann M. Andromeda: A Peptide Search Engine Integrated into the MaxQuant Environment.

160. Grant GA. Modification of Cysteine. Curr Protoc Protein Sci. 2017;87(1). doi:10.1002/cpps.22.

161. Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. Nat Methods. 2016;13(9):731-740. doi:10.1038/nmeth.3901

162. Cox J, Hein MY, Luber CA, Paron I, Nagaraj N, Mann M. Accurate Proteome-wide Label-free Quantification by Delayed Normalization and Maximal Peptide Ratio Extraction, Termed MaxLFQ*. Mol Cell Proteomics. 2014;13(9):2513-2526. doi:10.1074/mcp.M113.031591

163. Anderson NL, Polanski M, Pieper R, et al. The Human Plasma Proteome. Mol Cell Proteomics. 2004;3(4):311-326. doi:10.1074/mcp.M300127-MCP200.

164. Tawfik HO, El-Hamaky AA, El-Bastawissy EA, Shcherbakov KA, Veselovsky AV,Gladilina YA, Zhdanov DD, El-Hamamsy MH. New Genetic Bomb Trigger: Design,Synthesis, Molecular Dynamics Simulation, and Biological Evaluation of Novel BIBR1532-Related Analogs Targeting Telomerase against Non-Small Cell Lung Cancer. Pharmaceuticals (Basel). 2022 Apr 14;15(4):481. doi: 10.3390/ph15040481.

165. Hüttenhain, R.; Soste, M.; Selevsek, N.; Röst, H.; Sethi, A.; Carapito, C.; Farrah, T.; Deutsch, E.W.; Kusebauch, U.; Moritz, R.L.; et al. Reproducible quantification of cancerassociated proteins in body fluids using targeted proteomics. Sci. Transl. Med. 2012, 4, 142ra94.

166. Domanski, D.; Percy, A.J.; Yang, J.; Chambers, A.G.; Hill, J.S.; Freue, G.V.C.; Borchers, C.H. MRM-based multiplexed quantitation of 67 putative cardiovascular disease biomarkers in human plasma. Proteomics 2012, 12, 1222–1243.

167. Kumar, A.; Gangadharan, B.; Zitzmann, N. Multiple reaction monitoring and multiple reaction monitoring cubed based assays for the quantitation of apolipoprotein F.J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2016,1033–1034, 278–286.

168. Kopylov, A.T.; Ponomarenko, E.A.; Ilgisonis, E.V.; Pyatnitskiy, M.A.; Lisitsa, A.V.; Poverennaya, E.V.; Kiseleva, O.I.; Farafonova, T.E.; Tikhonova, O.V.; Zavialova, M.G.; et al. 200+ protein concentrations in healthy human blood plasma: Targeted quantitative SRM SIS screening of chromosomes 18, 13, Y, and the mitochondrial chromosome encoded proteome. J. Proteome Res. 2019,18, 120–129.

169. Novikova, S.E.; Farafonova, T.E.; Tikhonova, O.V.; Shushkova, N.A.; Pyatnitsky, M.A.; Zgoda, V.G.; Ponomarenko, E.A.; Lisitsa, A.V. ; Grigoryev, A.I.; Tutelyan, V.A.; et al. Mass-spectrometric MRM analysis of FDA-verified proteins in the blood plasma of healthy volunteers. Biomed. Khim. 2020,66, 294–316.

170. Kuzyk, M.A.; Smith, D.; Yang, J.; Cross, T.J.; Jackson, A.M.; Hardie, D.B.; Anderson, N.L.; Borchers, C.H. Multiple reaction monitoring-based, multiplexed, absolute quantitation of 45 proteins in human plasma. Mol. Cell Proteomics 2009, 8, 1860–1877.

171. Gaither, C.; Popp, R.; Mohammed, Y.; Borchers, C.H. Determination of the concentration range for 267 proteins from 21 lots of commercial human plasma using highly multiplexed multiple reaction monitoring mass spectrometry. Analyst 2020, 145, 3634–3644.

172. Hood L, Flores M (2012) A personal view on systems medicine and the emergence of proactive P4 medicine: predictive, preventive, personalized and participatory. N Biotechnol 29:613–624. doi: 10.1016/J.NBT.2012.03.004.

173. Sagner M, McNeil A, Puska P, et al (2017) The P4 Health Spectrum – A Predictive, Preventive, Personalized and Participatory Continuum for Promoting Healthspan. Prog Cardiovasc Dis 59:506–521. doi: 10.1016/J.PCAD.2016.08.002.

174. Bossuyt PM (2014) Where are all the new omics-based tests? Clin. Chem.

175. Johnson CH, Ivanisevic J, Siuzdak G (2016) Metabolomics: Beyond biomarkers and towards mechanisms. Nat. Rev. Mol. Cell Biol.

176. Macel M, van dam NM, Keurentjes JJB (2010) Metabolomics: The chemistry between ecology and genetics. Mol. Ecol. Resour.

177. Bar N, Korem T, Weissbrod O, et al (2020) A reference map of potential determinants for the human serum metabolome. Nat 2020 5887836 588:135–140. doi: 10.1038/s41586-020-2896-2.

178. Beger RD, Dunn W, Schmidt MA, et al (2016) Metabolomics enables precision medicine: "A White Paper, Community Perspective." Metabolomics. doi: 10.1007/s11306-016-1094-6

179. Trifonova OP, Maslov DL, Balashova EE, Lokhov PG (2021) Mass spectrometrybased metabolomics diagnostics – myth or reality? Expert Rev Proteomics 18:7–12. doi: 10.1080/14789450.2021.1893695.

180. Zhou C, Zhang Q, Lu L, et al (2021) Metabolomic Profiling of Amino Acids in Human Plasma Distinguishes Diabetic Kidney Disease From Type 2 Diabetes Mellitus. Front Med 8:2342. doi: 10.3389/FMED.2021.765873/BIBTEX.

181. Di Minno A, Gelzo M, Caterino M, et al (2022a) Challenges in Metabolomics-Based Tests, Biomarkers Revealed by Metabolomic Analysis, and the Promise of the Application of Metabolomics in Precision Medicine. Int J Mol Sci 2022, Vol 23, Page 5213 23:5213. doi: 10.3390/IJMS23095213.

182. Wishart DS, Guo AC, Oler E, et al (2022) HMDB 5.0: the Human Metabolome Database for 2022. Nucleic Acids Res 50:D622. doi: 10.1093/NAR/GKAB1062.

183. Lokhov PG, Trifonova OP, Maslov DL, et al (2021) Personal Metabolomics: AGlobal Challenge. Metab 2021, Vol 11, Page 715 11:715. doi: 10.3390/METABO11110715.

184. Trivedi DK, Hollywood KA, Goodacre R (2017) Metabolomics for the masses: The future of metabolomics in a personalized world. New Horizons Transl Med 3:294. doi: 10.1016/J.NHTM.2017.06.001.

185. Kennedy AD, Wittmann BM, Evans AM, et al (2018) Metabolomics in the clinic: A review of the shared and unique features of untargeted metabolomics for clinical research and clinical testing. J Mass Spectrom. doi: 10.1002/jms.4292.

186. López-López Á, López-Gonzálvez Á, Barker-Tejeda TC, Barbas C (2018) A review of validated biomarkers obtained through metabolomics. Expert Rev. Mol. Diagn.

187. Pinu FR, Goldansaz SA, Jaine J (2019b) Translational metabolomics: Current challenges and future opportunities. Metabolites. doi: 10.3390/metabo9060108.

188. Zhang XW, Li QH, Xu Z Di, Dou JJ (2020) Mass spectrometry-based metabolomics in health and medical science: a systematic review. RSC Adv 10:3092–3104. doi: 10.1039/C9RA08985C.

189. Castelli FA, Rosati G, Moguet C, et al (2021) Metabolomics for personalized medicine: the input of analytical chemistry from biomarker discovery to point-of-care tests. Anal Bioanal Chem 2021 4142 414:759–789. doi: 10.1007/S00216-021-03586-Z.

190. Di Minno A, Gelzo M, Caterino M, et al (2022b) Challenges in Metabolomics-Based Tests, Biomarkers Revealed by Metabolomic Analysis, and the Promise of the Application of Metabolomics in Precision Medicine. Int J Mol Sci 2022, Vol 23, Page 5213 23:5213. doi: 10.3390/IJMS23095213.

191. Zhou J, Zhong L (2022) Applications of liquid chromatography-mass spectrometry based metabolomics in predictive and personalized medicine. Front Mol Biosci 0:1221. doi: 10.3389/FMOLB.2022.1049016.

192. Sansone SA, Fan T, Goodacre R, et al (2007) The metabolomics standards initiative. Nat Biotechnol 25:846–848. doi: 10.1038/NBT0807-846B.

193. Sumner LW, Alexander AE, Ae A, et al (2007) Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. Metabolomics 2007 33 3:211–221. doi: 10.1007/S11306-007-0082-2.

194. Bernini P, Bertini I, Luchinat C, et al (2011) Standard operating procedures for preanalytical handling of blood and urine for metabolomic studies and biobanks. J Biomol NMR 49:231–243. doi: 10.1007/S10858-011-9489-1/SCHEMES/3

195. Kirwan JA, Brennan L, Broadhurst D, et al (2018) Preanalytical processing and biobanking procedures of biological samples for metabolomics research: A white paper, community perspective (for "Precision medicine and pharmacometabolomics task group"—The metabolomics society initiative). Clin. Chem.

196. M Brown WDDERGJHJK (2005) A metabolome pipeline: From concept to data to knowledge. Metabolomics 1:39–51.

197. Dunn WB, Wilson ID, Nicholls AW, Broadhurst D (2012) The importance of experimental design and QC samples in large-scale and MS-driven untargeted metabolomic studies of humans. Bioanalysis 4:2249–2264. doi: 10.4155/BIO.12.204.

198. D Broadhurst RGSRJKIWML (2018) Guidelines and considerations for the use of system suitability and quality control samples in mass spectrometry assays applied in untargeted clinical metabolomic studies. Metabolomics 14:72.

199. Beger RD, Dunn WB, Bandukwala A, et al (2019) Towards quality assurance and quality control in untargeted metabolomics studies. Metabolomics. doi: 10.1007/S11306-018-1460-7.

200. Lippi G, Betsou F, Cadamuro J, et al (2019) Preanalytical challenges-time for solutions. Clin Chem Lab Med 57:974–981. doi: 10.1515/CCLM-2018-1334.

201. Long NP, Nghi TD, Kang YP, et al (2020) Toward a Standardized Strategy of Clinical Metabolomics for the Advancement of Precision Medicine. Metabolites. doi: 10.3390/METABO10020051.

202. Pinu FR, Beale DJ, Paten AM, et al (2019a) Systems biology and multi-omics integration: Viewpoints from the metabolomics research community. Metabolites. doi: 10.3390/metabo9040076.

203. Desaire H (2022) How (Not) to Generate a Highly Predictive Biomarker Panel Using Machine Learning. J Proteome Res 21:2071–2074. doi: 10.1021/ACS.JPROTEOME.2C00117/SUPPL_FILE/PR2C00117_SI_001.PDF

204. Kim YM, Heyman HM (2018) Mass spectrometry-based metabolomics. In: Methods in Molecular Biology.

205. Bruno C, Patin F, Bocca C, et al (2018) The combination of four analytical methods to explore skeletal muscle metabolomics: Better coverage of metabolic pathways or a marketing argument? J Pharm Biomed Anal 148:273–279. doi: 10.1016/J.JPBA.2017.10.013.

206. González-Riano C, Dudzik D, Garcia A, et al (2020) Recent developments along the analytical process for metabolomics workflows. Anal Chem 92:203–226. doi: 10.1021/ACS.ANALCHEM.9B04553/ASSET/IMAGES/ACS.ANALCHEM.9B04553.S OCIAL.JPEG_V03

207. Gika HG, Wilson ID, Theodoridis GA (2019) Omics | Metabolomics: An analytical perspective. Encycl Anal Sci 82–89. doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.14003-X.

208. Beale DJ, Pinu FR, Kouremenos KA, et al (2018) Review of recent developments in GC–MS approaches to metabolomics-based research. Metabolomics 14:1–31. doi: 10.1007/S11306-018-1449-2/FIGURES/4.

209. Khodadadi M, Pourfarzam M (2020) A review of strategies for untargeted urinary metabolomic analysis using gas chromatography-mass spectrometry. Metabolomics. doi: 10.1007/S11306-020-01687-X.

210. Bhatia A, Sarma SJ, Lei Z, Sumner LW (2019) UHPLC-QTOF-MS/MS-SPE-NMR: A Solution to the Metabolomics Grand Challenge of Higher-Throughput, Confident Metabolite Identifications. Methods Mol Biol 2037:113–133. doi: 10.1007/978-1-4939-9690-2_7.

211. Wang S, Blair IA, Mesaros C (2019) Analytical Methods for Mass Spectrometry-Based Metabolomics Studies. Adv Exp Med Biol 1140:635–647. doi: 10.1007/978-3-030-15950-4_38.

212. Perez de Souza L, Alseekh S, Scossa F, Fernie AR (2021) Ultra-high-performance liquid chromatography high-resolution mass spectrometry variants for metabolomics research. Nat Methods 18:733–746. doi: 10.1038/S41592-021-01116-4.

213. Lokhov PG, Balashova EE, Trifonova OP, et al (2020) Mass spectrometry-based metabolomics analysis of obese patients' blood plasma. Int J Mol Sci. doi: 10.3390/ijms21020568.

214. Sarvin B, Lagziel S, Sarvin N, et al (2020) Fast and sensitive flow-injection mass spectrometry metabolomics by analyzing sample-specific ion distributions. Nat Commun 2020 111 11:1–11. doi: 10.1038/s41467-020-17026-6

215. Lokhov PG, Trifonova OP, Maslov DL, et al (2014) Diagnosing impaired glucose tolerance using direct infusion mass spectrometry of blood plasma. PLoS One. doi: 10.1371/journal.pone.0105343

216. Balashova EE, Lokhov PG, Maslov DL, et al (2017) Plasma Metabolome Signature in Patients with Early-stage Parkinson Disease. Curr. Metabolomics 5:1–8.

217. Lokhov PG, Kharybin ON, Archakov AI (2012) Diagnosis of lung cancer based on direct-infusion electrospray mass spectrometry of blood plasma metabolites. Int J Mass Spectrom 309:200–205. doi: 10.1016/j.ijms.2011.10.002

218. Dagenais GR, Leong DP, Rangarajan S, et al (2020) Variations in common diseases, hospital admissions, and deaths in middle-aged adults in 21 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. Lancet 395:785–794. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32007-0.

219. B.; L, K. B, S. C, et al (2015) EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update. Eur Urol 67:913–924.

220. Wei EY, Hsieh JJ (2015) A river model to map convergent cancer evolution and guide therapy in RCC. Nat Rev Urol 12:706–712. doi: 10.1038/nrurol.2015.260.

221. Apanovich N V., Peters M V., Korotaeva AA, et al (2016) Molecular genetic diagnostics of clear cell renal cell carcinoma. Onkourologiya 12:16–20. doi: 10.17650/1726-9776-2016-12-4-16-20

222. Zisman A, Pantuck AJ, Wieder J, et al (2002) Risk group assessment and clinical outcome algorithm to predict the natural history of patients with surgically resected renal cell carcinoma. J Clin Oncol 20:4559–4566. doi: 10.1200/JCO.2002.05.111.

223. Mustafa A, Gupta S, Hudes GR, et al (2011) Serum amino acid levels as a biomarker for renal cell carcinoma. J Urol 186:1206–1212. doi: 10.1016/j.juro.2011.05.085.

224. Cochetti G, Cari L, Maulà V, et al (2022) Validation in an Independent Cohort of MiR-122, MiR-1271, and MiR-15b as Urinary Biomarkers for the Potential Early Diagnosis of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. Cancers (Basel) 14:1112. doi: 10.3390/cancers14051112.

225. Kiseleva, O.; Kurbatov, I.; Ilgisonis, E.; Poverennaya, E. (2021) Defining Blood Plasma and Serum Metabolome by GC-MS. Metabolites. doi:10.3390/metabo12010015.

226. Fiehn, O. (2016) Metabolomics by Gas Chromatography–Mass Spectrometry: Combined Targeted and Untargeted Profiling. Curr. Protoc. Mol. Biol. doi:10.1002/0471142727.mb3004s114.

227. Kind, T.; Wohlgemuth, G.; Lee, D.Y.; Lu, Y.; Palazoglu, M.; Shahbaz, S.; Fiehn, O. (2009) FiehnLib: Mass Spectral and Retention Index Libraries for Metabolomics Based on Quadrupole and Time-of-Flight Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Anal. Chem. doi:10.1021/ac9019522.

228. Placzek M., Kosela M. Microscopic methods in analysis of submicron phospholipid dispersions //Acta pharmaceutica. $-2016. - T. 66. - N_{\odot}. 1. - C. 1-22.$

229. Smith J. R., Olusanya T. O. B., Lamprou D. A. Characterization of drug delivery vehicles using atomic force microscopy: current status //Expert opinion on drug delivery.
2018. – T. 15. – №. 12. – C. 1211-1221

230. Dagata J. A. et al. Method for measuring the diameter of polystyrene latex reference spheres by atomic force microscopy //NIST Special publication. – 2016. – T. 260. – C. 185.

231. Ehmann F. et al. Next-generation nanomedicines and nanosimilars: EU regulators' initiatives relating to the development and evaluation of nanomedicines //Nanomedicine. – 2013. – T. 8. – No. 5. – C. 849-856.

232. Hoo C. M. et al. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions //Journal of Nanoparticle Research. $-2008. - T. 10. - N_{\odot}. 1. - C. 89-96$

233. Sitterberg J. et al. Utilising atomic force microscopy for the characterisation of nanoscale drug delivery systems //European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. $-2010. - T. 74. - N_{\odot}. 1. - C. 2-13.$

234. Ping Y. et al. Supramolecular β -sheets stabilized protein nanocarriers for drug delivery and gene transfection //ACS nano. – 2017. – T. 11. – No. 5. – C. 4528-4541.

235. Masarudin M. J. et al. Factors determining the stability, size distribution, and cellular accumulation of small, monodisperse chitosan nanoparticles as candidate vectors for anticancer drug delivery: application to the passive encapsulation of [14C]-doxorubicin //Nanotechnology, science and applications. -2015. - T. 8. - C. 67.

236. Gardiner C. et al. Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. J Extracell Vesicles 5: 32945. – 2016. 237. Parisse P. et al. Atomic force microscopy analysis of extracellular vesicles //European biophysics journal. – 2017. – T. 46. – No. 8. – C. 813-820.

238. Baalousha M., Lead J. R. Rationalizing nanomaterial sizes measured by atomic force microscopy, flow field-flow fractionation, and dynamic light scattering: sample preparation, polydispersity, and particle structure //Environmental science & technology. $-2012. - T. 46. - N_{\odot}. 11. - C. 6134-6142.$

239. Al-Kinani A. A. et al. Analysis of 2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid by hydrophilic interaction liquid chromatography: application for ocular delivery using chitosan nanoparticles //Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2015. – T. 407. – \mathbb{N}_{2} . 9. – C. 2645-2650.

240. Smith J. R., Breakspear S., Campbell S. A. AFM in surface finishing: Part II. Surface roughness //Transactions of the IMF. $-2003. - T. 81. - N_{\odot}. 3. - C. B55-B58.$

241. Shimpi N. G., Jha M. Green synthesis of silver nanoparticles using Tabernaemontana divaricata and in-vitro cytotoxicity investigation against human lung adenocarcinoma //INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES AND RESEARCH. $-2017. - T. 8. - N_{\odot}. 12. - C. 5100-5110.$

242. Bootz A. et al. Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles //European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics. $-2004. - T. 57. - N_{\odot}. 2. - C. 369-375.$

243. Gebril A. M. et al. Assessment of the antigen-specific antibody response induced by mucosal administration of a GnRH conjugate entrapped in lipid nanoparticles //Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine. $-2014. - T. 10. - N_{\odot}. 5. - C.$ e971-e979.

