

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

№ госрегистрации 124082200061-2

УДК 61:577.1



ОТЧЕТ

о выполненных научно-исследовательских работах по проекту:

«Влияние соединений, обладающих геропротективными свойствами, на единичные
биомакромолекулы, модельные объекты и организм человека»

(промежуточный)

Этап 1 (2024 год)

Ведомственный проект

«Развитие институтов грантовой поддержки исследователей, научных и
творческих коллективов» государственной программы Российской Федерации
«Научно-технологическое развитие Российской Федерации»

Соглашение о предоставлении из федерального бюджета гранта в форме
субсидии от 12 июля 2024 г. № 075-15-2024-643
(внутренний номер 13.1902.24.46)

Руководитель проекта,

научный руководитель ИБМХ, академик РАН

 А.И. Арчаков
«30» января 2025 г.

Москва 2025

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

Главный научный сотрудник,
д-р биол. наук

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

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

Заведующий лабораторией,
главный научный сотрудник

Заведующий лабораторией,
главный научный сотрудник

Заведующий лабораторией,
главный научный сотрудник

Заведующий лабораторией,
главный научный сотрудник

Заведующий лабораторией,
главный научный сотрудник

Заведующий лабораторией,
главный научный сотрудник

Заведующий лабораторией,
ведущий научный сотрудник

 28.01.25
подпись, дата

А.И. Арчаков
(разделы 1-16)

 27.01.25
подпись, дата

А.В. Лисица
(разделы 1-16)

 27.01.25
подпись, дата

Е.А. Пономаренко
(разделы 1-16)

 27.01.25
подпись, дата

Т.О. Плешакова
(разделы 1-16)

 27.01.2025
подпись, дата

Ю.А. Ромашова
(разделы 4, 6)

 27.01.25
подпись, дата

В.В. Поройков
(разделы 4, 6)

 27.01.25
подпись, дата

К.Н. Ярыгин
(раздел 16)

 27.01.2025
подпись, дата

П.Г. Лохов
(разделы 4, 13)

 27.01.25
подпись, дата

А.С. Иванов
(раздел 4)

 27.01.25
подпись, дата

Ю.Д. Иванов
(раздел 2)

 27.01.25
подпись, дата

В.Г. Згода
(разделы 8, 10-12)

 27.01.25
подпись, дата

Е.В. Ильгисонис
(раздел 9)

Заведующий лабораторией,
ведущий научный сотрудник


подпись, дата 27.01.25

Е.В. Поверенная
(разделы 13, 14)

Главный научный сотрудник


подпись, дата 27.01.25

С.С. Маркин
(раздел 4)

Ведущий научный сотрудник


подпись, дата 27.01.25

А.А. Гилеп
(раздел 4)

Ведущий научный сотрудник


подпись, дата 27.01.25

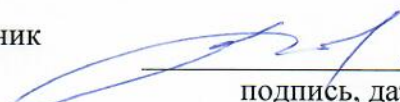
О.В. Тихонова
(разделы 8, 10-12)

Ведущий научный сотрудник


подпись, дата 30.01.25

М.А. Пятницкий
(раздел 9)

Ведущий научный сотрудник


подпись, дата 27.01.25

А.Л. Русанов
(раздел 16)

Ведущий научный сотрудник


подпись, дата 27.01.25

А.Ю. Лупатов
(раздел 16)

Старший научный сотрудник


подпись, дата 27.01.25

Д.С. Дружиловский
(раздел 6)

Старший научный сотрудник


подпись, дата 27.01.25

Т.Е. Фарафонова
(разделы 4, 8, 10-12)

Старший научный сотрудник


подпись, дата 27.01.25

С.В. Иванов
(раздел 4)

Старший научный сотрудник


подпись, дата 27.01.25

О.П. Трифонова
(разделы 4, 13)

Старший научный сотрудник


подпись, дата 27.01.25

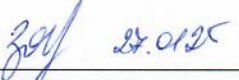
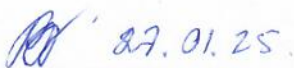
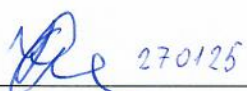
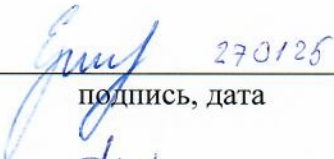
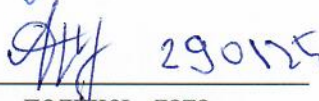
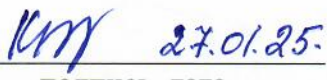
Е.Е. Балашова
(разделы 4, 13)

Старший научный сотрудник


подпись, дата 27.01.25

О.И. Киселева
(разделы 13, 14)