244. Akanda M. H. et al. Delivery of retinoic acid to LNCap human prostate cancer cells using solid lipid nanoparticles //International journal of pharmaceutics. $-2015. - T. 493. - N_{\odot}. 1-2. - C. 161-171.$

245. www.imagej.nih.gov/ij

246. Particle size analysis – Image analysis methods Part 1: Static image analysis methods, ISO 13322-1:2004(E).

247. http://www.nanoscopy.net/

248. Лесная О.А. Нестероидные противовоспалительные препараты: более 30 лет на пике актуальности // Трудный пациент №11, Т О М 16 — 2018 — С. 45-49. DOI: 10.24411/2074-1995-2018-10030.

249. Neborak, E.V.; Kaldybayeva, A.B.; Bey, L.; Malmakova, A.Y.; Tveritinova, A.S.; Hilal, A.; Yu, V.K.; Ploskonos, M.V.; Komarova, M.V.; Agostinelli, E.; Zhdanov, D.D. Anticancer Cytotoxic Activity of Bispidine Derivatives Associated with the Increasing Catabolism of Polyamines. Molecules 2022, 27, 3872. https://doi.org/10.3390/molecules27123872

250. Sánchez-Jiménez, F.; Medina, M.Á.; Villalobos-Rueda, L.; Urdiales, J.L. Polyamines in mammalian pathophysiology. Cell. Mol. Life Sci. 2019, 76, 3987–4008. https://doi.org/10.1007/s00018-019-03196-0.

251. Igarashi, K.; Kashiwagi, K. The functional role of polyamines in eukaryotic cells. Int.J. Biochem. Cell Biol. 2019, 107, 104–115. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.12.012.

252. Bekebrede, A.F.; Keijer, J.; Gerrits, W.J.J.; Boer, V.C.J. de The Molecular and Physiological Effects of Protein-Derived Polyamines in the Intestine. Nutrients 2020, 12, 197. https://doi.org/10.3390/nu12010197.

253. Acosta-Andrade, C.; Artetxe, I.; Lete, M.G.; Monasterio, B.G.; Ruiz-Mirazo, K.; Goñi, F.M.; Sánchez-Jiménez, F. Polyamine-RNA-membrane interactions: From the past to the future in biology. Colloids Surf. B. Biointerfaces 2017, 155, 173–181. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.04.005.

254. Zarza, X.; Van Wijk, R.; Shabala, L.; Hunkeler, A.; Lefebvre, M.; Rodriguez-Villalón, A.; Shabala, S.; Tiburcio, A.F.; Heilmann, I.; Munnik, T. Lipid kinases PIP5K7 and PIP5K9 are required for polyamine-triggered K(+) efflux in Arabidopsis roots. Plant J. 2020, 104, 416–432. https://doi.org/10.1111/tpj.14932.

255. Dhara, M.; Matta, J.A.; Lei, M.; Knowland, D.; Yu, H.; Gu, S.; Bredt, D.S. Polyamine regulation of ion channel assembly and implications for nicotinic acetylcholine receptor pharmacology. Nat. Commun. 2020, 11, 2799. https://doi.org/10.1038/s41467-020-16629-3.

256. Prusov, A.N.; Smirnova, T.A.; Kolomijtseva, G.Y. Thermodynamic Study of Interactions of Distamycin A with Chromatin in Rat Liver Nuclei in the Presence of Polyamines. Biochemistry 2018, 83, 1231–1244. https://doi.org/10.1134/S0006297918100085.

257. Sakamoto, A.; Terui, Y.; Uemura, T.; Igarashi, K.; Kashiwagi, K. Polyamines regulate gene expression by stimulating translation of histone acetyltransferase mRNAs. J. Biol. Chem. 2020, 295, 8736–8745. https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013833.

258. Zhang, H.; Alsaleh, G.; Feltham, J.; Sun, Y.; Napolitano, G.; Riffelmacher, T.; Charles, P.; Frau, L.; Hublitz, P.; Yu, Z.; et al. Polyamines Control eIF5A Hypusination, TFEB Translation, and Autophagy to Reverse B Cell Senescence. Mol. Cell 2019, 76, 110–125.e9. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.08.005.

259. Dever, T.E.; Ivanov, I.P. Roles of polyamines in translation. J. Biol. Chem. 2018, 293, 18719–18729. https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.003338.

260. Yoshida, T.; Sakamoto, A.; Terui, Y.; Takao, K.; Sugita, Y.; Yamamoto, K.; Ishihama, A.; Igarashi, K.; Kashiwagi, K. Effect of Spermidine Analogues on Cell Growth of Escherichia coli Polyamine Requiring Mutant MA261. PLoS ONE 2016, 11, e0159494. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159494. 261. Xu, L.; You, X.; Cao, Q.; Huang, M.; Hong, L.-L.; Chen, X.-L.; Lei, L.; Ling, Z.-Q.; Chen, Y. Polyamine synthesis enzyme AMD1 is closely associated with tumorigenesis and prognosis of human gastric cancers. Carcinogenesis 2020, 41, 214–222. https://doi.org/10.1093/carcin/bgz098.

262. Capellen, C.C.; Ortega-Rodas, J.; Morwitzer, M.J.; Tofilau, H.M.N.; Dunworth, M.; Casero, R.A.J.; Chandra, S. Hyperglycemic conditions proliferate triple negative breast cancer cells: Role of ornithine decarboxylase. Breast Cancer Res. Treat. 2021, 190, 255–264. https://doi.org/10.1007/s10549-021-06388-0.

263. Bachmann, A.S.; Geerts, D. Polyamine synthesis as a target of MYC oncogenes. J. Biol. Chem. 2018, 293, 18757–18769. https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.003336.

264. Guo, T.; Li, B.; Gu, C.; Chen, X.; Han, M.; Liu, X.; Xu, C. PGC-1α inhibits polyamine metabolism in Cyclin E1-driven ovarian cancer. Cancer Med. 2019, 8, 7754–7761. https://doi.org/10.1002/cam4.2637.

265. Novita Sari, I.; Setiawan, T.; Seock Kim, K.; Toni Wijaya, Y.; Won Cho, K.; Young Kwon, H. Metabolism and function of polyamines in cancer progression. Cancer Lett. 2021, 519, 91–104. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.06.020.

266. Geck, R.C.; Foley, J.R.; Murray Stewart, T.; Asara, J.M.; Casero, R.A.J.; Toker, A. Inhibition of the polyamine synthesis enzyme ornithine decarboxylase sensitizes triple-negative breast cancer cells to cytotoxic chemotherapy. J. Biol. Chem. 2020, 295, 6263–6277. https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.012376.

267. Sweeney, C. Targeting the polyamine pathway-"a means" to overcome chemoresistance in triple-negative breast cancer. J. Biol. Chem. 2020, 295, 6278–6279. https://doi.org/10.1074/jbc.H120.013736.

268. Kaminski, L.; Torrino, S.; Dufies, M.; Djabari, Z.; Haider, R.; Roustan, F.-R.; Jaune, E.; Laurent, K.; Nottet, N.; Michiels, J.-F.; et al. PGC1α Inhibits Polyamine Synthesis to Suppress Prostate Cancer Aggressiveness. Cancer Res. 2019, 79, 3268–3280. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2043.

269. Wallace, H.M.; Duthie, J.; Evans, D.M.; Lamond, S.; Nicoll, K.M.; Heys, S.D. Alterations in polyamine catabolic enzymes in human breast cancer tissue. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. 2000, 6, 3657–3661.

270. Thomas, T.J.; Thomas, T. Cellular and Animal Model Studies on the Growth Inhibitory Effects of Polyamine Analogues on Breast Cancer. Med. Sci. 2018, 6, 24. https://doi.org/10.3390/medsci6010024.

271. Agostinelli, E.; Belli, F.; Molinari, A.; Condello, M.; Palmigiani, P.; Vedova, L.D.; Marra, M.; Seiler, N.; Arancia, G. Toxicity of enzymatic oxidation products of spermine to human melanoma cells (M14): Sensitization by heat and MDL 72527. Biochim. Biophys. Acta 2006, 1763, 1040–1050. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.07.014.

272. Murray Stewart, T.; Dunston, T.T.; Woster, P.M.; Casero, R.A.J. Polyamine catabolism and oxidative damage. J. Biol. Chem. 2018, 293, 18736–18745. https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.003337.

273. Wang, L.; Liu, Y.; Qi, C.; Shen, L.; Wang, J.; Liu, X.; Zhang, N.; Bing, T.; Shangguan, D. Oxidative degradation of polyamines by serum supplement causes cytotoxicity on cultured cells. Sci. Rep. 2018, 8, 10384. https://doi.org/10.1038/s41598-018-28648-8.

274. PLoSkonos, M.V.; Syatkin, S.P.; Neborak, E.V.; Hilal, A.; Sungrapova, K.Y.; Sokuyev, R.I.; Blagonravov, M.L.; Korshunova, A.Y.; Terentyev, A.A. Polyamine Analogues of Propanediamine Series Inhibit Prostate Tumor Cell Growth and Activate the Polyamine Catabolic Pathway. Anticancer Res. 2020, 40, 1437–1441. https://doi.org/10.21873/anticanres.14085.

275. Affronti, H.C.; Rowsam, A.M.; Pellerite, A.J.; Rosario, S.R.; Long, M.D.; Jacobi, J.J.; Bianchi-Smiraglia, A.; Boerlin, C.S.; Gillard, B.M.; Karasik, E.; et al. Pharmacological polyamine catabolism upregulation with methionine salvage pathway inhibition as an effective prostate cancer therapy. Nat. Commun. 2020, 11, 52. https://doi.org/10.1038/s41467-019-13950-4.

276. Ohkubo, S.; Mancinelli, R.; Miglietta, S.; Cona, A.; Angelini, R.; Canettieri, G.; Spandidos, D.A.; Gaudio, E.; Agostinelli, E. Maize polyamine oxidase in the presence of spermine/spermidine induces the apoptosis of LoVo human colon adenocarcinoma cells. Int. J. Oncol. 2019, 54, 2080–2094. https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4780.

277. Obakan, P.; Arisan, E.D.; Coker-Gurkan, A.; Palavan-Unsal, N. Epibrassinolideinduced apoptosis regardless of p53 expression via activating polyamine catabolic machinery, a common target for androgen sensitive and insensitive prostate cancer cells. Prostate 2014, 74, 1622–1633. https://doi.org/10.1002/pros.22879. 278. Cui, H.; Goddard, R.; Pörschke, K.-R.; Hamacher, A.; Kassack, M.U. Bispidine analogues of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. synthesis, structures, and cytotoxicity. Inorg. Chem. 2014, 53, 3371–3384. https://doi.org/10.1021/ic402737f.

279. Shcherbakov, D.; Baev, D.; Kalinin, M.; Dalinger, A.; Chirkova, V.; Belenkaya, S.; Khvostov, A.; Krut'ko, D.; Medved'ko, A.; Volosnikova, E.; et al. Design and Evaluation of Bispidine-Based SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors. ACS Med. Chem. Lett. 2022, 13, 140–147. https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.1c00299.

280. Comba, P.; Kerscher, M.; Rück, K.; Starke, M. Bispidines for radiopharmaceuticals. Dalton Trans. 2018, 47, 9202–9220. https://doi.org/10.1039/c8dt01108g.

281. Nonat, A.M.; Roux, A.; Sy, M.; Charbonnière, L.J. 2,4-Substituted bispidines as rigid hosts for versatile applications: From κ -opioid receptor to metal coordination. Dalton Trans. 2019, 48, 16476–16492. https://doi.org/10.1039/c9dt03480c.

282. Syatkin, S.P.; Neborak, E.V.; Khlebnikov, A.I.; Komarova, M.V.; Shevkun, N.A.; Kravtsov, E.G.; Blagonravov, M.L.; Agostinelli, E. The investigation of structure-activity relationship of polyamine-targeted synthetic compounds from different chemical groups. Amino Acids 2020, 52, 199–211. https://doi.org/10.1007/s00726-019-02778-3.

283. Malmakova, A.Y.; Yu, V.K.; Kan, V.M.; Dauletbai, P.; Li, T.E.; Dulatbaev, A.; Kaldybaeva, A.B.; Praliyev, K.D. 1-(3-Aminopropyl)imidazol as a precursor of plant growth stimulators. Chem. J. Kaz. 2018, 4, 42–51.

284. Pascale, F.; Bedouet, L.; Baylatry, M.; Namur, J.; Laurent, A. Comparative Chemosensitivity of VX2 and HCC Cell Lines to Drugs Used in TACE. Anticancer Res. 2015, 35, 6497–6503.

285. Lamie, P.F.; Philoppes, J.N. 2-Thiopyrimidine/chalcone hybrids: Design, synthesis, ADMET prediction, and anticancer evaluation as STAT3/STAT5a inhibitors. J. Enzym. Inhib. Med. Chem. 2020, 35, 864–879. https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1740922.

286. Gladilina, Y.A.; Bey, L.; Hilal, A.; Neborak, E.V.; Blinova, V.G.; Zhdanov, D.D. Cytoprotective Activity of Polyamines Is Associated with the Alternative Splicing of RAD51A Pre-mRNA in Normal Human CD4+ T Lymphocytes. Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 1863. https://doi.org/10.3390/ijms23031863

287. Huang, Y.; Marton, L.J.; Woster, P.M.; Casero, R.A. Polyamine analogues targeting epigenetic gene regulation. Essays Biochem. 2009, 46, 95–110, doi:10.1042/bse0460007.

288. Liu, L.F.; Rowe, T.C.; Yang, L.; Tewey, K.M.; Chen, G.L. Cleavage of DNA by mammalian DNA topoisomerase II. J. Biol. Chem. 1983, 258, 15365–15370.

289. Tewey, K.M.; Rowe, T.C.; Yang, L.; Halligan, B.D.; Liu, L.F. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. Science 1984, 226, 466–468, doi:10.1126/science.6093249.

290. Sedletska, Y.; Giraud-Panis, M.-J.; Malinge, J.-M. Cisplatin is a DNA-damaging antitumour compound triggering multifactorial biochemical responses in cancer cells: importance of apoptotic pathways. Curr. Med. Chem. Anticancer. Agents 2005, 5, 251–265, doi:10.2174/1568011053765967.

291. Zhdanov, D.D.; Vasina, D.A.; Orlova, V.S.; Orlova, E.V.; Grishin, D.V.; Gladilina, Y.A.; Pokrovskaya, M.V.; Aleksandrova, S.S.; Sokolov, N.N. Induction of Apoptotic Endonuclease EndoG with DNA-Damaging Agents Initiates Alternative Splicing of Telomerase Catalytic Subunit hTERT and Inhibition of Telomerase Activity hTERT in Human CD4+and CD8+T Lymphocytes. Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem. 2018, 12, doi:10.1134/S1990750818020154.

292. Xu, Y.; Villalona-Calero, M.A. Irinotecan: mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity. Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. 2002, 13, 1841–1851, doi:10.1093/annonc/mdf337.

293. Wood, J.P.; Smith, A.J.O.; Bowman, K.J.; Thomas, A.L.; Jones, G.D.D. Comet assay measures of DNA damage as biomarkers of irinotecan response in colorectal cancer in vitro and *in vivo*. Cancer Med. 2015, 4, 1309–1321, doi:10.1002/cam4.477.

294. Pokrovskaya, M.V.; Pokrovsky, V.S.; Aleksandrova, S.S.; Sokolov, N.N.; Zhdanov, D.D. Molecular Analysis of L-Asparaginases for Clarification of the Mechanism of Action and Optimization of Pharmacological Functions. Pharmaceutics 2022, 14, 599. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030599

295. Pokrovsky, V.S.; Chepikova, O.E.; Davydov, D.Z.; Zamyatnin Jr, A.A.; Lukashev, A.N.; Lukasheva, E. V. Amino Acid Degrading Enzymes and their Application in Cancer Therapy. Curr. Med. Chem. 2019, 26, 446–464, doi:10.2174/0929867324666171006132729.

296. Beckett, A.; Gervais, D. What makes a good new therapeutic L-asparaginase? World J. Microbiol. Biotechnol. 2019, 35, 152, doi:10.1007/s11274-019-2731-9.

297. Dinndorf, P.A.; Gootenberg, J.; Cohen, M.H.; Keegan, P.; Pazdur, R. FDA drug approval summary: pegaspargase (oncaspar) for the first-line treatment of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). Oncologist 2007, 12, 991–998, doi:10.1634/theoncologist.12-8-991.

298. Jaccard, A.; Petit, B.; Girault, S.; Suarez, F.; Gressin, R.; Zini, J.-M.; Coiteux, V.; Larroche, C.; Devidas, A.; Thiéblemont, C.; et al. L-asparaginase-based treatment of 15 western patients with extranodal NK/T-cell lymphoma and leukemia and a review of the literature. Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. 2009, 20, 110–116, doi:10.1093/annonc/mdn542.

299. Völler, S.; Pichlmeier, U.; Zens, A.; Hempel, G. Pharmacokinetics of recombinant asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia. Cancer Chemother. Pharmacol. 2018, 81, 305–314, doi:10.1007/s00280-017-3492-5.

300. Chien, W.-W.; Allas, S.; Rachinel, N.; Sahakian, P.; Julien, M.; Le Beux, C.; Lacroix, C.-E.; Abribat, T.; Salles, G. Pharmacology, immunogenicity, and efficacy of a novel pegylated recombinant Erwinia chrysanthemi-derived L-asparaginase. Invest. New Drugs 2014, 32, 795–805, doi:10.1007/s10637-014-0102-9.

301. Sharma, D.; Singh, K.; Singh, K.; Mishra, A. Insights into the Microbial L-Asparaginases: from Production to Practical Applications. Curr. Protein Pept. Sci. 2018, 20, 452–464, doi:10.2174/1389203720666181114111035.

302. Lubkowski, J.; Vanegas, J.; Chan, W.-K.; Lorenzi, P.L.; Weinstein, J.N.; Sukharev, S.; Fushman, D.; Rempe, S.; Anishkin, A.; Wlodawer, A. Mechanism of Catalysis by 1 -

Asparaginase . Biochemistry 2020, 59, 1927-1945, doi:10.1021/acs.biochem.0c00116.

303. Ghasemian, A.; Al-marzoqi, A.H.; Al-abodi, H.R.; Alghanimi, Y.K.; Kadhum, S.A.; Shokouhi Mostafavi, S.K.; Fattahi, A. Bacterial l-asparaginases for cancer therapy: Current knowledge and future perspectives. J. Cell. Physiol. 2019, 234, 19271–19279.

304. Batool, T.; Makky, E.A.; Jalal, M.; Yusoff, M.M. A Comprehensive Review on l-Asparaginase and Its Applications. Appl. Biochem. Biotechnol. 2016, 178, 900–923.

305. Michalska, K.; Jaskolski, M. Structural aspects of L-asparaginases, their friends and relations. Acta Biochim. Pol. 2006, 53, 627–640.

306. Niu, J.; Meng, F.; Zhou, Y.; Zhang, C.; Lu, Z.; Lu, F.; Chen, M. Non-classical secretion of a type I L-asparaginase in Bacillus subtilis. Int. J. Biol. Macromol. 2021, 180, 677–683, doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.03.104.

307. Yao, M.; Yasutake, Y.; Morita, H.; Tanaka, I. Structure of the type I L-asparaginase from the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus horikoshii at 2.16 angstroms resolution.

Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 2005, 61, 294–301, doi:10.1107/S0907444904032950.

308. Jiao, L.; Chi, H.; Lu, Z.; Zhang, C.; Chia, S.R.; Show, P.L.; Tao, Y.; Lu, F. Characterization of a novel type I l-asparaginase from Acinetobacter soli and its ability to inhibit acrylamide formation in potato chips. J. Biosci. Bioeng. 2020, 129, 672–678, doi:10.1016/j.jbiosc.2020.01.007.

309. Sharafi, Z.; Barati, M.; Khoshayand, M.R.; Adrangi, S. Screening for Type II L-Asparaginases: Lessons from the Genus Halomonas. Iran. J. Pharm. Res. IJPR 2017, 16, 1565–1573.

310. Nowak-Göttl, U.; Wolff, J.E.A.; Kuhn, N.; Boos, J.; Kehrel, B.; Lilienweiss, V.; Schwabe, D.; Jürgens, H. Enhanced thrombin generation, P-von willebrand factor, P-fibrin D-dimer and P-plasminogen activator inhibitor 1: Predictive for venous thrombosis in asparaginase-treated children. Fibrinolysis 1994, 8, 63–65, doi:https://doi.org/10.1016/0268-9499(94)90248-8.

311. Leibundgut, K.; Hirt, A.; Zwicky, C.; Wuillemin, W.A. Cerebral sinovenous thrombosis during asparaginase treatment. Case 3. Hamostaseologie 2003, 23, 109–112.

312. Fonseca, M.H.G.; Fiúza, T. da S.; Morais, S.B. de; Souza, T. de A.C.B. de; Trevizani,
R. Circumventing the side effects of L-asparaginase. Biomed. Pharmacother. 2021, 139, 111616, doi:10.1016/j.biopha.2021.111616.

313. da Silva Lacerda, G.R.; Cantalice, J.C.L.L.; de Souza Lima, G.M.; de Albuquerque, L.E.F.; da Silva, I.D.G.; de Melo, M.E.B.; Adam, M.L.; do Nascimento, S.C. Genotoxic activity of 1-asparaginase produced by Streptomyces ansochromogenes UFPEDA 3420. World J. Microbiol. Biotechnol. 2019, 35, 41, doi:10.1007/s11274-019-2612-2.

314. Aghaiypour, K.; Wlodawer, A.; Lubkowski, J. Structural basis for the activity and substrate specificity of Erwinia chrysanthemi L-asparaginase. Biochemistry 2001, 40, 5655–5664, doi:10.1021/bi0029595.

315. Kessel, D. Asparaginyl-transfer RNA. A substrate for l-asparaginase. BBA Sect. Nucleic Acids Protein Synth. 1971, 240, 554–557, doi:10.1016/0005-2787(71)90712-X.

316. Bosmann, H.B.; Kessel, D. Inhibition of glycoprotein synthesis in L5178Y mouse lukaemic cells by L-asparaginase in vitro. Nature 1970, 226, 850–851, doi:10.1038/226850a0.

317. Ankel, E.G.; Zirneski, J.; Ring, B.J.; Holcenberg, J.S. Effect of asparaginase on cell membranes of sensitive and resistants mouse lymphoma cells. In Vitro 1984, 20, 376–384, doi:10.1007/BF02619582.

318. Zhdanov, D.D.; Pokrovsky, V.S.; Pokrovskaya, M.V.; Alexandrova, S.S.; Eldarov, M.A.; Grishin, D.V.; Basharov, M.M.; Gladilina, Y.A.; Podobed, O.V.; Sokolov, N.N. Rhodospirillum rubrum L-asparaginase targets tumor growth by a dual mechanism involving telomerase inhibition. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2017, 492, 282-288, doi:10.1016/j.bbrc.2017.08.078.

319. Zhdanov, D.D.; Pokrovsky, V.S.; Pokrovskaya, M.V.; Alexandrova, S.S.; Eldarov, M.A.; Grishin, D.V.; Basharov, M.M.; Gladilina, Y.A.; Podobed, O.V.; Sokolov, N.N. Inhibition of telomerase activity and induction of apoptosis by Rhodospirillum rubrum L-asparaginase in cancer Jurkat cell line and normal human CD4+ T lymphocytes. Cancer Med. 2017, 6, 2697-2712, doi:10.1002/cam4.1218.

320. Tikhonova, E.G.; Tereshkina, Y.A.; Kostryukova, L.V.; Khudoklinova, Y.Y.; Sanzhakov, M.A.; Tamarovskaya, A.O.; Ivankov, O.I.; Kiselev, M.A. Study of Physico-Chemical Properties and Morphology of Phospholipid Composition of Indomethacin. Nanomaterials 2022, 12, 2553. https://doi.org/10.3390/nano12152553

321. Широнин А.В., Ипатова О.М., Медведева Н.В., Прозоровский В.Н., Тихонова Е.Г., Торховская Т.И. Инъекционная форма индометацина в фосфолипидных наночастицах: ассоциация с липопротеинами низкой плотности и противовоспалительное действие// Эфферентная и физико-химическая медицина — 2012. — №1.- С. 21-24.

322. Froder J.G., Dupeyrón D., Carvalho J.C., Maistro E.L. In vitro study of the cytotoxic and genotoxic effects of indomethacin-loaded Eudragit(®) L 100 nanocapsules. Genet Mol Res. 2016 Aug 12;15(3). doi: 10.4238/gmr.15038727.

323. Ficker M., Theeuwen M.J.M., Janaszewska A., Gorzkiewicz M., Svenningsen S.W., Klajnert-Maculewicz B., Christensen J.B. Complexes of Indomethacin with 4-Carbomethoxy-pyrrolidone PAMAM Dendrimers Show Improved Anti-inflammatory Properties and Temperature-Dependent Binding and Release Profile. Mol Pharm. 2018 Aug 6;15(8):3573-3582. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00567. Epub 2018 Jul 25.

324. Wersig T., Krombholz R., Janich C., Meister A., Kressler J., Mäder K. Indomethacin functionalised poly(glycerol adipate) nanospheres as promising candidates for modified drug release. Eur J Pharm Sci. 2018 Oct 15;123:350-361. doi: 10.1016/j.ejps.2018.07.053. Epub 2018 Jul 29.

325. Badri W., Miladi K., Robin S., Viennet C., Nazari Q.A., Agusti G., Fessi H., Elaissari A. Polycaprolactone Based Nanoparticles Loaded with Indomethacin for Anti-Inflammatory Therapy: From Preparation to Ex Vivo Study. Pharm Res. 2017 Sep;34(9):1773-1783. doi: 10.1007/s11095-017-2166-7. Epub 2017 May 19.

326. Lee J.Y., Termsarasab U., Lee M.Y., Kim D.H., Lee S.Y., Kim J.S., Cho H.J., Kim D.D. Chemosensitizing indomethacin-conjugated chitosan oligosaccharide nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. Acta Biomater. 2017 Jul 15;57:262-273. doi: 10.1016/j.actbio.2017.05.012. Epub 2017 May 5.

327. Ji W., Wang B., Fan Q., Xu C., He Y., Chen Y. Chemosensitizing indomethacinconjugated dextran-based micelles for effective delivery of paclitaxel in resistant breast cancer therapy. PLoS One. 2017 Jul 7;12(7):e0180037. doi: 10.1371/journal.pone.0180037. eCollection 2017.

328. Tres F., Treacher K., Booth J., Hughes L.P., Wren S.A., Aylott J.W., Burley J.C. Indomethacin-Kollidon VA64 Extrudates: A Mechanistic Study of pH-Dependent Controlled Release. Mol Pharm. 2016 Mar 7;13(3):1166-75. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00979. Epub 2016 Feb 18.

329. Lu C., Li X., Xia W., Lu S., Luo H., Ye D., Zhang Y., Liu D. Poly(εbenzyloxycarbonyl-L-lysine)-grafted branched polyethylenimine as efficient nanocarriers for indomethacin with enhanced oral bioavailability and anti-inflammatory efficacy. Acta Biomater. 2017 Feb;49:434-443. doi: 10.1016/j.actbio.2016.11.038. Epub 2016 Nov 17.

330. Разработка систем доставки лекарственных средств с применением микро- и наночастиц / А.В. Соснов [и др.] // Качественная клиническая практика. – 2004. – Т.
6, № 4. – С. 519-522.

331. Golan D.E., Tashjian A.H., Armstrong E.J. Principles of pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy // Lippincott Williams & Wilkins, 2007. – P.985.

332. Mukherjee B., Mondal L., Chakraborty S., Paul P., Choudhury A., Bhattacharya S., Hossain C.M. Size dependent variations of phospholipid based vesicular drug carriers in systemic drug activity //Current pharmaceutical biotechnology. $-2015. - V. 16. - N_{\odot}. 4. - P. 380-391.$

333. Zhang L. Gu F.X., Chan J.M., Wang A.Z., Langer R.S., Farokhzad O.C. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments //Clinical pharmacology & therapeutics. $-2008. - V. 83. - N_{\odot}. 5. - P. 761-769.$

334. Патент РФ № 2417079, МПК А61К31/405, А61К9/127, А61Р29/00. Фармацевтическая композиция для лечения ревматических и воспалительных заболеваний на основе индометацина, включенного в фосфолипидные наночастицы / Арчаков А.И., Ипатова О.М., Медведева Н.В., Прозоровский В.Н., Торховская Т.И., Тихонова Е.Г., Широнин А.В., Воскресенская А.А., Санжаков М.А.; заявитель и патентообладатель ИБМХ РАМН – № 2009139992/15; заявл. 30.10.2009; опубл. 27.04.2011, Бюл. №12.

335. Широнин А.В., Ипатова О.М., Медведева Н.В., Прозоровский В.Н., Тихонова Е.Г., Захарова Т.С., Санжаков М.А., Торховская Т.И. Повышение биодоступности и противовоспалительной эффективности индометацина при встраивании в фосфолипидные наночастицы // Биомедицинская химия. — 2011. — Т.57. — №6 — С. 671–676.

336. Киселев М. А., Земляная Е. В., Жабицкая Е. И., Аксенов В. Л. Исследование однослойных везикул димиристоилфосфатидилхолина в водных растворах сахарозы методами малоуглового рассеяния нейтронов и рентгеновских лучей // Кристаллография, 2015, том 60, № 1, С. 144-149.

337. WHO Influenza [Электронный ресурс]. https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal) (Дата обращения 21 декабря 2022)

338. Grippenet.fr. Results of previous seasons. [Электронный ресурс] https://www.grippenet.fr/fr/resultats/saisons-precedentes/. (дата обращения 21 декабря 2022)

339. Hayward, AC, Fragaszy, EB, Bermingham, A, et al. Comparative community burden and severity of seasonal and pandemic influenza: results of the Flu Watch cohort study // Lancet Respir Med. – 2014. – Vol. 2, No.6. P. 445- 454.

340. Leneva I.A., Russell R.J., Boriskin Y.S., Hay A.J. Characteristics of Arbidol-Resistant Mutants of Influenza Virus: Implications for the Mechanism of Anti-Influenza Action of Arbidol // Antiviral Res – 2009. – Vol.81, No.2 P.132–140.

341. Rameshwar U. Kadam and Ian A. Wilson. Structural basis of influenza virus fusion inhibition by the antiviral drug Arbidol // Proc Natl Acad Sci U S A – 2017. – Vol.114, No. 2 P.206-214.

342. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Коллектив авторов. — М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.

343. Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc Natl Acad Sci U S A. 1973 Aug;70(8):2281-5.

344. Trotter, M.; Borst, N.; Thewes, R.; von Stetten, F. Review: Electrochemical DNA sensing – Principles, commercial systems, and applications. Biosens bioelectron 2020, 154, 112069, DOI: 10.1016/j.bios.2020.112069.

345. Hasanzadeh, M.; Shadjou, N. Pharmacogenomic study using bio- and nanobioelectrochemistry: Drug-DNA interaction. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2016, 61, 1002–1017, DOI: 10.1016/j.msec.2015.12.020.

346. Archakov, A.I.; Guseva, M.K.; Uchaikin, V.F.; Tikhonova, E.G.; Ipatova, O.M. Medicinal Forms of Phospholipids Preparations and Methods for Their Preparations. United States patent 8,680,061 B2, 2014.

347. Muti, M.; Muti, M. Electrochemical monitoring of the interaction between anticancer drug and DNA in the presence of antioxidant. Talanta 2018, 178, 1033–1039, DOI: 10.1016/j.talanta.2017.08.089.

348. Findik, M.; Bingol, H.; Erdem, A. Hybrid nanoflowers modified pencil graphite electrodes developed for electrochemical monitoring of interaction between Mitomycin C and DNA. Talanta 2021, 222, 121647, DOI: 10.1016/j.talanta.2020.121647.

349. Bagni, G.; Osella, D.; Sturchio, E.; Mascini, M. Deoxyribonucleic acid (DNA) biosensors for environmental risk assessment and drug studies. Anal chim acta 2006, 573-574, 81–89, DOI: 10.1016/j.aca.2006.03.085.

350. Erdem, A.; Muti, M.; Papakonstantinou, P.; Canavar, E.; Karadeniz, H.; Congur, G.; Sharma, S. Graphene oxide integrated sensor for electrochemical monitoring of mitomycin C-DNA interaction. The Analyst 2012, 137, 2129–2135, DOI: 10.1039/c2an16011k.

351. Ferrari, A. G-M.; Rowley-Neale, S.J.; Banks, C.E. Screen-printed electrodes: Transitioning the laboratory in-to-the field. Talanta 2021, 3, 100032, DOI: 10.1016/j.talo.2021.100032.

352. Shumyantseva, V.V.; Agafonova, L.E.; Bulko, T.V.; Kuzikov, A.V.; Masamrekh, R.A.; Yuan, J., et al. Electroanalysis of Biomolecules: Rational Selection of Sensor Construction. Biochemistry (Mosc) 2021, 86, S140–S151, DOI: 10.1134/S0006297921140108.

353. Eksin, E.; Zor, E.; Erdem, A.; Bingol, H. Electrochemical monitoring of biointeraction by graphene-based material modified pencil graphite electrode. Biosen bioelectron 2017, 92, 207–214, DOI: 10.1016/j.bios.2017.02.016.

354. Carrara, S.; Baj-Rossi, C.; Boero, C.; Micheli, G.D. Do Carbon Nanotubes Contribute to Electrochemical Biosensing. Electrochim Acta 2014, 128, 102-112, DOI: 10.1016/j.electacta.2013.12.123.

355. Shumyantseva, V.V.; Bulko, T.V.; Tikhonova, E.G.; Sanzhakov, M.A.; Kuzikov, A.V.; Masamrekh, R.A.; et al. Electrochemical studies of the interaction of rifampicin and nanosome/rifampicin with dsDNA. Bioelectrochemistry 2021, 140, 107736, DOI: 10.1016/j.bioelechem.2020.107736.

356. Qian, L.; Durairaj, S.; Prins, S.; Chen, A. Nanomaterial-based electrochemical sensors and biosensors for the detection of pharmaceutical compounds. Biosen Bioelectron 2021, 175, 112836, DOI: 10.1016/j.bios.2020.112836.

357. Hua, Y.; Ma, J.; Li, D.; Wang, R. DNA-Based Biosensors for the Biochemical Analysis: A Review. Biosensors 2022, 12, 183, DOI: 10.3390/bios12030183.

358. Ferapontova, E.E. DNA Electrochemistry and Electrochemical Sensors for Nucleic Acids. Annu Rev Anal Chem 2018, 11, 197–218, DOI: 10.1146/annurev-anchem-061417-125811.

359. Bolat, G. Investigation of poly(CTAB-MWCNTs) composite based electrochemical DNA biosensor and interaction study with anticancer drug Irinotecan. Microchem J 2020, 159, 105426, DOI: 10.1016/j.microc.2020.105426.

360. Nimal, R.; Nur Unal, D.; Erkmen, C.; Bozal-Palabiyik, B.; Siddiq, M.; Eren, G.; et al. Development of the electrochemical, spectroscopic and molecular docking approaches toward the investigation of interaction between DNA and anti-leukemic drug azacytidine. Bioelectrochemistry 2022, 146, 108135, DOI: 10.1016/j.bioelechem.2022.108135.

361. Rupar, J.; Aleksić, M.M.; Dobričić, V.; Brborić, J.; Čudina, O. An electrochemical study of 9-chloroacridine redox behavior and its interaction with double-stranded DNA. Bioelectrochemistry 2020, 135, 107579, DOI: 10.1016/j.bioelechem.2020.107579.

362. Horáková, E.; Hájková, A.; Stávková, K.; Vyskočil, V.; Blašková, M.; Krejčová, Z.; et al. Electrochemical DNA biosensors – useful diagnostic tools for the detection of damage to DNA caused by organic xenobiotics (a review). Sens electroanal 2012, 7, 141–162.

363. Ramotowska, S.; Ciesielska, A.; Makowski, M. What Can Electrochemical Methods Offer in Determining DNA-Drug Interactions? Molecules 2021, 26, 3478, DOI: 10.3390/molecules26113478.

364. Shahabadi, N.; Hadidi, S. Spectroscopic studies on the interaction of calf thymus DNA with the drug levetiracetam. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 2012, 96, 278–283, DOI: 10.1016/j.saa.2012.05.045.

365. Singh R.S., Singh T., Singh A.K. Enzymes as Diagnostic Tools. In: Singh R.S., Singhania R.R., Pandey A., Larroche C. editors. Biomass, Biofuels, Biochemicals, Advances in Enzyme Technology. Amsredam: Elsevier; 2019, P. 225-271.

366. Bernhardt R., Urlacher V.B. Cytochromes P450 as promising catalysts for biotechnological application: chances and limitations // Appl Microbiol Biotechnol. 2014. Vol. 98, P. 6185–6203.

367. Guengerich F.P. Human cytochrome P450 enzymes. In: Ortiz de Montellano P.R. editor. Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry. 4th ed. New York: Springer; 2015, P. 523–785.

368. Schneider E., Clark D.S. Cytochrome P450 (CYP) enzymes and the development of CYP biosensors // Biosensors and Bioelectronics. 2013. Vol. 39, N1. P. 1-13.

369. Шумянцева В.В., Агафонова Л.Е., Булко Т.В., и др. Электроанализ биомолекул: обоснованный выбор сенсорных конструкций // Успехи биологической химии. 2021. Т. 61, С. 295-316.

370. Gray J.J. The interaction of proteins with solid surfaces // Curr. Opin. Structur. Biol. 2004. Vol. 14, N1. P. 110-115.

371. Kuzikov A.V., Bulko T.V., Koroleva P.I., et al. Electroanalytical and electrocatalytical characteristics of cytochrome P450 3A4 using electrodes modified with nanocomposite carbon nanomaterials // Biomedical Chemistry. Vol. 66, N1. 2020. P. 64-70

372. Tempel W., Grabovec I., MacKenzie F. et al. Structural characterization of human cholesterol 7α-hydroxylase // J Lipid Res. 2014. Vol. 55, N 9, P. 1925-1932.

373. Randles J.E.B. A cathode-ray polarograph. Part II – The current-voltage curves // Trans Faraday Soc. 1948. Vol. 44, P. 327.

374. Chen H.C., Chang C.C., Yang K.H. et al. Polypyrrole electrode with a greater electroactive surface electrochemically polymerized in plasmon-activated water // Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. 2018. Vol. 82, P. 252-260.

375. Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Archakov A.I. Electrochemical reduction of cytochrome P450 as an approach to the construction of biosensors and bioreactors // J. Inorg. Biochem. 2005. Vol. 99, N5. P. 1051–1063.

376. Johnson D.L., Lewis B.C., Elliot D.J., et al. Electrochemical characterization of the human cytochrome P450 CYP2C9 // Biochem. Pharmacol. 2005. Vol. 69, N10. P. 1533–1541.

377. Lu J., Cui D., Li H., et al. Cytochrome P450 bienzymes assembled on Au/chitosan/reduced grapheme oxide nanosheets for electrochemically-driven drug cascade metabolism // Electrochim. Acta. 2015. Vol. 165, P. 36-44.

378. Panicco P., Castrignanò S., Sadeghi S.J., et al. Engineered human CYP2C9 and its main polymorphic variants for bioelectrochemical measurements of catalytic response // Bioelectrochemistry. 2021. Vol. 138, Art. num. 107729.

379. Rusling J.F., Wang B., Yun S. Electrochemistry of redox enzymes. In: Bartlett P.N. editor. Bioelectrochemistry: Fundametals, Experimental Techniques and Applications. New Jersey: John Wiley & Sons, Ltd.; 2008. P. 39–85.

380. Nash T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction // Biochem J. 1953. Vol. 55, N3. P. 416-421.

381. Poverennaya E V., Kiseleva OI, Ponomarenko EA, Naryzhny SN, Zgoda VG, Lisitsa A V. Multiomics study of HepG2 cell line proteome. Biomeditsinskaya khimiya Institute of Biomedical Chemistry, Moscow; 2017 Oct 1;63(5):373–378. PMID:29080867.