Старший научный сотрудник	 29.01.25 подпись, дата	Е.О. Яблоков (раздел 4)
Старший научный сотрудник	 27.01.25 подпись, дата	Л.А. Калужский (раздел 4)
Старший научный сотрудник	 27.01.25 подпись, дата	И.В. Вахрушев (раздел 16)
Научный сотрудник	 27.01.25 подпись, дата	С.В. Краевский (раздел 1)
Научный сотрудник	 27.01.25 подпись, дата	Д.Л. Маслов (разделы 4, 13)
Научный сотрудник	 29.01.25 подпись, дата	С.Е. Новикова (разделы 8, 10-12)
Младший научный сотрудник	 27.01.25 подпись, дата	И.А. Иванова (раздел 1)
Младший научный сотрудник	 27.01.25 подпись, дата	Н.А. Соловьева (разделы 8, 10-12)
Младший научный сотрудник	 27.01.25 подпись, дата	А.А. Валуева (раздел 1)
Младший научный сотрудник	 27.01.25 подпись, дата	А.В. Колесниченко (раздел 1)
Младший научный сотрудник	 27.01.25 подпись, дата	И.А. Рязанцев (раздел 1)
Младший научный сотрудник	 27.01.25 подпись, дата	Л.А. Столбов (разделы 6)
Младший научный сотрудник	 27.01.25 подпись, дата	А.В. Виноградова (раздел 2)

Младший научный сотрудник	 27.01.25 подпись, дата	Е.Д. Неведрова (раздел 2)
Младший научный сотрудник	 29.01.25 подпись, дата	Л.И. Казиева (разделы 8, 10-12)
Младший научный сотрудник	 27.01.25 подпись, дата	Н.А. Вавилов (разделы 8, 10-12)
Младший научный сотрудник	 27.01.25 подпись, дата	Е.В. Сарыгина (раздел 9)
Младший научный сотрудник	 27.01.25 подпись, дата	Е.С. Зорина (раздел 9)
Младший научный сотрудник	 30.01.25. подпись, дата	Д.Д. Ромашин (раздел 16)
Младший научный сотрудник, аспирант	 30.01.25. подпись, дата	И.Ю. Курбатов (разделы 13, 14)
Младший научный сотрудник, аспирант	 27.01.25. подпись, дата	В.А. Арзуманян (разделы 13, 14)
Младший научный сотрудник, аспирант	 27.01.25 подпись, дата	А.С. Козлова (раздел 9)
Младший научный сотрудник, аспирант	 27.01.25 подпись, дата	М.О. Ершова (раздел 1)
Младший научный сотрудник, аспирант	 29.01.25 подпись, дата	А.Х. Тальдаев (раздел 1)
Лаборант	 27.01.25. подпись, дата	П.А. Крюкова (разделы 13, 14)
Лаборант	 27.01.25 подпись, дата	Е.А. Столбова (раздел 6)

Лаборант	 _____	С.В. Тарбеева (раздел 9)
	подпись, дата	
Лаборант-исследователь	 _____	Т.В. Бондаренко (раздел 4)
	подпись, дата	
Начальник производственного участка	 _____	Е.Г. Тихонова (раздел 4)
	подпись, дата	
Специалист по регистрации лекарственных средств	 _____	Р.В. Графов (раздел 4)
	подпись, дата	
Уполномоченное лицо по фармаконадзору	 _____	Н.Е. Лебедева (раздел 4)
	подпись, дата	
Ведущий инженер	 _____	А.Н. Аблеев (раздел 2)
	подпись, дата	
Ведущий инженер	 _____	А.Ф. Козлов (раздел 2)
	подпись, дата	
Технолог	 _____	Ф.Н. Бедретдинов (раздел 4)
	подпись, дата	
Оператор	 _____	А.А. Арчаков (раздел 4)
	подпись, дата	
Нормоконтроль	 _____	С.М. Бутинина
	подпись, дата	

РЕФЕРАТ

Отчёт содержит 542 страниц, 136 рисунков, 65 таблиц, 17 приложений.

Ключевые слова: ЕДИНИЧНЫЕ БИОМАКРОМОЛЕКУЛЫ, ФОСФОЛИПИДНЫЕ ЛЕКАРСТВА, ПОСТГЕНОМНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ, БИОЛОГИЧЕСКИЙ ВОЗРАСТ, КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ, ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ДНК, БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЧАСЫ.

Цель проекта: разработка методологии оценки функциональной активности единичных объектов и потенциальных геропротективных соединений для выявления молекулярных основ возраст-зависимых процессов в организме человека и разработки системы определения биологического возраста.