382. Krasnov GS, Radko SP, Ptitsyn KG, Shapovalova V V, Timoshenko OS, Khmeleva SA, Kurbatov LK, Kiseleva YY, Ilgisonis E V, Pyatnitskiy MA, Poverennaya E V, Kiseleva OI, Vakhrushev I V, Tsvetkova A V, Buromski I V, Markin SS, Zgoda VG, Archakov AI, Lisitsa A V, Ponomarenko EA, Lisitsa A. Human Chr18: "Stakhanovite" Genes, Missing and uPE1 Proteins in Liver Tissue and HepG2 Cells. bioRxiv Cold Spring Harbor Laboratory; 2020 Nov 6;2020.11.04.358739. doi: 10.1101/2020.11.04.358739.

383. В.В. Шаповалова, С.П. Радько, К.Г. Птицын, Г.С. Краснов, К.В. Наход, О.С. Конаш, М.А. Виноградина, Е. А. Пономаренко, Д.С. Дружиловский, А. В. Лисица. Обработка длинных чтений транскриптомного секвенирования на облачной вычислительной платформе Amazon Web Services. 2020;3(4). Available from: http://www.bmc-rm.org/index.php/bmcrm/article/view/131/357 [accessed Dec 22, 2022].

384. Chhibber A, French CE, Yee SW, Gamazon ER, Theusch E, Qin X, Webb A, Papp AC, Wang A, Simmons CQ, Konkashbaev A, Chaudhry AS, Mitchel K, Stryke D, Ferrin TE, Weiss ST, Kroetz DL, Sadee W, Nickerson DA, Krauss RM, George AL, Schuetz EG, Medina MW, Cox NJ, Scherer SE, Giacomini KM, Brenner SE. Transcriptomic variation of pharmacogenes in multiple human tissues and lymphoblastoid cell lines. Pharmacogenomics J 2016 172 Nature Publishing Group; 2016 Feb 9;17(2):137–145. PMID:26856248.

385. Niu L, Geyer PE, Gupta R, Santos A, Meier F, Doll S, Wewer Albrechtsen NJ, Klein S, Ortiz C, Uschner FE, Schierwagen R, Trebicka J, Mann M. Dynamic human liver proteome atlas reveals functional insights into disease pathways. Mol Syst Biol Mol Syst Biol; 2022 May;18(5). PMID:35579278.

386. 6Farndale RW, Sixma JJ, Barnes MJ, De Groot PG. The role of collagen in thrombosis and hemostasis. J Thromb Haemost John Wiley & Sons, Ltd; 2004 Apr 1;2(4):561–573. PMID:15102010.

387. Mignone F, Gissi C, Liuni S, Pesole G. Untranslated regions of mRNAs. Genome Biol Genome Biol; 2002;3(3). PMID:11897027.

388. López-Lastra M, Rivas A, Barría MI. Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation. Biol Res Biol Res; 2005;38(2–3):121–146. PMID:16238092.

389. Wang H, Wang Y, Yang J, Zhao Q, Tang N, Chen C, Li H, Cheng C, Xie M, Yang Y, Xie Z. Tissue- and stage-specific landscape of the mouse translatome. Nucleic Acids Res Nucleic Acids Res; 2021 Jun 21;49(11):6165–6180. PMID:34107020.

390. Ponomarenko EA, Poverennaya E V., Ilgisonis E V., Pyatnitskiy MA, Kopylov AT, Zgoda VG, Lisitsa A V., Archakov AI. The Size of the Human Proteome: The Width and Depth. Int J Anal Chem Int J Anal Chem; 2016;2016. PMID:27298622.

391. Hafezqorani S, Yang C, Lo T, Nip KM, Warren RL, Birol I. Trans-NanoSim characterizes and simulates nanopore RNA-sequencing data. Gigascience Gigascience; 2020 Jun 10;9(6). PMID:32520350.

392. Workman RE, Tang AD, Tang PS, Jain M, Tyson JR, Razaghi R, Zuzarte PC, Gilpatrick T, Payne A, Quick J, Sadowski N, Holmes N, de Jesus JG, Jones KL, Soulette CM, Snutch TP, Loman N, Paten B, Loose M, Simpson JT, Olsen HE, Brooks AN, Akeson M, Timp W. Nanopore native RNA sequencing of a human poly(A) transcriptome. Nat Methods 2019 1612 Nature Publishing Group; 2019 Nov 18;16(12):1297–1305. PMID:31740818.

393. Yang C, Chu J, Warren RL, Birol I. NanoSim: nanopore sequence read simulator based on statistical characterization. Gigascience Oxford Academic; 2017 Apr 1;6(4):1–6. PMID:28327957.

394. Shkrigunov T, Pogodin P, Zgoda V, Larina O, Kisrieva Y, Klimenko M, Latyshkevich O, Klimenko P, Lisitsa A, Petushkova N. Protocol for Increasing the Sensitivity of MS-Based Protein Detection in Human Chorionic Villi. Curr Issues Mol Biol Curr Issues Mol Biol; 2022 May 1;44(5):2069–2088. PMID:35678669.

395. Palomba S, Piltonen TT, Giudice LC. Endometrial function in women with polycystic ovary syndrome: a comprehensive review. Hum Reprod Update Hum Reprod Update; 2021;27(3):584–618. PMID:33302299.

396. Kiseleva O, Poverennaya E, Shargunov A, Lisitsa A. Proteomic Cinderella: Customized analysis of bulky MS/MS data in one night. J Bioinform Comput Biol J Bioinform Comput Biol; 2018 Feb 1;16(1). PMID:29216772.

397. Welcome to CRAPome 2.0 | CRAPome. Available from: https://reprintapms.org/?q=chooseworkflow [accessed Dec 23, 2022].

398. Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, Mann M, Cox J. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. Nat Methods Nat Methods; 2016 Aug 30;13(9):731–740. PMID:27348712.

399. Human Metabolome Database: Contact Us. Available from: https://hmdb.ca/w/contact [accessed Dec 23, 2022].

400. Trifonova O, Lokhov P, Archakov A. Postgenomics diagnostics: metabolomics approaches to human blood profiling. OMICS OMICS; 2013 Nov 1;17(11):550–559. PMID:24044364.

401. Lokhov PG, Balashova EE, Trifonova OP, Maslov DL, Ponomarenko EA, Archakov AI. Mass Spectrometry-Based Metabolomics Analysis of Obese Patients' Blood Plasma. Int J Mol Sci Int J Mol Sci; 2020 Jan 2;21(2). PMID:31952343.

402. Gatto L, Lilley KS. MSnbase-an R/Bioconductor package for isobaric tagged mass spectrometry data visualization, processing and quantitation. Bioinformatics Bioinformatics; 2012 Jan;28(2):288–289. PMID:22113085.

403. Gibb S, Strimmer K. MALDIquant: a versatile R package for the analysis of mass spectrometry data. Bioinformatics Bioinformatics; 2012 Sep;28(17):2270–2271. PMID:22796955

404. Xia J, Wishart DS. MSEA: a web-based tool to identify biologically meaningful patterns in quantitative metabolomic data. Nucleic Acids Res Nucleic Acids Res; 2010 May 10;38(Web Server issue). PMID:20457745.
ПРИЛОЖЕНИЕ А «Протокол получения 3D-культур клеток линии

HepG2»

Раздел 1: Приготовление ростовой среды.

Необходимое оборудование и расходные материалы:

1. Ламинарный шкаф

2. Морозильник на -20°С.

3. Холодильник на 4°С.

4. Дозатор серологический.

5. Серологические пипетки на 25 мл, стерильные

6. Серологические пипетки на 10 мл, стерильные

7. Серологические пипетки на 5 мл, стерильные

Необходимые реагенты:

1. Культуральная среда DMEM/F-12 с глутамином (Thermo Fisher 31331028 или аналог

2. Сыворотка фетальная крупного рогатого скота (Thermo Fisher 10270-106 или аналог)

3. Культуральный антибиотик (Thermo Fisher 15140122 или аналог)

Приготовление ростовой среды:

1. Извлечь исходные компоненты из морозильника, нагреть до комнатной температуры.

2. Все манипуляции проводить в асептических условиях ламинарного шкафа.

3. В бутылку с культуральной средой DMEM/F12 объемом 500 мл добавить 50 мл фетальной сыворотки и 5 мл культурального антибиотика, перемешать.

4. Готовую ростовую среду хранить при +4°C, использовать в течение 14 дней.

Раздел 2: Разморозка клеток линии HepG2.

Необходимое оборудование и расходные материалы:

- 1. Ламинарный шкаф
- 2. СО2 инкубатор (37°С, 5% СО2)
- 3. Водяная баня
- 4. Центрифуга настольная
- 5. Пробирки для настольной центрифуги объемом 15 мл

6. Набор микропипеток 10-1000 µl со стерильными наконечниками

7. Дозатор серологический

8. Серологические пипетки на 25 мл, стерильные

9. Серологические пипетки на 10 мл, стерильные

10. Серологические пипетки на 5 мл, стерильные

11. Культуральные флаконы с площадью дна 75 см2, стерильные

12. 70% этанол

13. Салфетки стерильные

14. Пинцет

Необходимые реагенты:

1. Культуральная среда DMEM/F-12 с глутамином (Thermo Fisher 31331028 или аналог)

2. Сыворотка фетальная крупного рогатого скота (Thermo Fisher 10270-106 или аналог)

3. Культуральный антибиотик (Thermo Fisher 15140122 или аналог)

Разморозка клеток линии HepG2:

1. Извлечь криопробирку с замороженными клетками из криохранилища сосуда Дьюара с жидким азотом.

2. При помощи пинцета погрузить криопробирку в водяную баню, нагретую до температуры 37°С, не опуская крышку ниже уровня поверхности. Визуально контролировать размораживание.

3. Как только содержимое криопробирки растает, извлечь криопробирку из водяной бани, тщательно протереть стерильной салфеткой, смоченной 70%-м этанолом, и переместить в ламинарный шкаф для дальнейшей работы.

4. Аккуратно перенести содержимое криопробирки в пробирку объемом 15 мл, избегая образование пены и пузырей.

5. Медленно по каплям добавить 10 мл культуральной среды.

6. Перенести пробирку объемом 15 мл в настольную центрифугу, осадить клетки при 200 х g в течение 5 мин.

7. По окончании центрифугирования удалить супернатант.

8. Ресуспендировать клеточный осадок в 15 мл полной ростовой среды (см. выше) и перенести в культуральный флакон.

9. Поместить флакон в СО2-инкубатор для культивирования.

Раздел 3: Культивирование клеток линии HepG2.

Необходимое оборудование и расходные материалы:

2. СО2 инкубатор (37°С, 5% СО2).

2. Микроскоп инвертированный с 10х объективом и функцией фазового контраста.

3. Дозатор серологический.

4. Серологические пипетки на 25 мл, стерильные

5. Серологические пипетки на 10 мл, стерильные

Необходимые реагенты:

1. Культуральная среда DMEM/F-12 с глутамином (Thermo Fisher 31331028 или аналог

2. Сыворотка фетальная крупного рогатого скота (Thermo Fisher 10270-106 или аналог)

3. Культуральный антибиотик (Thermo Fisher 15140122 или аналог)

Культивирование клеток линии HepG2:

1. Наблюдение за клетками производить ежедневно после разморозки, используя микроскоп.

2. Смену ростовой среды осуществлять каждые 48 ч. Для этого удалить содержимое из культурального флакона и внести туда 15 мл свежей ростовой среды.

3. При достижении слоем клеток конфлюэнтности 40-50% осуществить пассирование клеточной культуры, как описано ниже.

Раздел 4: Перевод клеток в суспензию и пассирование клеточной культуры.

Необходимое оборудование и расходные материалы:

1. Ламинарный шкаф

2. СО2 инкубатор (37°С, 5% СО2).

2. Микроскоп инвертированный с 10х объективом и функцией фазового контраста.

4. Центрифуга настольная

5. Пробирки для настольной центрифуги объемом 15 мл

6. Набор микропипеток 10-1000 µl со стерильными наконечниками

7. Дозатор серологический

8. Серологические пипетки на 25 мл, стерильные

9. Серологические пипетки на 10 мл, стерильные

10. Серологические пипетки на 5 мл, стерильные

11. Культуральные флаконы с площадью дна 75 см2, стерильные

Необходимые реагенты:

1. Культуральная среда DMEM/F-12 с глутамином (Thermo Fisher 31331028 или аналог

2. Сыворотка фетальная крупного рогатого скота (Thermo Fisher 10270-106 или аналог)

3. Культуральный антибиотик (Thermo Fisher 15140122 или аналог)

4. Р-р трипсина 0,25% на ЭДТА (ПанЭко, П036п или аналог)

5. Р-р Версена (ПанЭко, Р080п или аналог)

Перевод клеток в суспензию и пассирование клеточной культуры.

1. Удалить содержимое из культурального флакона.

2. Внести 10 мл р-ра Версена

3. Удалить содержимое из культурального флакона.

4. Внести 10 мл р-ра Версена

5. Удалить содержимое из культурального флакона.

6. Внести 2.5 мл р-ра трипсина

7. Поместить флакон в СО2-инкубатор, инкубировать 5 мин.

8. Проконтролировать под микроскопом снятие клеток с поверхности.

9. Перенести суспензию клеток в пробирку объемом 15 мл, добавить 10 мл культуральной среды.

10. Перенести пробирку объемом 15 мл в настольную центрифугу, осадить клетки при 200 х g в течение 5 мин.

11. По окончании центрифугирования удалить супернатант.

12. Ресуспендировать клеточный осадок в 45 мл полной ростовой среды (см. выше) и перенести аликвоты по 15 мл в 3 стерильных культуральных флакона.

13. Поместить флаконы в СО2-инкубатор для культивирования.

Раздел 5: Получение сфероидных 3D культур клеток линии HepG2.

Необходимое оборудование и расходные материалы:

1. Ламинарный шкаф

2. СО2 инкубатор (37°С, 5% СО2).

2. Микроскоп инвертированный с 10х объективом и функцией фазового контраста.

4. Центрифуга настольная

5. Пробирки для настольной центрифуги объемом 15 мл

6. Набор микропипеток 10-1000 µl со стерильными наконечниками

7. Дозатор серологический

8. Серологические пипетки на 25 мл, стерильные

9. Серологические пипетки на 10 мл, стерильные

10. Серологические пипетки на 5 мл, стерильные

11. Чашки Петри диаметром 10 см, стерильные

12. Планшеты культуральные круглодонные (96 лунок) с низкоадгезивным покрытием

13. Гемоцитометр (камера Горяева)

Необходимые реагенты:

1. Культуральная среда DMEM/F-12 с глутамином (Thermo Fisher 31331028 или аналог

2. Сыворотка фетальная крупного рогатого скота (Thermo Fisher 10270-106 или аналог)

3. Культуральный антибиотик (Thermo Fisher 15140122 или аналог)

4. Р-р трипсина 0,25% на ЭДТА (ПанЭко, П036п или аналог)

5. Р-р Версена (ПанЭко, Р080п или аналог)

Получение сфероидных 3D культур клеток линии HepG2:

1. Перевести клетки в суспензию и осадить центрифугированием, как это было описано выше (выполнить пункты предыдущего раздела с 1 по 11 включительно).

2. Ресуспендировать осадок в 1 мл ростовой среды, измерить концентрацию клеток в полученной суспензии при помощи гемоцитометра в соответствии с инструкцией, поставляемой производителем.

3. Путем разбавления суспензии ростовой средой довести концентрацию клеток до 100 тыс. кл./мл.

4. Нанести капли клеточной суспензии объемом 20 мкл на внутреннюю поверхность крышки от чашки Петри, расположенной в перевернутом виде.

5. Налить на дно чашки Петри 5 мл культуральной среды.

6. Плавным движением перевернуть крышку и накрыть ей чашку Петри, после чего капли клеточной суспензии должны оказаться в висящем положении.

7. Поместить чашку Петри в СО2-инкубатор и культивировать в течение 96 ч. По окончании проконтролировать под микроскопом наличие в каплях скоплений агрегирующих клеток, которые на этой стадии могут иметь неправильную форму.

8. Переместить чашку Петри в ламинарный шкаф, плавным движением снять и перевернуть крышку.

9. При помощи микропипетки перенести капли среды с клетками в лунки низкоадгезивного культурального планшета. Контролировать результат переноса под микроскопом.

10. Добавить в лунки планшета по 100 мкл ростовой среды и поместить планшет в СО2-инкубатор на 72 ч.

11. По окончании визуально проконтролировать под микроскопом формирование в лунках планшета клеточных сфероидов с четко оформленными округлыми границами.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б «Методика анализа транскриптома в биологических образцах с использованием нанопорового детектора»

Методика транскриптома В биологических образцах анализа с нанопорового детектора предназначена использованием ДЛЯ исследования продуктов экспрессии генов на уровне транскриптов. Методика описывает процедуру прямого секвенирования мРНК на нанопоровом детекторе MinION производства компании Oxford Nanopore Technologies (Великобритания) и включает этапы (1) экстракции суммарной РНК из образцов ткани и культивируемых клеток, (2) выделения белок-кодирующей матричной РНК (мРНК) из препаратов суммарной РНК, (3) приготовления библиотеки для секвенирования, (4) загрузки библиотеки на проточную ячейку нанопорового детектора и (5) проведение секвенирования на нанопоровом детекторе. Время проведения анализа, согласно методике составляет от 72 до 96 часов и включает времязатраты на выполнение всех 5 этапов.

1. Используемые материалы, растворы и оборудование

1.1. Расходные материалы и реактивы

1.1.1. Вода, свободная от нуклеаз (производитель – любой)

1.1.2. Этанол, 96% (производитель – любой)

1.1.3. Проточная ячейка FLO-MIN106D для секвенатора MinION

1.1.4. Набор для определения концентрации двухцепочечной ДНК «Qubit™ dsDNA HS Assay Kit» (Thermo Fisher Scientific, Кат. № Q32851)

1.1.5. Магнитные частицы для отчистки РНК «Agencourt RNAClean XP beads» (Beckman Coulter, Кат. № А63987)

1.1.6. Набор для прямого секвенирования мРНК «Direct RNA sequencing kit» (Oxford Nanopore Technologies, Кат. № SQK-RNA002)

1.1.7. Набор для подготовки проточной ячейки к секвенированию «Flow Cell Priming Kit» (Oxford Nanopore Technologies, Кат. № EXP-FLP002)

1.1.8. Набор для выделения мРНК из суммарной РНК на магнитных частицах «Dynabeads[™] mRNA Purification Kit» (Thermo Fisher Scientific, Кат. № 61006)

1.1.9. Набор для выделения суммарной РНК «RNeasy Mini Kit» (Qiagen, Кат. № 74104)

1.1.10. Набор для определения концентрации РНК «Qubit™ RNA HS Assay Kit» (Thermo Fisher Scientific, Кат. № Q32852)

1.1.11. Набор для определения качества суммарной РНК «Agilent RNA 6000
Nano Kit» (Agilent, Кат. № 5067-1511)

1.1.12 Ревертаза для обратной транскрипции длинных фрагментов мРНК «SuperScript III Reverse Transcriptase» (Thermo Fisher Scientific, Кат. № 18080044)

1.1.13. Смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dNTP), 10 mM каждого (New England Biolabs, Кат. № N0447)

1.1.14. Набор для лигирования «NEBNext Quick Ligation Module» (New England Biolabs, Кат. № E6056)

1.1.15. Шприц медицинский одноразовый объемом 3 мл (производитель – любой)

1.1.16. Наконечники для автоматических пипеток переменного объема, с фильтрами, свободные от нуклеаз (производитель – любой)

1.1.17. Пробирки полипропиленовые «DNA LoBind» объемом 1,5 мл, свободные от нуклеаз, (Eppendorf, Кат. № 0030108051 или аналог)

1.1.18. Пробирки полипропиленовые объемом 0,6 мл, свободные от нуклеаз (производитель – любой)

1.1.19. Пробирки полипропиленовые объемом 1,5 мл, свободные от нуклеаз (производитель – любой)

1.1.20. Пробирки полипропиленовые объемом 2 мл, свободные от нуклеаз (производитель – любой)

1.1.21. ПЦР-пробирки объемом 0,2 мл, свободные от нуклеаз (производитель – любой)

1.1.22. Перчатки медицинские (производитель – любой)

1.1.23. Лёд

1.1.24. β-меркаптоэтанол (производитель – любой)

1.1.25. 70 % раствор этанола (производитель – любой)

1.1.26. Гликоген для молекулярной биологии (Roche, Кат. № 10901393001)

1.1.27. Ацетат натрия для молекулярной биологии, 3 М раствор Sigma-Aldrich,Кат. № 567422-100ML)

1.2. Оборудование

1.2.1. Нанопоровый детектор (секвенатор) MinION (Oxford Nanopore Technologies)

1.2.2. Управляющий компьютер (1 ТВ SSD Storage, 8 GB RAM, GPU) (производитель – любой)

1.2.2. Магнитная мешалка US-1500A (ULAB) или аналог

1.2.3. Вортекс V-1 plus (BioSan) или аналог

1.2.4. Спектрофотометр NanoDrop-1000 (Thermo Fisher Scientific) или аналог

1.2.5. Флуориметр Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific)

1.2.6. Центрифуга с охлаждением Eppendorf 5804R или аналог

1.2.7. Термоциклер Bio Rad DNA Engine Tetrad 2 или аналог

1.2.8. Термостат TS100 (BioSan) или аналог

1.2.9. Генератор льда (производитель – любой)

1.2.10. Весы аналитические XP205 (Mettler Toledo) или аналог

1.2.11. Ротационный перемешиватель HulaMixer Sample Mixer (Thermo Fisher Scientific) или аналог

1.2.12. Вортекс MSV-3500 (BioSan) или аналог

1.2.13. Биоанализатор Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent)

1.2.14. Гомогенизатор Даунса (производитель – любой)

1.2.15. Набор автоматических пипеток переменного объема (производитель – любой)

1.2.16. Ножницы медицинские прямые остроконечные (производитель – любой)

1.2.17. Пинцет анатомический (производитель – любой)

1.2.18. Магнитный штатив для пробирок объёмом 1.5 мл (производитель – любой)

2.1. Выделение суммарной РНК из биологических образцов

Примечание: для секвенирования транскриптома культивируемых клеток и клеток ткани необходимо получить не менее 30 и 60 мкг суммарной РНК, соответственно. Необходимое для этого количество культивируемых клеток и образца ткани (в мг) зависит от типа клеток и типа ткани и определяется по

референсным значениям выхода суммарной РНК на один миллион культивируемых клеток или 1 мг ткани или результатам предварительного пробного выделения для заданного типа клеток (ткани). Количество культивируемых клеток должно лежать в интервале от 10 миллионов до 1 миллиарда, вес образца ткани – от 15 миллиграмм до 1 грамма. Пункты 2.1.1, 2.1.2.1 и 2.1.2.2 Методики описывают выделение суммарной РНК из 10 миллионов клеток или 15-30 миллиграмм ткани. Если необходимое количество клеток или ткани превышает значения 10 миллионов или 30 миллиграмм, соответственно, то приводимые в пп. 2.1.1, 2.1.2.1 и 2.1.2.2 объемы растворов должны быть увеличены пропорционально увеличению количества биоматериала.

2.1.1. Подготовит растворы для выделения суммарной РНК. Для этого добавить 10 мкл β-меркаптоэтанола к 1 мл буфера RLT из набора «RNeasy Mini Kit» (далее буфер RLT*) и 4 мл 96% этанола к 1 мл буфера RPE (далее буфер RPE*), полученные растворы перемешать пипетированием.

2.1.2.1. Разрушить клетки ткани, для чего образец ткани измельчить ножницами и поместить в гомогенизатор Даунса. К измельченному образцу ткани добавить 600 мкл буфера RLT* и гомогенизировать до получения визуально однородной суспензии клеток. Полученную суспензию клеток переместить в шприц объемом 2 мл и пропустить через иглу с внутренним диаметром 0,6 мм, собирая гомогенат в полипропиленовую пробирку объемом 2 мл. Повторить операцию 10 раз. Осадить не разрушившиеся клетки центрифугированием 2 мин с ускорением 12000 g при комнатной температуре. Отобрать надосадочную жидкость и переместить её в чистую полипропиленовую пробирку объемом 1, 5 мл. Перейти к п. 2.1.3.

2.1.2.2. Разрушить культивируемые клетки, для чего к клеточному осадку в полипропиленовой пробирке объемом 2 мл добавить 600 мкл буфера RLT* и ресуспендировать осадок пипетированием до получения однородного раствора. В случае если раствор неоднородный, переместить его в шприц объемом 2 мл и пропустить через иглу с внутренним диаметром 0,6 мм 10 раз. Перейти к п. 2.1.3.

2.1.3. Замерить объем гомогената с помощью автоматической пипетки переменного объема. К полученному гомогенату добавить равный объём 70% раствора этанола и перемешать пипетированием. Перенести полученную смесь в

спин-колонку из набора «RNeasy Mini Kit», спин-колонку поместить в полипропиленовую центрифужную пробирку объемом 2 мл из набора «RNeasy Mini Kit» и центрифугировать 15 сек при ускорении 8000 g. Раствор, прошедший через спин-колонку, удалить. Если объем смеси превышает 700 мкл, разделить смесь на части, объем каждой из которых не превышает 700 мкл и последовательно пропустить их через колонку. Центрифугировать как описано выше. После удаление прошедшего через спин-колонку раствора, нанести на спин-колонку следующую часть смеси и повторить операцию.

2.1.4. Промыть спин-колонку, для чего добавить к спин-колонке 700 мкл буфера RW1 из набора «RNeasy Mini Kit» и центрифугировать спин-колонку 15 сек при 8000 g. Прошедший раствор удалить. Затем добавить к спин-колонке 500 мкл буфера RPE* и центрифугировать 15 сек при 8000 g. Прошедший раствор удалить. Повторить промывку добавлением 500 мкл буфера RPE*, но центрифугировать 2 мин при 8000 g. Перенести спин-колонки в новую полипропиленовую центрифужную пробирку объемом 2 мл из набора «RNeasy Mini Kit» и центрифугировать 1 мин при 8000 g для удаления остатков спирта.

2.1.5. Для элюции суммарной РНК с мембраны спин-колонки, перенести спинколонку в чистую полипропиленовую пробирку1.5 мл, аккуратно нанести на мембрану спин-колонки 30 мкл воды, свободной то нуклеаз, и центрифугировать 1 мин при 8000 g. Полученную суммарную РНК поместить в водяную баню с тающим льдом.

2.1.6. Определить концентрацию суммарной РНК, для чего от полученного образца РНК отобрать 2 мкл для измерения на спектрофотометре NanoDrop-1000. Измерения проводятся следую инструкции производителя.

2.1.7. Провести определение качества (степени деградации) суммарной РНК, для чего от полученного образца РНК отобрать 1 мкл на измерение качества при помощи набора «Agilent RNA 6000 Nano Kit» на биоанализаторе Agilent 2100 Bioanalyzer в соответствии с инструкцией производителя. Если величина RIN для образца суммарной РНК ниже 7,5, то РНК считается деградированной и не пригодной для нанопорового секвенирования.

2.1.8. Полученный образец суммарной РНК либо использовать сразу для выделения мРНК, либо заморозить и хранить при -80°С до использования.

Примечание: Выход суммарной РНК должна быть не меньше 30 мкг в случае культивируемых клеток и 60 мкг в случае образца ткани. Если выход меньше этих значений, то образец РНК необходимо заморозить и хранить при -80°С, и повторить выделение суммарной РНК с новыми образцами клеток или ткани. Второе выделение РНК объединить с первым. Общий выход суммарной РНК с двух выделений должен быть не менее 30 и 60 мкг для культивируемых клеток и образца ткани.

2.2. Выделение мРНК из образца суммарной РНК

2.2.1. Развести образец суммарной РНК водой, свободной от нуклеаз, до концентрации 750 нг/мкл. Прогреть полученный раствор при 65°С в течении 2 мин. для разрушения вторичной структуры РНК, затем поместить пробирку с раствором суммарной РНК в водяную баню с тающим льдом.

2.2.2. Подготовить магнитные частицы для работы, для чего ресуспендировать стоковую суспензию магнитных частиц из набора «DynabeadsTM mRNA Purification Kit» энергичным перемешиванием на вортексе до получения визуальной однородности. Отобрать объем стоковой суспензии магнитных частиц, равный двойному объему образца суммарной РНК, и пеместить в полипропиленовую пробирку объемом 1,5 мл. Поместить пробирку на магнитный сепаратор на 1-2 мин. После сбора магнитных частиц на стенке пробирки, аккуратно отобрать жидкость с помощью автоматической пипетки переменного объема и добавить Binding Buffer из набора «DynabeadsTM mRNA Purification Kit» в объеме, равному половине объема использованной стоковой суспензии магнитных частиц. Убрать пробирку из магнитного штатива, ресуспендировать частицы пипетированием. Вновь поместить пробирку в магнитный штатив на 1-2 мин, и после сбора частиц на стенке пробирки, полностью аккуратно отобрать жидкость с помощью автоматической пипетки переменного объема. Добавить такой же объем Binding Buffer, убрать пробирку из магнитного штатива, и ресуспендировать частицы пипетированием.

2.2.3. Добавить образец суммарной РНК в пробирку с подготовленной суспензией магнитных частиц в Binding Buffer, перемешать пипетированием. Инкубировать смесь 5 минут при комнатной температуре с постоянным перемешиванием на ротационном перемешивателе со скоростью 30 об/мин, после чего поместить пробирку на магнитный сепаратор на 1-2 мин.

2.2.4. После сбора магнитных частиц на стенке пробирки, аккуратно отобрать жидкость с помощью автоматической пипетки переменного объема и добавить Washing Buffer B из набора «DynabeadsTM mRNA Purification Kit» в объеме, равном объему использованной стоковой суспензии магнитных частиц. Поместить пробирку на магнитный сепаратор на 1-2 мин. После сбора магнитных частиц на стенке пробирки, аккуратно отобрать жидкость с помощью автоматической пипетки переменного объема ресуспендировать частицы пипетированием. Повторить процедуру отмывки частиц раствором Washing Buffer B.

2.2.5. Для элюции мРНК с магнитных частиц, добавить в пробирку с осадком магнитных частиц 10 мкл воды, свободной от нуклеаз, ресуспендировать частицы. Поместить пробирку в твердотельный в термоблок, нагретый до температуры 80°С, и оставить на 2 мин, после чего немедленно поместить пробирку в магнитный штатив. После сбора магнитных частиц на стенке пробирки, отобрать жидкость и перенести в чистую пробирку «DNA LoBind». Пробирку с раствором мРНК поместить в водяную баню с тающим льдом.

2.2.6. Отобрать 1 мкл раствора мРНК в полипропиленовую пробирку объемом 0,6 мл и определить концентрацию выделенной мРНК, на флуориметре Qubit 4.0 с помощью набора «QubitTM RNA HS Assay Kit» в соответствии с протоколом производителя. мРНК использовать немедленно для приготовления библиотеки для секвенирования или заморозить и хранить при -80°C в течение не более 3 месяцев.

Примечание: Концентрация мРНК должна быть не менее 55 нг/мкл. Если концентрация мРНК ниже, чем 55 нг/мкл, то необходимо сделать новое выделение суммарной РНК и мРНК. Для сохранения полученной мРНК, добавить к раствору 1 мкл 3 М раствора ацетата натрия и 1 мкл раствора гликогена концентрацией 5 мкг/мкл, перемешать пипетированием. К полученной смеси добавить 25 мкд 96% этанола и поместить на -20°С на 2 часа. Осадить мРНК центрифугированием 30 мин при 4°С и ускорении 30000 g, удалить жидкость с помощью автоматической пипетки переменного объема, промыть осадок ледяным 96% этанолом и высушить на воздухе. Осадок хранить на -80°С до объединения с мРНК, полученной в новом выделении.

2.3. Приготовление библиотеки для секвенирования

2.3.1. Поместить в водяную баню с тающим льдом и выдержать 10 мин все

peareнты из набора для секвенирования «Direct RNA sequencing kit», из набора «NEBNext Quick Ligation Module» (кроме ДНК-лигазы фага T4, которая остаётся на -20°С), а также 10 mM раствор dNTP.

2.3.2. Для присоединения адаптера RTA к мPHK, приготовить реакционную смесь, для чего смешать в ПЦР-пробирке объемом 0,2 мл 9 мкл раствора мPHK, 3 мкл «NEBNext Quick Ligation Reaction BufferX5» из набора «NEBNext Quick Ligation Module», 0,5 мкл раствора RCS из набора «Direct RNA sequencing kit», 1 мкл раствора RTA из набора «Direct RNA sequencing kit» и 1,5 мкл раствора ДHK-лигазы фага T4 из набора «NEBNext Quick Ligation Module». Перемешать смесь пипетированием 5 - 7 раз и инкубировать 10 мин при комнатной температуре.

2.3.3. К 15 мкл предыдущей смеси добавить 23 мкл раствора, состоящего из: 9 мкл воды, свободной от нуклеаз, 2 мкл 10 mM раствора dNTP, 8 мкл буфера «Firststrand buffer X5» из набора «Direct RNA sequencing kit» и 4 мкл 0.1 M дитиотреитола из набора «NEBNext Quick Ligation Module». Полученную смесь перемешать пипетированием и добавить 2 мкл обратной транскриптазы SuperScript III, смесь снова перемешать пипетированием, затем пробирку с готовой смесью поместить в термоциклер Bio Rad DNA Engine Tetrad 2 и инкубировать со следующим температурным режимом: 50°C в течение 50 мин, затем 70°C в течение 10 мин, после чего 4°C в течение 2 мин.

2.3.4. Тщательно ресуспендировать магнитные частицы «RNAClean XP beads» перемешиванием флакона с частицами на вортексе. Перенести 40 мкл реакционной смеси из ПЦР- пробирки в полипропиленовую пробирку «DNA LoBind» и добавить Перемешать 72 МКЛ ресуспендированных магнитных частиц. суспензию пипетированием, затем пробирку co смесью поместить в ротационный перемешиватель и оставить перемешиваться на 5 мин при скорости вращения 30 об/мин при комнатной температуре. Центрифугировать пробирку 30 сек с ускорением 2000-3000 g при комнатной температуре и поместить в магнитный штатив на 2-3 мин. После того, как магнитные частицы соберутся на стенке пробирки, удалить жидкость с помощью автоматической пипетки переменного объема. Добавить 150 мкл 70% раствора этанола и повернуть пробирку в гнезде магнитного штатива на 180 градусов так, чтобы магнитные частицы переместились пробирки. Повторить на противоположную сторону стенки операцию

поворачивания пробирки ещё раз. Удалить раствор спирта с помощью автоматической пипетки переменного объема. Вынуть пробирку из гнезда магнитного штатива, легким встряхиванием переместить осадок на дно пробирки и снова поместить пробирку в магнитный штатив. После сбора частиц на стенке пробирки, тщательно удалить остатки спиртового раствора с помощью автоматической пипетки переменного объема.

2.3.5. Для элюции материала с магнитных частиц, добавить к осадку частиц в пробирке 20 мкл воды, свободной от нуклеаз, ресуспендировать частицы легким встряхиванием пробирки и оставить на 5 мин при комнатной температуре. После чего пробирку поместить в магнитный штатив на 2-3 мин до полного сбора частиц на стенке пробирки, отобрать элюат и перенести в чистую пробирку «DNA LoBind».

2.3.6. К 20 мкл элюата добавит 8 мкл «NEBNext Quick Ligation Reaction BufferX5», 6 мкл раствора RMX из набора «Direct RNA sequencing kit», 3 мкл воды, свободной от нуклеаз, и 3 мкл раствора ДНК-лигазы фага T4. Смесь перемешать пипетированием и инкубировать при комнатной температуре в течение 10 мин.

2.3.6. После прохождения реакции лигирования, к 40 мкл реакционной смеси добавить 40 мкл суспензии магнитных частиц «RNAClean XP beads», перемешать легким встряхиванием пробирки и поместить её в ротационный перемешиватель. Перемешивать смесь при комнатной температуре в течении 5 мин со скоростью вращения 30 об/мин. Центрифугировать пробирку 30 сек с ускорением 2000-3000 g при комнатной температуре. Поместить пробирку в магнитный штатив на 2-3 мин и после сбора частиц на стенке пробирки удалить жидкость с помощью автоматической пипетки переменного объема. Убрать пробирку из магнитного штатива и добавить к частицам 150 мкл промывочного буфера WSB из набора «Direct RNA sequencing kit», ресуспендировать частицы легким встряхиванием пробирки. Затем пробирку поместить в магнитный штатив и после сбора частиц на стенке пробирковать частицы легким встряхиванием пробирки. Затем пробирку поместить в магнитный штатив и после сбора частиц на стенке пробирки. В магнитный итатив и после сбора частиц на стенке промывочного буфера WSB из набора «Direct RNA sequencing kit», ресуспендировать частицы легким встряхиванием пробирки. Затем пробирку поместить в магнитный штатив и после сбора частиц на стенке пробирки затоматической пипетки переменного объема. В второй раз.

2.3.7. Для элюции материала с магнитных частиц, добавить 21 мкл раствора «Elution Buffer» из набора «Direct RNA sequencing kit», ресуспендировать частицы легким встряхиванием пробирки. Инкубировать суспензию 10 мин при комнатной температуре. После чего пробирку поместить в магнитный штатив на 2-3 мин до

полного сбора частиц на стенке пробирки, собрать элюат с помощью автоматической пипетки переменного объема и перенести в чистую пробирку «DNA LoBind». Отобрать 1 мкл элюата для измерения концентрации приготовленной библиотеки для секвенирования, остаток элюата хранить в водяной бане с тающим льдом.

2.3.8. Определить концентрацию библиотеки на флуориметре Qubit 4.0 с помощью набора «Qubit[™] dsDNA HS Assay Kit» в соответствии с протоколом производителя.

Примечание: Концентрация библиотеки должна быть не менее чем 10 нг/мкл (суммарное количество нуклеиновой кислоты – не менее 200 нг). Если количество нуклеиновой кислоты менее 200 нг, то библиотеку следует заморозить и хранить при -80°С. Необходимо приготовить новую библиотеку из того же образца биологического материала, которую можно объединить с хранящейся библиотекой.

2.3.9. Использовать элюат, содержащий библиотеку, немедленно для проведения секвенирования или заморозить и хранить при -80°С в течение 3 месяцев.

2.4. Секвенирование готовой библиотеки

Примечание: перед секвенированием провести тестирование проточной ячейки FLO-MIN106D на наличие работающих пор, руководствуясь инструкцией производителя. Количество работающих пор должно быть не ниже 800. Если количество работающих пор менее 800, то проточную ячейку не рекомендуется использовать для секвенирования траснкриптома.

2.4.1. Для удаления консервирующего раствора из проточной ячейки, промыть её раствором «Priming Mix», для приготовления которого в пробирку FB из набора «Flow Cell Priming Kit» добавить 30 мкл раствора FLT из того же набора, перемешать на вортексе. Отобрать 800 мкл полученного раствора «Priming Mix» с помощью автоматической пипетки переменного объема, отодвинуть заглушку проточной ячейки, закрывающей отверстие, обозначенное как «Priming Port», и медленно пропустить раствор через проточную ячейку, не допуская попадание пузырей воздуха в рабочую камеру ячейки. Оставить раствор «Priming Mix» в проточной ячейку на 5 мин для активации работающих пор.

2.4.2. В течение времени активации пор, к 20 мкл элюата, содержащего библиотеку для секвенирования (при необходимости, элюат разморозить помещением в водяную баню с тающим льдом) добавить 17,5 мкл воды, свободной от нуклеаз, и 37,5 мкл раствора RRB из набора «Direct RNA sequencing kit», перемешать пипетированием, поместить в водяную баню с тающим льдом. Открыть заглушку отверстия проточной ячейки, обозначенного как «SpotON», осторожно по каплям добавить 200 мкл раствора «Priming Mix» в отверстие «Priming Port», не допуская попадания пузырей воздуха. После этого внести 75 мкл растовра, содержащего библиотеку, в проточную ячейку через отверстие «SpotON», по каплям, не допуская попадание пузырей воздуха. Закрыть заглушки на обоих отверстиях.

2.4.3. Запустить программу MinKNOW на управляющем компьютере, руководствуясь инструкцией производителя. Ввести или выбрать из меню следующие параметры: название образца или эксперимента, тип проточной ячейки (выбрать R9.4.1 из меню); тип секвенирования (выбрать SQK-RNA002 из меню); время секвенирования (установить 48 часов); директорию для сохранения файлов с первичными данными секвенирования (на локальном компьютере или на сервере, со свободным местом на диске не менее 500 Гб); формат файлов с первичными данными секвенирования (выбрать FAST5 из меню); количество «прочтений» в одном файле формата FAST5 (установить 10 тыс. «прочтений»); нужен ли перевод сигнала в нуклеотидную последовательность (base-calling) из формата FAST5 в формат FASTQ (выбрать вариант без перевода сигнала).

2.4.4. Выбрать курсором на экране монитора кнопку «START» и активировать процесс секвенирования нажатием левой кнопки мыши.

2.4.5. Через 48 часов, после окончания процесса секвенирования, закрыть программу и убрать проточную ячейку из нанопорового детектора MinION.

Примечание: Количество секвенированных транскриптов («прочтений») должно быть не менее 1 миллиона и не более 3 миллионов. Если количество «прочтений» менее 1 миллиона, необходимо повторить секвенирование. Допускается объединение «прочтений», полученных в результате независимых секвенирований одного биологического образца. Количество детектированных транскриптов должно составлять не менее 50% от числа транскриптов,

детектированных другими методами секвенирования в том же биологическом образце. При отсутствии данных, полученных другим методом секвенирования для данного биологического образца, допускается сравнение с количеством детектированных транскриптов для соответствующего типа ткани (клеток), доступным в открытых специализированных базах данных.

ПРИЛОЖЕНИЕ В «Перечень наиболее часто встречаемых модификаций РНК, которые могут быть выявлены при анализе транскриптома в биологических образцах»

(результаты опубликованы в статье Арзуманян и соавт., 2022, публикация по теме проекта)

N⁰	Модификация	Код	База	Классы	Местоположение и	Функция	Методы детекции1	Болезни
				РНК	частота			
1	N6-метиладенозин	м6А	Α	рРНК,	мРНК: обогащена 5'-	мРНК: регулирует	DRS, ВЭЖХ MeRIP-	Остеопороз,
				тРНК,	UTR, вокруг стоп-	сплайсинг, вызывает	seq, MiCLIP	ГЦК, ожирение
				мРНК,	кодонов, и 3'-UTR	нестабильность мРНК,		
				миРНК,		повышает		
				днРНК,		эффективность		
				циркРНК,		трансляции; днРНК:		
				мяРНК		играет роль в		
						опосредованной днРНК		
						репрессии транскрипции		
2						тРНК: необходима для		
						распознавания		
						качающихся кодонов;		ГЦК; рак желудка,
				тРНК,	тРНК: позиция (п) 34,	мРНК: влияет на	ЖХ-МС/МС, ОТ-	толстой кишки,
	Инозин	Ι	А	мРНК,	37, 57; мРНК: участки	стабильность и	ПЦР, DRS,	пищевода,
				микроРНК	дцРНК	локализацию, может	de novo PHK-seq	глиобластома
						изменять		и рак легких
						последовательность		
						белка		
3				рРНК,		рРНК: играет роль в	Deep to See DPS	Рак предстательной
	Псерноуринии	$\Psi_{\mu\pi\mu}V$	II	тРНК,		сборке рибосом и	DSI seg Cell Seg	железы, молочной
	псевдоуридин	т или т	0	мРНК,	$\begin{array}{c} \text{MITIK. JUIK, JUIK,} \\ \text{CDS} \end{array}$	точности трансляции;	W Sog PBS sog	железы и
				мяРНК, мт-	CDS	тРНК: повышает	1-sey, KDS-seq	легких; ГЦК

1 Кроме нанопорового детектора

N⁰	Модификация	Код	База	Классы	Местоположение и	Функция	Методы детекции1	Болезни
				РНК	частота			
				тРНК,		стабильность		
				scaPHK,				
				мякРНК,				
				микроРНК,				
				линкРНК				
4				микроРНК.	рРНК: SSU G1639 (у	DIMA	m7G-MeRIP-seq.	
	7	70	G	pPHK,	человека); тРНК: п. 46;	тРНК: повышает	m7G-seq, DRS,	ГЦК, ЗПА, рак
	/-метилгуанозин	m/G	G	мРНК,	мРНК: 4522 кластера в	стабильность; мРНК:	m7G-miCLIP-seq,	легкого
				тРНК	пределах 2318 мРНК в	регулирует трансляцию	m7G-MaP-seq	
-					$\frac{\text{KJETKax 2931}}{-\text{DLUC} = 16,17,20,20}$		^	
5					17 HK: II. 10, 17, 20, 20a, 205, 47.	,		
					200, 47, MDHK: 120 MIGGTKOD D			
				трнк	112 METIK. 150 YACIKOB B	тРНК: дестабилизирует		
	Пигипроурилин	р	II	инк, мрнк	транскриптах S	структуру; мРНК:	D-seq, Rho-seq,	Par nervuy
	дигидроуридин	D	U	марнк,	cerevisiae ·	влияет на сплайсинг и	ЖХ-МС	і ак леі ких
					мякРНК· 48 участков в	трансляцию		
					23 мякРНК у S			
					cerevisiae.			
6							ARM-seq, m1A-seq,	ГЦК; рак шейки
				"DI II/	"DIII/. am 1222 p 295.	рРНК: обеспечивает	m1A-quant-seq,	матки,
					pPIK: cip.1522 B 205;	правильную укладку;	m1A-ID-seq,	поджелудочной
	N1-метиладенозин	м1А	Α	MDHK	57 58.	тРНК: обеспечивает	m1A-seq-SS,	железы,
					57, 50, мРНК: решко	стабильность и	m1A-seq-TGIR,	молочной железы
				днг шх	мгтих. редко	правильную укладку	m1A-MAP,	и яичников
							m1A-IP-seq	
7						Воздействует на		
					TPHK Tyr TPHK His	кодирующий потенциал		Т-клеточная
	Квеозин	0	G	тРНК	TPHK Asn TPHK Asn	тРНК, защищает тРНК	УВЭЖХ-МС/МС,	пимфома рак
	Recomin	Y Y		11 111	п 34 (пюли)	ОТ	ЖХ-МС	топстой кишки
						расщепления		10JUTON KHIIKH
						рибонуклеазой		
8	5-метилцитидин	м5С	С	рРНК,	рРНК: m5C3761 и	рРНК: обеспечивает	m5C-RIP-seq,	АРИД, ДС,

N⁰	Модификация	Код	База	Классы	Местоположение и	Функция	Методы детекции1	Болезни
	_			РНК	частота			
				тРНК,	m5C4413 (хорошо	правильную укладку	Aza-IP-seq,	лактоацидоз,
				мРНК,	консервативны у	и точность	miCLIP-seq,	рак молочной
				эРНК,	эукариот); тРНК:	трансляции; тРНК:	TAWO-seq,	железы,
				микроРНК,	вариабельная петля,	обеспечивает	RNA-BisSeq,	гипотония/ синдром
				днРНК,	антикодоновая петля и	правильную укладку и	RBS-seq, DRS,	ВЯЛОГО
				вирусная	Т стебель; мРНК:	стабильность,	MeRIP-seq	ребенка, метаболизм
				РНК,	обогащена 5'UTR	взаимодействие	-	-
				сводная		кодон-антикодон		
				РНК,		и поддержание рамки		
				мяРНК,		считывания; мРНК:		
				мяРНК		влияет на		
						стабильность, скорость		
						трансляции; днРНК:		
						влияет на		
						стабильность; сводная		
						РНК: необходима		
						для биогенеза		
9						Требуется для		
	5-формилинтилин	f5C	C	трнк	мт-тРНК Met :	декодирования кодона	ВЭЖХ₋МС	нет панину
	5-формилцитидин	150		mmx	п.С34 (всегда)	AUA	DOMATINE	пет данных
						в митохондриях		
10				nPHK		Обеспечивает точность	FICC-Seq iCLIP	Рак молочной
	5-метилуридин	м5U	U	трнк,	тРНК: п. 54	трансляции, укладки и	miCL IP-seq	железы, системная
				штіх		стабильности тРНК	IIICEII -seq	красная волчанка
11				n PHK		Nm повышает		
				рг шқ, трнк	MPHK. 5'IITR 3'IITR	термодинамическую	RiboMethSeq,	Астма болегии
	$2'_{-}$	Nm	Bce	инк, мрнк	CDS°	стабильность пар	2D-TCX, Nm-seq,	Анцигеймерэ
	2-0-метилирование	1111	Dec	мп ПК, маРНК	TDDS,	оснований РНК:РНК и	2'OMe-seq, RTL-P,	Альці симера
				мягтік, марнк	11 111, 11, 4	стабилизирует дуплексы	DRS, RibOxi-seq	
				MAI 111X		РНК А-формы		
12				т р пъ	тРНК Leu CUN,	тРНК: предотвращает	MR-FISH, ЖХ-	
	1-метилгуанозин	m1G	G		тРНК Pro CCN,	сдвиг рамки	MC/MC,	нет данных
MPHK TPHK Arg CGG : m		тРНК Arg CGG : п. 37	считывания;	DRS				

N⁰	Модификация	Код	База	Классы	Местоположение и	Функция	Методы детекции1	Болезни
				РНК	частота			
					(всегда); тРНК:	мРНК: снижает точность		
					п. 9 (всегда	трансляции в		
					y S. cerevisiae);	зависимости от		
					мРНК (0,00046% G в S.	положения и кодона		
					cerevisiae)			
13						Требуется для		
	5-метиламинометил	mmm5_211	TT	TDI II/	тРНК Lys3 UUU : п. 34	декодирования кодонов	WV MC/MC	
	-2-тиуридин	1111113820	U	ΤΡΠΚ	(всегда)	лизина ААА и ААС	MA-MC/MC	нет данных
						тРНК Lys3 UUU		
14						Стабилизирует кодон-		
	Вибутозин	yW	G	тРНК	тРНК Phe: п. 37 (часто)	антикодоновые	ЖХ-МС/МС	нет данных
	-	-				взаимодействия		
15					тРНК: п. 12 (всегда);			
					рРНК: в спирали 34,			
					45;	тРНК: повышает	- DID	
				рРНК,	мРНК: обогащена	эффективность и		
	N4-ацетилцитидин	ac4C	С	тРНК,	5'UTR и CDS (4250	точность трансляции;	последовательность,	нет данных
				мРНК	участков в НеLа;	мРНК: повышает	ac4C-	
					отсутствует в НЕК293;	стабильность	последовательность	
					0,1% C в мРНК S.			
					cerevisiae)			
16							AlkAniline-seq,	
							HAC-seq, ARM-seq,	
	2	20	C	-DIII/	тРНК: п. 32 (30–90%, в	II	DM-tRNA-seq, mim-	Несколько видов
	э-метилцитидин	мэс	U	ТРПК	зависимости от тРНК)	пеизвестный	tRNA-seq,	рака
							hydro-tRNA-seq, LC-	-
							MS/MS, NAIL-MS	
17					тРНК: п. 15 (всегда),	Повышает		
	Археозин	G+	G	тРНК	п.13 (у некоторых	термостабильность	ВЭЖХ	нет данных
					видов)	тРНК		
18	5 Noterior Sources				тРНК Lys UUU ,	Повышает		
	э метоксикароонилметил	mcm5s2U	U	тРНК	тРНК Glu UUC,	эффективность	ВЭЖХ-МС	нет данных
-2-тиуридин					тРНК Gln UUG : п. 34	декодирования тРНК		

N⁰	Модификация	Код	База	Классы	Местоположение и	Функция	Методы детекции1	Болезни
				РНК	частота			
					(всегда)			
19	2-тиоцитидин	s2C	C	тРНК	тРНК Arg , тРНК Ser2 GCU : п. 32 (всегда)	Ограничивает распознавание определенных колебательных кодонов	ВЭЖХ-МС	нет данных
20	N2,N2-диметилгуанозин	м2,2G	G	тРНК, мРНК	тРНК: п. 10, п. 26 (всегда); мРНК (0,00051% G в S. cerevisiae)	тРНК: играет роль в укладке тРНК и предотвращает принятие тРНК неправильной конформации; мРНК: снижает точность трансляции в зависимости от положения и кодона	PhOxi-seq, ЖХ- MC/MC	нет данных
21	N6-изопентениладенозина	i6A	A	тРНК	тРНК УНН: п. А37 (всегда)	Повышает точность трансляции и эффективность родственных кодонов	Анализ РНА6, ВЭЖХ, Сенгер	нет данных
22	N6- треонилкарбамоиладенозина	тбА	A	тРНК	тРНК ИНС: п. А37 (всегда)	Облегчает спаривание кодон-антикодон и предотвращает сдвиг рамки считывания во время синтеза белка	ЖХ-МС/МС	MERFF, нейродегенерация, диабет
23	3-метилуридин	м3U	U	рРНК, тРНК	рРНК: U1498 (всегда в Е. coli 16S), U2634 U2843 (в S. cerevisiae 25S); тРНК Thr: п.U32 (всегда у Т. brucei)	Неизвестный	MR-FISH, ОФ-ВЭЖХ	нет данных
24	Вайосин	imG	G	тРНК	тРНК Phe: п. 37 (часто)	Стабилизирует кодон- антикодоновые взаимодействия	ВЭЖХ-МС	нет данных

N⁰	Модификация	Код	База	Классы	Местоположение и	Функция	Методы детекции1	Болезни
				РНК	частота			
25					тРНК Ала: п. 37			
	1-метилинозин	m1I	Ι	тРНК	(эукариоты);	Неизвестный	ЖХ-МС/МС	нет данных
					тРНК: п. 57 (археи)			

Примечание - NA – информация не найдена; мРНК – информационная РНК; рРНК – рибосомальная РНК; тРНК – транспортная РНК; микроРНК – микроРНК; lncRNA – длинная некодирующая РНК; snRNA – малая ядерная РНК; snoRNA – малая ядрышковая РНК; эРНК – энхансерная РНК; MT-тРНК – митохондриальная тРНК; scaRNA – малая PHK, специфичная для тела Кахаля; линкРНК – длинная межгенная некодирующая РНК; 5'-UTR – 5'-нетранслируемая область; 3'-UTR – 3'-нетранслируемая область; КДС – кодирующая последовательность; ФМН – флавинмононуклеотид; Dus – дигидроуридсинтаза; ЖХ-МС/МС – жидкостная хроматография-масс-спектрометрия; ОФ-ВЭЖХ – обращенно-фазовая жидкостная хроматография–тандемная масс-спектрометрия; MeRIP-seq — иммунопреципитационное секвенирование метилированной РНК; miCLIP – перекрестное связывание с разрешением отдельных нуклеотидов и иммунопреципитация; PA-m6A-seq секвенирование m6A с помощью фотосшивания; m6A-CLIP – перекрестное связывание и иммунопреципитация с разрешением отдельных нуклеотидов m6A; DRS – прямое секвенирование PHK; ГЦР — гепатоцеллюлярная карцинома; MERFF — миоклоническая эпилепсия с рваными красными волокнами; ЗПА — заболевание периферических артерий; АРИД — аутосомно-рецессивные формы умственной отсталости; ДС — синдром Дубовица.

ПРИЛОЖЕНИЕ Г «Результаты оценки безопасности наноразмерных частиц для доставки лекарств со встроенным активным компонентом»



Приложение Г1. Специфичность

Хроматограмма образца стандарта фосфатидилэтаноламина



Name	Time	Area	Height	Width	Symmetry
Blank	3.419	175	8.3	0.2709	0.378
PE	4.318	14686	775.8	0.2789	0.634

Хроматограмма образца стандарта фосфатидилхолина



PC	21.971	6485.3	80.4	0.9452	0.944
----	--------	--------	------	--------	-------

фосфатидилэтаноламина Модельная стандартов лизофосфатидилхолина, смесь И фосфатидилхолина (образец 1)



•					
Модельная	смесь	стандартов	лизофосфатидилхолина,	фосфатидилэтаноламина	ŀ
фосфатидил	іхолина (об	разец 2)			

7520.5



PC

20.651

98.4

0.9076

1.054



25 5		10	125	15 125	22)	225
Name	Time	Area	Height	Width	Symmetry	
LPC	3.009	444.4	15.1	0.3633	1.515	
Blank	3.478	151.6	6.6	0.2776	0.449	
PE	4.238	1681	51.9	0.4417	0.595	
PC	20.094	7900.9	95.9	0.9711	0.935	





Name	Time	Area	Height	Width	Symmetry
PE	4.359	459.1	25.7	0.2583	0.519
PC	20.718	10497.4	132.7	0.939	1.112

Хроматограмма стандартного образца Lipoid S80 1,8 мг/см³ (образец 2)



Name	Time	Area	Height	Width	Symmetry
PE	4.354	457	25.9	0.2562	0.519
PC	20.706	10474.4	133.1	0.9301	1.104





Хроматограмма фосфолипидных наночастиц 9 мг/см³ партия 1 (образец 2)

Хроматограмма фосфолипидных наночастиц 8,4 мг/см³ партия 2 (образец 1)



Name	Time	Area	Height	Width	Symmetry
PE	4.261	417.5	25.5	0.2451	0.629
PC	20.021	9742.3	130.9	0.8805	1.058

Хроматограмма фосфолипидных наночастиц 8,4 мг/см³ партия 2 (образец 2)



Name	Time	Area	Height	Width	Symmetry
PE	4.299	416.1	24.3	0.2458	0.611
PC	20.114	9813.8	127.8	0.906	0.996

Приложение Г2. Калибровочные уровни





1-я калибровочная серия 2-ой калибровочный уровень PE 40 mkg/ml, PC 250 mkg/ml



Name	Time	Area	Height	Width	Symmetry	Conc.	
PE	4.208	480.3	23.4	0.2913	0.608	36.2	
PC	19.832	2665.2	30.5	1.0338	0.753	232.3	



1-я калибровочная серия

Name	Time	Area	Height	Width	Symmetry	Conc.
PE	4.207	931.9	46.1	0.2977	0.599	83.5
PC	19.816	5412.7	61.9	1.0244	0.771	514.7

1-я калибровочная серия 4-ый калибровочный уровень PE 160 mkg/ml, PC 1000 mkg/ml



1-я калибровочная серия 5-ый калибровочный уровень PE 400 mkg/ml, PC 2500 mkg/ml



1-я калибровочная серия 6-ый калибровочный уровень PE 800 mkg/ml, PC 5000 mkg/ml



2-я калибровочная серия 1-ый калибровочный уровень PE 16 mkg/ml, PC 100 mkg/ml







2-я калибровочная серия 3-ий калибровочный уровень PE 80 mkg/ml, PC 500 mkg/ml



Name	Time	Area	Height	Width	Symmetry	Conc.
PE	4.188	891.6	47.1	0.2666	0.549	88.14
PC	19.756	5773.6	73.6	0.9236	0.863	517.60

2-я калибровочная серия 4-ий калибровочный уровень PE 160 mkg/ml, PC 1000 mkg/ml



PE	4.183	1592.9	85.1	0.2744	0.539	178.67
PC	19.803	10617.5	135	0.9298	0.903	1095.6





2-я калибровочная серия 6-ой калибровочный уровень PE 800 mkg/ml, PC 5000 mkg/ml



3-я калибровочная серия 1-ый калибровочный уровень PE 16 mkg/ml, PC 100 mkg/ml 9.609 n AU 175 Б 33 125 Ð 75 5 25 o க் 75 10 125 1⁄25 'n 1 Name Time Area Height Width Symmetry Conc. PE 4.153 184.7 10.9 0.2278 0.574 18.0 19.609 PC 1116.5 0.8831 0.754 160.1 15

3-я калибровочная серия 2-ой калибровочный уровень PE 40 mkg/ml, PC 250 mkg/ml



3-я калибровочная серия 3-ий калибровочный уровень PE 80 mkg/ml, PC 500 mkg/ml



3-я калибровочная серия 4-ый калибровочный уровень PE 160 mkg/ml, PC 1000 mkg/ml





PE	4.274	3604	119.3	0.4144	0.344	405.47
PC	20.452	16603.7	202.2	1.0000	0.923	2502.50

3-я калибровочная серия 6-ой калибровочный уровень PE 800 mkg/ml, PC 5000 mkg/ml



Приложение ГЗ Прецизионность и правильность




1-я калибровочная серия 1-ый калибровочный уровень_4 PE 16 mkg/ml, PC 100 mkg/ml





1-я калибровочная серия 4-ый калибровочный уровень_1 PE 160 mkg/ml, PC 1000 mkg/ml



1-я калибровочная серия 4-ый калибровочный уровень_2 PE 160 mkg/ml, PC 1000 mkg/ml



1-я калибровочная серия 4-ый калибровочный уровень_3 PE 160 mkg/ml, PC 1000 mkg/ml



1-я калибровочная серия 4-ый калибровочный уровень_4 PE 160 mkg/ml, PC 1000 mkg/ml



1-я калибровочная серия 4-ый калибровочный уровень_5 PE 160 mkg/ml, PC 1000 mkg/ml



1-я калибровочная серия 6-ой калибровочный уровень_1 PE 800 mkg/ml, PC 5000 mkg/ml mAU 500-20.084 4.203 400 300-200--2.576.837 3.459 100-0 $\frac{1}{20}$ 17.5 25 7.5 125 nir 10 Height Width Name Area Symmetry Conc. Time 4.203 6989.8 355 0.2897 0.585 791.37 PE 522.3 PC 20.084 42263 0.972 1.087 4936.8

1-я калибровочная серия 6-ой калибровочный уровень_2 PE 800 mkg/ml, PC 5000 mkg/ml



1-я калибровочная серия 6-ой калибровочный уровень_3 PE 800 mkg/ml, PC 5000 mkg/ml



1-я калибровочная серия 6-ой калибровочный уровень_4 PE 800 mkg/ml, PC 5000 mkg/ml



1-я калибровочная серия 6-ой калибровочный уровень_5 PE 800 mkg/ml, PC 5000 mkg/ml



2-я калибровочная серия 1-ый калибровочный уровень_1 PE 16 mkg/ml, PC 100 mkg/ml





2-я калибровочная серия 1-ый калибровочный уровень_3 PE 16 mkg/ml, PC 100 mkg/ml





2-я калибровочная серия 1-ый калибровочный уровень_5 PE 16 mkg/ml, PC 100 mkg/m



2-я калибровочная серия 4-ый калибровочный уровень_1 PE 160 mkg/ml, PC 1000 mkg/ml mAU 9.803 120 4.183 100 80 ഞ 40 > 2.846 > 3.436 20 0 $\frac{1}{20}$ 25 7.5 10 17.5 Time Height Width Conc. Name Area Symmetry PE 4.183 1592.9 0.2744 0.539 173.74 85.1 PC 19.803 10617.5 135 0.9298 0.903 1147.60

2-я калибровочная серия 4-ый калибровочный уровень_2 PE 160 mkg/ml, PC 1000 mkg/ml



2-я калибровочная серия 4-ый калибровочный уровень_3 PE 160 mkg/ml, PC 1000 mkg/ml



2-я калибровочная серия 4-ый калибровочный уровень_4 PE 160 mkg/ml, PC 1000 mkg/ml



2-я калибровочная серия 4-ый калибровочный уровень_5 PE 160 mkg/ml, PC 1000 mkg/ml



2-я калибровочная серия 6-ый калибровочный уровень_1 PE 800 mkg/ml, PC 5000 mkg/ml



2-я калибровочная серия 6-ый калибровочный уровень_2 PE 800 mkg/ml, PC 5000 mkg/ml



2-я калибровочная серия 6-ый калибровочный уровень_3 PE 800 mkg/ml, PC 5000 mkg/ml



2-я калибровочная серия 6-ый калибровочный уровень_4 PE 800 mkg/ml, PC 5000 mkg/ml



2-я калибровочная серия 6-ый калибровочный уровень_5 PE 800 mkg/ml, PC 5000 mkg/ml





Name	Time	Area	Height	Width	Symmetry	Conc.
PE	4.153	192.2	10.8	0.2495	0.542	18.7
PC	19.609	1085.1	14.5	0.8783	0.859	103.1

3-я калибровочная серия 1-ый калибровочный уровень_2 PE 16 mkg/ml, PC 100 mkg/ml



3-я калибровочная серия 1-ый калибровочный уровень_3 PE 16 mkg/ml, PC 100 mkg/ml



3-я калибровочная серия 1-ый калибровочный уровень_4 PE 16 mkg/ml, PC 100 mkg/ml



3-я калибровочная серия 4-ый калибровочный уровень_1 PE 160 mkg/ml, PC 1000 mkg/ml

3-я калибровочная серия 4-ый калибровочный уровень_3 PE 160 mkg/ml, PC 1000 mkg/ml

3-я калибровочная серия 4-ый калибровочный уровень_5 PE 160 mkg/ml, PC 1000 mkg/ml

3-я калибровочная серия 6-ый калибровочный уровень_2 PE 800 mkg/ml, PC 5000 mkg/ml

3-я калибровочная серия 6-ый калибровочный уровень_3 PE 800 mkg/ml, PC 5000 mkg/ml

3-я калибровочная серия 6-ый калибровочный уровень_4 PE 800 mkg/ml, PC 5000 mkg/ml

3-я калибровочная серия 6-ый калибровочный уровень_5 PE 800 mkg/ml, PC 5000 mkg/ml

Приложение Г4. Кросс-перенос

mAU 8 6 4 2 0					02	
	25 5	7.5	10 12.5	15	17.5 20	22.5 mi
Name	Time	Area	Height	Width	Symmetry	Conc.
PE	4.267	198.3	6.3	0.3789	0.404	15.90
PC	20.198	1084.5	10.4	0.8909	0.841	103.0

Приложение Г5. Стабильность

Хроматограмма стандартного образца Lipoid S80 1,8 мг/см³ (проба 2 – 0 часов) 20,706

Хроматограмма стандартного образца Lipoid S80 1,8 мг/см³ (проба 1 – 15 часов)

Хроматограмма стандартного образца Lipoid S80 1,8 мг/см³ (проба 2 – 15 часов)

Хроматограмма стандартного образца Lipoid S80 1,8 мг/см³ (проба 1 – 92 часа)

Хроматограмма стандартного образца Lipoid S80 1,8 мг/см³ (проба 2 – 92 часа)

Хроматограмма образца фосфолипидных наночастиц 9 мг/см³, партия 1 (проба 1 – 0 часов).

Name	Time	Area	Height	Width	Symmetry	Conc.
PE	4.351	464.4	26	0.2563	0.509	50.0
PC	20.674	10517.7	133.8	0.9228	1.098	1393.8

Хроматограмма образца фосфолипидных наночастиц 9 мг/см³, партия 1 (проба 2 – 0 часов).

Хроматограмма образца фосфолипидных наночастиц 8,4 мг/см³, партия 2 (проба 1 – 0 часов).

Хроматограмма образца фосфолипидных наночастиц 8,4 мг/см³, партия 2 (проба 2 – 0 часов).

Хроматограмма образца фосфолипидных наночастиц 9 мг/см³, партия 1 (проба 2 – 15 часов).

Хроматограмма образца фосфолипидных наночастиц 8,4 мг/см³, партия 2 (проба 1 – 15 часов).

Хроматограмма образца фосфолипидных наночастиц 9 мг/см³, партия 1 (проба 1 – 92 часа).

Приложение Г6. Паспорт наноразмерных частиц для доставки лекарств до

включения активных компонентов, с характеристиками полученными с

помощью классических аналитических методов

АНАЛИТИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ № _4_/100

от «29» ноября 2021 г.

НАНОРАЗМЕРНЫЕ ЧАСТИЦЫ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ БЕЗ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ

Номер серии

112021

Количество флаконов/пакетиков-саше

Дата выпуска Срок годности 29.11.2021

Испытания проведены по

Протоколу

N⁰	Показатели	Метолы	Нормы	Результаты
п/п			1	испытаний
1	2	3	4	5
1.	Описание	Визуальный	Лиофилизированная	Лиофилизиро
			масса от белого до	ванная масса
			светло-желтого цвета	светло-желто-
				го цвета
2.	Время	Методика ИБМХ	Содержимое флакона/	Содержимое
	растворения		пакетика саше должно	флакона
			растворяться в 10 мл	растворяется
			воды очищенной не	за 3 минуты
			более чем за 5 минут	
2	Роло		На балаа 5.0.9/	2.76
5.	Вода	$10^{1} + 0^{$	11e 00nee 5,0 70	3,70
		«Определение волы»		
		(метол К. Фишера) Не		
		более 5,0 % 1,76		
4.	Прозрачность	Спектрофотометрический	Светопропускание	60,77 <u>+</u> 0,21%
		метод.	раствора содержимого	
		Методика ИБМХ	флакона в 10 мл воды	
			очищенной при 660 нм	
			должно быть от 60 до	
			85 %.	
5.	pН	ΓΦ ΡΦ ΧΙΥ	От 6,0 до 7,5	6,48 <u>+</u> 0,04
		ОФС.1.2.1.0004.15		
		«Ионометрия»		
		(потенциометрический		
	0	метод)	II 40	02
6.	Степень	ВЭЖХ	Не менее 48 часов	92 часа
	агрегации			
	(стаоильность			

	раствора)			
7.	Размер частиц	Фотонная корреляционная спектроскопия. Метолика ИБМХ	Размер частиц должен находиться в диапазоне	$46,93\pm1,65$ (99,21±0,25%)
		методика прил	01 15 <u>d</u> 0 50 mm.)
8.	Родственные	ВЭЖХ	Не более 6 %.	1%
	фосфолипиды			
	(лизофосфа-			
	тидилхолин)			
9.	Количествен-	ВЭЖХ	Фосфатидилхолина во	
	ное определе-		флаконе	
	ние фосфати-		447-525 мг/фл/пакетик	506 мг
	дилхолина			
10.	Срок		3 года	
	годности			

Заключение:

Уполномоченное лицо: Должность/Подпись/Расшифровка подписи

Печать

Дата: «____»____202__ г.

АНАЛИТИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ № _4_/80

от «17» сентября 2021 г.

НАНОРАЗМЕРНЫЕ ЧАСТИЦЫ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ БЕЗ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ

Номер серии 092021 Количество флаконов/пакетиков-саше Дата выпуска 17.09.2021 Срок годности Испытания проведены по Протоколу Результаты Показатели Методы Нормы испытаний 2 3 4 5 0

№

п/п

1

1.	Описание	Визуальный	Лиофилизированная масса от белого до светло-желтого цвета	Лиофилизирс ванная масса светло-желто го цвета
2.	Время растворения	Методика ИБМХ	Содержимое флакона/ пакетика саше должно растворяться в 10 мл воды очищенной не более чем за 5 минут	Содержимое флакона растворяется за 3 минуты
3.	Вода	ГФ РФ XIV ОФС.1.2.3.0002.15 «Определение воды» (метод К. Фишера) Не более 5,0 % 1,76	Не более 5,0 %	3,21
4.	Прозрачность	Спектрофотометрический метод. Методика ИБМХ	Светопропускание раствора содержимого флакона в 10 мл воды очищенной при 660 нм должно быть от 60 до 85 %.	71,14 <u>+</u> 0,19%
5.	рН	ГФ РФ XIV ОФС.1.2.1.0004.15 «Ионометрия» (потенциометрический метод)	От 6,0 до 7,5	6,53 <u>+</u> 0,03
6.	Степень агрегации (стабильность раствора)	ВЭЖХ	Не менее 48 часов	92 часа
7.	Размер частиш	Фотонная корреляционная	Размер частиц должен	26,73+0.84

		спектроскопия.	находиться в диапазоне	(99,23+0,06%
		Методика ИБМХ	от 15 до 50 нм.)
8.	Родственные	ВЭЖХ	Не более 6 %.	1%
	фосфолипиды			
	(лизофосфа-			
	тидилхолин)			
9.	Количествен-	ВЭЖХ	Фосфатидилхолина во	
	ное определе-		флаконе/пакетике	
	ние фосфати-		328-434 мг/фл/пакетик	370 мг/фл.
	дилхолина			
10.	Срок		3 года	
	годности			

Заключение:

Уполномоченное лицо: Должность/Подпись/Расшифровка подписи

Печать

Дата: «___»____202__ г.

Приложение Г7. Паспорт наноразмерных частиц для доставки лекарств со

встроенным активным компонентом противовирусного действия

АНАЛИТИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ №1

Композиция ФОСФОФЕНОВИР

от « 16 » декабря 2022 г.

	Номер серии			010322		
	Количество ф.	лаконов/пакетиков-саше		1100		
	Дата выпуска		1	9.03.2022		
	Срок годности	1		2 года		
	Испытания пр	оведены по	Π	Проекту НД		
N⁰	Показатели	Метолы	Нормы	Результаты		
п/п			I	испытаний		
1	2	3	4	5		
1.	Описание	Визуальный	Лиофилизированная	Лиофилизиро		
			масса от белого до	ванная масса		
			светло-желтого цвета.	светло-		
				желтого		
	5			цвета		
2.	Время	Методика ИБМХ	Содержимое пакетика	Содержимое		
	растворения		саше должно	пакетика		
			растворяться в воде	растворяется		
			очищенной не облее	за 4 минуты		
2	Прорранности	Снактрафатаматринаакий	Чем за 5 минут	84.04		
5.	прозрачность	Спектрофотометрический		04,04		
		метод. Методика ИБМХ	физиона в 10 ми воли			
		Методика и БМА	очищенной при 660 нм			
			лопжно быть от 60 до			
			85 %.			
4.	Размер частиц	Фотонная корреляционная	Размер частиц должен	5,89		
	-	спектроскопия.	быть менее 50 нм.	(99,17%		
		Методика ИБМХ		частиц)		
5.	Процент	ВЭЖХ		99,13		
	включения					
	умифеновира					
6.	Содержание	ВЭЖХ	50 мг <u>+ 2</u> ,5	47,73 мг		
	умифеновира					
	на пакетик-					
	came					
7	рH	ΓΦ ΡΦ ΧΙΥ	От 6.0 то 7.5	62		
/.	pn	$O\Phi C = 12 + 0004 + 15$	01 0,0 до 7,5	0,2		
		«Ионометрия»				
		(потенииометрический				
		метол)				
8.	Родственные	ВЭЖХ	Не более 6 %.	4%		

	фосфолипиды (лизофосфа-			
	тидилхолин)			
9.	Вода	ΓΦ ΡΦ ΧΙV	Не более 5,0 %	3,2
		ОФС.1.2.3.0002.15		
		«Определение воды»		
		(метод К. Фишера)		
10.	Количествен-	Ферментативный метод	От 0,470 до 0,520 г	0,486
	ное определе-	Методика Липоид ГмбХ	фосфатидилхолина во	
	ние фосфати-		флаконе.	
	дилхолина			
11.	Срок		2 года	соответствует
	годности			

Заключение: Препарат Фосфофеновир соответствует проекту НД по перечисленным показателям.

Заведующий лаборатории фосфолипидных нанолекарств и транспортных систем, к.х.н. _____ Тихонова Е.Г.

Печать

Дата: «16» декабря 2022 г.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ БИОМЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ ИМЕНИ В.Н.ОРЕХОВИЧА» (ИБМХ)

АНАЛИТИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ №1

Композиция ФОСФОФЕНОВИР

от « 17 » декабря 2022 г.

	Номер серии			010322	
	Количество фл	лаконов/пакетиков-саше		1100	
	Дата выпуска			19.03.2022	
	Срок годности	1		2 гола	
	Испытания пр	оведены по	Π	роекту НД	
No	Показатели	Метолы	Нормы	Результаты	
п/п				испытаний	
1	2	3	4	5	
1.	Описание	Визуальный	Лиофилизированная	Лиофилизиро	
			масса от белого до	ванная масса	
			светло-желтого цвета	светло-	
				желтого	
				цвета	
2.	Время	Методика ИБМХ	Содержимое пакетика	Содержимое	
	растворения		саше должно	пакетика	
			растворяться в воде	растворяется	
			очищенной не более	за 2,5 мин.	
-		~ 1	чем за 5 минут		
3.	Прозрачность	Спектрофотометрический	Светопропускание	77,3	
		метод.	раствора содержимого		
			флакона в 10 мл воды		
			очищенной при 660 нм		
			должно оыть от оо до 95 %		
Δ	Размер частиц	Фотонная корреляционная	ол 70. Размер частиц полжен	5.98	
т.	тазмер пастиц	спектроскопия	быть менее 50 нм	(99.41%	
		enexipeexemin.		частин)	
5.	Процент	ВЭЖХ		99,10	
	включения			,	
	умифеновира				
6.	Содержание	ВЭЖХ	50 мг <u>+</u> 2,5	47,61 мг	
	умифеновира				
	на пакетик-				
	саше				
1	2	3	4	5	
7.	рН	ГФ РФ XIV ОФС.1.2.1.0004.15 «Ионометрия» (потенциометрический метод)	От 6,0 до 7,5	6,3	
-----	--	--	--	---------------	
8.	Родственные фосфолипиды (лизофосфати -дилхолин)	ВЭЖХ	Не более 6 %.	5%	
9.	Вода	ГФ РФ XIV ОФС.1.2.3.0002.15 «Определение воды» (метод К. Фишера)	Не более 4,0 %	2,9	
10.	Количествен- ное определе- ние фосфати- дилхолина	Ферментативный метод Методика Липоид ГмбХ	От 0,470 до 0,520 г фосфатидилхолина во флаконе.	0,498	
11.	Срок годности		2 года	соответствует	

Заключение: Препарат Фосфофеновир соответствует проекту НД по перечисленным показателям.

Заведующий лаборатории фосфолипидных нанолекарств и транспортных систем, к.х.н. _____ Тихонова Е.Г.

Печать

Дата: «17» декабря 2022 г.

ПРИЛОЖЕНИЕ Д «Подготовка данных транскриптомных исследований»

Приложение Д.1 Интервальные таблицы.

(а) хромосома 18 человека

Интервал		all samples			HepG2			Huh7			Liver	
значений ТРМ	n	score	ref	n	score	ref	n	score	ref	n	score	ref
[0.001:0.1]	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0
[0.101:1.0]	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	1	6,6	5
[1.001:5.0]	2	106,9	38	6	79,2	63	6	72,5	83	29	245,6	289
[5.001:10.0]	0	0,0	0	1	9,0	14	2	8,5	22	7	47,6	57
[10.001:50.0]	7	182,5	32	14	189,9	59	25	180,7	145	62	442,6	396
[50.001:100.0]	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0
[100.001:500.0]	0	0,0	0	2	31,6	24	4	35,8	18	12	84,1	81
[500.001:1000.0]	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0
1000+	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	1	4,8	15
Сумма:	9	289,4	70	23	309,6	160	37	297,5	268	112	831,2	843

(б) случайная выборка генов

Интервал		all samples			HepG2			Huh7			Liver	
значений ТРМ	n	score	ref	n	score	ref	n	score	ref	n	score	ref
[0.001:0.1]	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0
[0.101:1.0]	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	2	1,0	25
[1.001:5.0]	0	0,0	0	1	1,2	5	15	14,0	117	33	29,8	262
[5.001:10.0]	0	0,0	0	0	0,0	0	3	1,8	26	8	6,8	64
[10.001:50.0]	7	29 <mark>,</mark> 6	56	19	28,3	135	24	23,8	143	94	108,2	483
[50.001:100.0]	0	0,0	0	1	1,8	4	5	5,6	28	11	11,6	69
[100.001:500.0]	1	3,7	3	3	4,5	13	3	2,4	12	27	36,0	103
[500.001:1000.0]	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0
1000+	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	2	1,5	9
Сумма:	8	33,3	59	24	35,7	157	50	47,5	326	177	194,8	1015

(в-1) Lizunator (симуляция), запуск 1

Интервал	â	all samples	10.0		HepG2	12		Huh7	12.1		Liver	
значений ТРМ	n	score	ref	n	score	ref	n	score	ref	n	score	ref
[0.001:0.1]	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0
[0.101:1.0]	0	0,0	0	0	0,0	0	56	13,1	1306	0	0,0	0
[1.001:5.0]	15	9,5	696	121	57,6	2866	329	116,8	5525	410	144,9	6862
[5.001:10.0]	2	0,8	109	30	9,9	1037	153	43,6	2984	122	38,2	2418
[10.001:50.0]	46	37,1	1797	281	149,4	5719	897	401,1	12642	408	145,1	6739
[50.001:100.0]	0	0,0	0	4	0,6	222	45	11,9	855	5	1,6	121
[100.001:500.0]	0	0,0	0	0	0,0	0	15	3,7	387	8	1,9	247
[500.001:1000.0]	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0
1000+	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0
Сумма:	63	47,5	2602	436	217,5	9844	1495	590,2	23699	953	331,7	16387

(в-2) Lizunator (симуляция), запуск 2

Интервал	ā	all samples			HepG2			Huh7			Liver	
значений ТРМ	n	score	ref	n	score	ref	n	score	ref	n	score	ref
[0.001:0.1]	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0
[0.101:1.0]	0	0,0	0	0	0,0	0	62	15,1	1462	0	0,0	0
[1.001:5.0]	19	12,8	936	127	54,1	3341	370	131,5	6080	426	157,1	6861
[5.001:10.0]	3	1,1	263	23	7,1	856	132	38,6	2580	142	42,6	2776
[10.001:50.0]	49	39,9	1824	270	137,1	5807	865	387,4	12160	410	153,8	6509
[50.001:100.0]	0	0,0	0	7	2,4	169	43	10,0	1008	7	1,1	276
[100.001:500.0]	0	0,0	0	1	0,2	39	27	4,8	859	7	1,3	197
[500.001:1000.0]	0	0,0	0	0	0,0	0	1	0,1	31	0	0,0	0
1000+	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0
Сумма:	71	53,7	3023	428	200,9	10212	1500	587,6	24180	992	355,9	16619

(в-3) Lizunator (симуляция), запуск 3

Интервал	a	all samples			HepG2			Huh7			Liver	
значений ТРМ	n	score	ref	n	score	ref	n	score	ref	n	score	ref
[0.001:0.1]	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0
[0.101:1.0]	0	0,0	0	0	0,0	0	63	20,3	1269	0	0,0	0
[1.001:5.0]	23	15,4	1014	138	58,1	3526	387	137,2	6394	386	142,0	6401
[5.001:10.0]	4	1,6	274	32	9,0	1061	148	44,7	2956	121	35,6	2561
[10.001:50.0]	48	37,8	1889	259	137,3	5440	915	410,4	12767	417	156,0	6670
[50.001:100.0]	0	0,0	0	3	0,4	212	40	10,0	880	10	2,4	374
[100.001:500.0]	0	0,0	0	2	0,2	126	19	3,9	520	7	1,4	216
[500.001:1000.0]	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0
1000+	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0
Сумма:	75	54,8	3177	434	205,0	10365	1572	626,5	24786	941	337,5	16222

Приложение Д.2 Выборка фармакогенов, отвечающих за 1-ю и 2-ю вторую фазы метаболизма лекарств. По каждому гену указано сумма значений ТПМ для слайсвариантов, соответствующих этому гену. Для семейства Р450 приведены исходные (несуммированные) данные.

		CYP1							CYP	2							CY	′P 3	
	CYP1A1	CYP1A2	CYP1B1	CYP2S1	CYP2A6	CYP2A7	CYP2B6	CYP2C18	CYP2C19	CYP2C8	CYP2C9	CYP2E1	CYP2D6	CYP2J2	CYP2R1	СҮРЗА4	CYP3A43	СҮРЗА5	CYP3A7
									Знач	ение Т	РM								
Hep_1	7.7			10.8												1.5			6.2
Hep 2	12.2			17.7															7.7
Hep_3	2.4			5.5										4.3		1.2	1.2	1.2 2.4	4.9
Hep_4	8.4			17.8									0.9	6.9					
Hep_5	9.2			17.7														1.2 1.7	0.9
Huh_1	140		19.8	9.0			5.4	0.9	0.9		1.8			7.2	8.1			0.9 3.6	
Huh 2	36.0 105.7	0.6	9.1	3.2				0.6			1.3				2.2			3.9	
Huh_3	80.2 44.7		6.3	3.1	0.6		1.2	1.2						7.4	3.1			2.5	
Liver_1	5.2	169.3	3.7		572.0	33.6 105.3	406.8	98.3	25.0	358.9 413.7	167.1 703.7	1974.7 2346.3	23.7 160.8	65.4	2.2	23.5 53.0 918.2	0.7	17.0 35.7 46.9	11.8
Liver_3		68.9	9.8		1334.0	6.3 491.6	220.1	104.4	17.8	321.3 334.3	51.4 313.8	400.9 1921.8	8.0 59.3	128.0		8.4 11.9 184.5		27.5 43.3	
Liver_5	98.9	486.2	1.5		255.3	7.1 47.9	183.0	44.0	177.2	147.9 354.0 415.1	116.6 335.3	1155.6 1348.9	50.9	80.1	6.0	12.8 525.8 898.6	4.5	15.1 46.3 69.1	10.6

		Алн	оголь-дегид	оогеназы					Альде	гид-дегидро	еназы			Эпоксид	-гидролазы
	ADH1A	ADH1B	ADH1C	ADH4	ADH5	ADH6	ALDH1A1	ALDH2	ALDH3A1	ALDH3A2	ALDH4A1	ALDH5A1	ALDH6A1	EPHX1	EPHX2
								Значение TP	M						
HepG2_1	0	0	0	46,3	148,2	35,5	148,2	73,8	0	40,4	146,7	24,7	9,3	83,3	9,3
HepG2_2	0	0	0	38,9	143,3	41,1	141,3	125,6	0	69,3	152,2	31,1	5,6	86,7	12,2
HepG2_3	0	0,6	0	62,2	433,2	67,8	294,6	140,2	0,6	146,2	213,7	42,4	30,1	109,4	32,6
HepG2_4	0	0	0	47,4	252,1	42,9	518,4	159,6	0	100,6	218	41,7	13,5	144	22,2
HepG2_5	0	0	0	41,6	262,9	44,6	506,2	130,9	1,2	100,2	219	41,7	13,9	149,1	24,8
Huh7_1	0	0	2,7	0	170,4	2,7	1050,3	103	0	79,4	33,2	28	1,8	99,5	19
Huh7_2	0	0	0	0	224,1	5,2	991,8	136,5	0	76,8	25,5	22,9	9,8	77	22,2
Huh7_3	0,6	0	0	0	207,8	2,5	963,8	149,5	0	87,3	37,3	19	3,2	79	27,7
Liver_donor1	1185,9	4892,1	1049,9	2027,2	201,1	414,9	769	1404,8	0,7	96,9	204,1	102,8	261,7	1276,1	233,3
Liver_donor5	1034,2	3830,8	474,6	1621,5	153,5	358,6	831,2	1033,3	0	140,5	198,7	108,6	255,9	873,4	145,9
Liver_donor3	413,7	1943,3	1198	1364,7	180,1	173,4	677,8	1190	0	96,9	177,3	84,7	139,9	1614,1	291,6
							Глутатион-S	-трансферазь	ы						Гистамин-N- метилтранс фераза

	GSTA1	GSTA2	GSTA4	GSTK1	GSTM1	GSTM2	GSTM3	GSTM4	GSTM5	GSTO1	GSTO2	GSTP1	GSTT2	GSTZ1	HNMT
								Значение TP	м						
HepG2_1	40	1,6	0	37	0	1,5	55,6	10,8	0	134,4	1,5	0	0	13,9	245,1
HepG2_2	48,8	3,3	0	42,2	0	3,3	61,1	9,9	0	140,9	0	0	0	23,3	211
HepG2_3	217,6	14,2	25,5	71,9	0	4,9	90,7	24,9	0	438,6	3,7	0	0	28,9	255,6
HepG2_4	190,2	21,8	12,8	55,1	0	5,5	104,9	28,7	0	440,1	3	0	0	24,7	196,6
HepG2_5	177,2	21,7	13,2	72,2	0	7,5	86	28	0	447,7	1,2	0	0	15	184,6
Huh7_1	29,8	13,1	19,9	64,1	32,1	4,6	94,9	21,1	0	656,2	4,5	3233,4	0	19,9	54,1
Huh7_2	7,8	8,5	19,9	96,5	37,9	12,6	120,4	25,9	0	632,3	1,8	2497,6	0	12,4	71,9
Huh7_3	11,4	12,6	20,8	114,5	54	6,9	106,7	28,1	0	605,3	3,8	2508,5	0	13,9	78,8
Liver_donor1	4517,8	110,3	3,7	160,3	0	3,2	0,7	9,3	0	383	0	4,1	29,6	159,4	104,7
Liver_donor5	2443,6	252,9	0	182,9	0	1,5	0	22,8	4,6	389,2	6,1	20,1	0	98,3	110,4
Liver_donor3	2949,8	92,1	0	296,8	0	0	7,9	11,8	0	423,6	3,9	11,8	0	122,8	90,6

	UGT1A1	UGT1A10	UGT1A4	UGT1A6	UGT1A7	UGT1A8	UGT1A9	UGT2A1	UGT2B10	UGT2B11	UGT2B15	UGT2B17	UGT2B28	UGT2B7	UGT8
								Значение Tl	РМ						
HepG2_1	0	0	0	0	0	0	0	0	169,4	15,9	0	0	0	57	0
HepG2_2	0	0	0	0	0	0	0	0	136,7	22,2	0	0	0	47,8	0
HepG2_3	3,6	0	0	0	0	0	0	0	194,7	10,1	0	1,8	0	35,3	0
HepG2_4	4,8	0	1	0	0	0	2,1	0	102,9	6,4	0	0	0	53,4	0
HepG2_5	4,3	0	0	1,5	0	0	1	0	98,8	6,4	0,6	0,6	0	60,1	0
Huh7_1	9,2	0	0	0	0	0	0	2,7	0	12,7	4,5	1,8	0	6,3	9,9
Huh7_2	2	0	3,2	0	0	0	0	0,7	0	3,8	3,3	1,3	0,7	1,3	3,9
Huh7_3	2,3	0	0	0	0	0	0	0,6	0	4,4	2,5	2,5	0	2,5	3,2
Liver_donor1	24,6	0	150,8	35,6	0	84	47,1	3	618,7	3,6	481,3	4,5	0,7	1090,3	0
Liver_donor5	100,6	0	107,3	0	84,9	95,4	0	4,6	368,4	1,5	393,3	116	3,1	731,7	0
Liver_donor3	58,1	79,1	136,9	99,8	0	0	97,1	7,9	365,7	5,9	275,8	0	2	802	0

	Карбонил-р	едуктазы	Катехол-О- метилтран сфераза	Гидроксист ероиддеги дрогеназа	Моноамино азы	ооксид				Сульфотра	нсферазы				Альдегид- оксидаза
	CBR1	CBR3	COMT	HSD11B2	MAOA	MAOB	SULT1A1	SULT1A2	SULT1A3	SULT1B1	SULT1C2	SULT1C4	SULT1E1	SULT2A1	AOX1
								Значение ТР	м						
HepG2_1	44,8	0	166,8	7,7	0	20,1	91,4	37,6	44	3,3	3,1	1,5	1,5	111,2	15,4
HepG2_2	28,9	0	185,5	6,7	22,2	26,7	104,7	29,9	48,4	2,2	4,4	0	3,3	102,2	13,3
HepG2_3	46,7	0	171	9,8	28,9	37,5	208,3	66,6	141,3	0	1,8	1,8	1,8	343,2	14,1
HepG2_4	49,3	0	188,2	3	15,8	28,6	207,7	69,6	160,5	0,6	4,4	1	0,5	155,3	8,9
HepG2_5	41,6	0	175,7	7,5	16,2	23,1	201	76,2	184,4	1,9	5,8	1,7	0,6	150,3	13,9
Huh7_1	60,6	0	57,9	1,8	9	60,6	10,8	3,1	14,5	0	5,4	13,6	0	20,8	11,8
Huh7_2	52,2	0,7	75,5	7,2	12,4	46,4	0	7,8	8,3	1,1	3,9	9,8	0	19,6	9,2
Huh7_3	39,1	0	86,6	3,2	10,1	57,4	10,9	6,6	8,5	0	2,5	8,8	1,3	29,7	5,7
Liver_donor1	128,6	0	188,6	6,7	139,7	187,8	74,5	33,9	0	18,2	0	0	18,5	435,5	690,3
Liver_donor5	91,2	0	169,5	1,5	118,5	158	61,9	5,3	0	15,6	0	0	18,2	565,3	784,7
Liver_donor3	165,5	0	740	0	120,1	128,1	151,2	22,4	0	17,6	0	0	29,6	183,2	340,2

Приложение Д.3 Гистограммы распределения уровня экспрессии фармакогенов: «пики» для фармакогенов печени.



Распределение фармакогенов с уровнем экспрессии TPM > 0 в разных образцах. По оси x – TPM, а по y – частота. Большинство генов оказалось в промежутке от 0 до 500, но также были и отдельные выбросы, с TPM 5000 (APOA2), 6000 и 7000 (ALB). Но в печени представлено больше генов, имеющих экстремально высокие значения TPM – 12000 (APOA2), а также пик на 10000, что отличает печень от клеточных линий.

ПРИЛОЖЕНИЕ Е «Проект СОП во изменение СОП версии 1.0»

(см. версию отчета за 2021 год)

1.Область применения

Обработка метаболомных данных.

2. Участники процесса

Лаборанты, лаборанты-исследователи, студенты.

3. Нормативные ссылки

Руководство пользователя программы MetaboAnalystR (пакет языка R);

Руководство пользователя программы MALDIquant (пакет языка R).

4. Оснащение

На локальной машине должен быть установлен OpenConnectGUI или Cisco Anyconnect.

Данные должны быть предоставлены в формате .d;

Версия языка R – 4.1.2 (2021-11-01) -- "Bird Hippie";

Версия MetaboAnalystR – 3.2.0;

Версия MALDIquant – 1.21;

Версия MALDIquantForeign – 0.13;

Версия MSConvert – 3.0.21334-00с4b77;

Версия WinSCP – 5.19.2 (сборка 11614);

Виртуальная машина на платформе Intel Ice Lake, 16 CPUs, 32 GB RAM, 100 GB дополнительного диска для хранения данных;

Полученные данные хранить на диске Fox в папке Z:\IT Avogadro\Mетаболом в tsvформате.

5. Порядок выполнения процедуры/работ:

1) Зайти на одну из виртуальных машин 192.168.8.161, 192.168.8.101, 192.168.8.181. Пароли от машин в приложении к СОП. Внести в 1 строку Формы протокола «Вход на виртуальную машину ИБМХ».

2) Зайти на диск Fox в папку «MetaboData». Проверить наличие файлов .d. Определить их количество и суммарный объем. Заполнить 2 и 3 строки Формы протокола.

3) В поиске на панели управления найти MSConvert и открыть.

4) Нажать на кнопку Browse, удерживая ctrl выбрать все файлы в директории Z:\MetaboData\. Файлы автоматически добавятся в окно снизу. Если этого не произошло, то нужно нажать кнопку Add. В разделе Options в выпадающем списке Output format выбрать формат mzML.

5) Выставить значение 8 в Files to convert in parallel.

6) Определить количество файлов .mzML и их объём. Результат внести в 4 строку Формы протокола.

7) В поиске найти WinSCP и открыть его.

8) Открыть браузер, ввести ссылку https://cloud.yandex.ru/, нажать кнопку "Подключиться", находящейся на верхней панели рядом с аватаром пользователя. Ввести данные из файла credentials.txt, расположенного на рабочем столе удаленной машины, в соответствующие поля. Зайти в раздел Compute Cloud, найти машину metabolomics. Выбрать машину флажком. На всплывшей внизу синей строке выбрать "Запустить". После того как в столбце Статус напротив выбранной машины появится надпись «Running», можно перейти к следующему этапу.

9) Создать новое подключение в WinSCP. В графу Имя хоста вбить Публичный IPv4 виртуальной машины metabolomics, в графу имя пользователя вбить anna, нажать на кнопку Ещё. В окне расширенных настроек в графе SSH найти опцию «Аутентификация», нажать на нее, в графу Файл закрытого ключа при помощи кнопки Browse добавить ключ – idrsaa.ppk. Публичный IPv4 виртуальной машины можно увидеть в строке с выбранной машиной в колонке Публичный IPv4.

10) В открывшемся окне на удаленной виртуальной машине перейти в папку /home/rsuser/MetData и создать новую директорию Analysis {date}.

11) Перейти в созданную директорию. Выделить все сконвертированные mzML файлы в Z:\MetaboData и перенести в новую директорию на виртуальной машине Analysis{date}.

12) Скопировать Публичный IPv4, открыть браузер на локальной машине. Сформировать запрос: {Публичный IPv4}:8787. Откроется страница аутентификации RStudio. В графу логин вбить rsuser, пароль – 12345678.

13) Перейти в скрипт – DIMSProcess.R. Справа от переменной pth в кавычках указать путь к файлам и запустить скрипт. В строку 6 Формы протокола внести время склеивания спектров из вывода консоли RStudio. Перейти в папку /home/rsuser/MetData/Analysis{date}/Combined_Spectra/, определить количество combined_*.mzML файлов и их объем и внести в 7 строку Формы протокола. Из вывода консоли RStudio записать количество пиков в 8 строку Формы протокола.

14) Перейти в скрипт getMatchedCompound.R, указать путь до файла InputData.csv, занести его в 9 строку Формы протокола и запустить скрипт. Вывод консоли после «PerformPSEA» занести в строку 10 Формы протокола. В строку 11 указать объем файла mumInputData.csv.

584

15) Установить рабочую директорию /home/rsuser/MetData/Analysis{date}/InputData/.

16) Перейти в терминал RStudio. Поменять директорию на /home/rsuser/ и запустить скрипт forMapping.py с указанием пути до файла mumInputData.csv. В строку 12 Формы протокола внести вывод скрипта forMapping.py в терминал.

Пример команды: python3 forMapping.py "/home/rsuser/MetData/Analysis{date}/mumInputData.csv"

17) Проверить наличие файла forConvert.txt в директории /home/rsuser/. При помощи RStudio скачать файл: выбрать файл, в разделе Files выбрать последовательно More, Export, Download.

18)Вбраузереоткрытьстраницупоадресу:https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/upload/ConvertView.xhtml,загрузитьforConvert.txt, нажать кнопку Submit. После конвертации скачать файл namemap.csv.

19) При помощи RStudio загрузить файл в директорию /home/rsuser/ файл name_map.csv: нажать Upload, выбрать файл name_map.csv.

20) В терминале RStudio запустить скрипт InputForAnalytics.py с указанием пути до файла name_map.csv. Пример команды:

python3 InputForAnalytics.py "/home/rsuser/name_map.csv".

Время выполнения скрипта и список Uniprot ID, к генам которых не найден ENSG, из терминала скопировать в 13 строку Формы протокола. Там же указать объем файла InputDB.csv.

21) Полученный файл InputDB.csv скачать в папку Z:\IT Avogadro\Mетаболом при помощи RStudio: выбрать файл, в разделе Files выбрать последовательно More, Export, Download.

22) Удалить папку Analysis{date}, файлы forConvert.txt, name_map.csv, InputDB.csv с виртуальной машины.

23) Выключить виртуальную машину: выбрать metabolomics, во всплывшем синем окне внизу выбрать "Остановить".

6. Форма протокола испытания метаболомного СОП.

Форма протокола от 01.08.2022

Оператор: ФИО

Дата: ДД.ММ.ГГ

Вход на виртуальную Выполнено/Не выполнено

машину ИБМХ

Расположение папки со Z:\MetaboData\ входными данными

Количество файлов .d и	N файлов, V КВ МВ GВ
их объём	
Количество файлов	N файлов, V KB MB GB
.mzML и их объём	
Время «склеивания»	N минут
спектров	
Количество combined	N файлов, V KB MB GB
файлов .mzML и их объём	
Количество найденных	N пиков
пиков	
Путь к файлу	/home/rsuser/MetData/Analysis{date}/
InputData.tsv	
Объем InputData.tsv	V KB MB GB
PerformPSEA	Вывод команды в консоль RStudio
Объем	V KB MB GB
mumInputData.tsv	
forMapping.py	File is ready for name conversion
InputForAnalytics.py	Время выполнения
	Объём файла InputDB.tsv
	Список Uniprot ID, к генам которых не найден
ENS	SG