Задачи проекта:

1. Разработка технологии оценки функциональной активности единичных биомакромолекул с помощью молекулярных детекторов, включающей методические, инструментальные и программные решения, необходимые для наблюдения за свойствами единичных молекул ферментов в условиях их функционирования.
2. Выбор, создание и характеристика соединений и композиций, способствующих значимому увеличению продолжительности функциональной активности биологических систем.
3. Масштабное профилирование биологических образцов с целью определения молекулярных показателей, имеющих потенциал применения в системах оценки биологического возраста.
4. Разработка предсказательной модели для оценки биологического возраста.

При выполнении первого этапа работ получены основные результаты, описанные ниже.

Получены результаты АСМ-визуализации модельного белка – пероксидазы хрена (ПХ) в условиях ферментной активности, включающие: сведения об олигомерном состоянии белка; рекомендации по выбору объектов наблюдения на поверхности; референсные значения уровней шума измеряемых сигналов. Показано, что белок сорбирован на поверхности преимущественно в мономерной форме, доступность активного центра сорбированного фермента подтверждена методами молекулярной динамики. По результатам визуализации с высоким разрешением

выбраны параметры (латеральные размеры и высоты) объектов, которые могут рассматриваться как характеристические для целевых объектов при наблюдении за ферментной активностью отдельных молекул белка.

Разработана принципиальная схема нанопорового детектора, как основы системы регистрации функциональной активности фермента, включая электронные блоки для измерения сигнала, конструкцию ячейки для аналита, программное обеспечение для работы на нанопоровом детекторе, методику встраивания белка в нанопору. Работоспособность предложенного решения доказана на примере регистрации функциональной активности фермента цитохрома P450 BM3.

Получены генетические конструкции, проведена экспрессия мутантных ферментов, определены кинетические параметры для стабильного модельного цитохрома P450BM3 как мишени для проверки действия эффекторов. Проведено культивирование штаммов E.coli – продуцентов исходного гибридного фермента NPseFDH-P450BM3 и слитого белка с новой мутантной NPseFDH. Полученные данные свидетельствуют, что введение в исходную NPseFDH трех замен K383A/K395Q/K397Q предотвращает гидролиз нового гибридного фермента под действием примесных протеаз, что свидетельствует о его стабильности.

Выбраны модельные объекты для оценки эффективности геропротективных свойств соединений. На основе имеющегося в ИБМХ задела по разработке фосфолипидных препаратов и оценке возможности использования фосфолипидных препаратов в исследованиях *in vitro* и *in vivo* препарат Витафосфолип™ выбран как потенциальное геропротективное соединение, влияющее на липидом крови, а следовательно, и атеросклеротические поражения. Определены характеристики животных моделей, выбранных для изучения атеросклеротических поражений в разных возрастных группах и оценки эффективности геропротективных свойств на основе фосфолипидов.

Получен набор полноатомных трехмерных структур мишеней для белка ORF2p – потенциальной мишени для воздействия терапевтических средств. На основе анализа литературных источников выявлена активность белка ORF2p при процессах, нарастающих с возрастом. Построены полноатомные модели фермента ORF2p и его комплексов с РНК, с ДНК и тройного комплекса с тимидинтрифосфатом и гетеродуплексом РНК и ДНК. Для всех четырех моделей

был сделан расчет молекулярно-динамической траектории в 500 нс.

Получены валидированные модели зависимостей «структура - геропротекторная активность». Для получения результата проведен анализ современного состояния исследований фармакологических подходов к геропротекции, определены основные механизмы геропротекторного действия лекарственных соединений. Из источников, содержащих агрегированные сведения по потенциальным геропротекторам, извлечены данные, необходимые для подготовки обучающих выборок с целью построения зависимостей «структура – геропротекторная активность» на основе методов машинного обучения. Выполнена предварительная обработка информации по структуре и биологической активности потенциальных геропротекторов согласно применяемым при моделировании (Q)SAR требованиям, и сформированы обучающие выборки. С помощью программы PASS построены модели (Q)SAR зависимостей на основе обучающих выборок, содержащих информацию из базы данных DrugAge по геропротекторным свойствам соединений, исследованных на модельных организмах. С использованием программы Sarmath на основе самосогласованного экстремального классификатора построены модели зависимостей «структура – сенолитическая активность». Реализована специализированная версия PASS GERO, позволяющая осуществлять прогноз 115 видов биологической активности, связанных с обсуждаемыми в литературе механизмами геропротекторного действия. Валидация построенных моделей зависимостей «структура – геропротекторная активность» позволила прийти к выводу об их удовлетворительном качестве, что позволяет использовать эти модели для поиска новых потенциальных геропротекторов.

Сформирована часть первая коллекции биоматериала для выявления молекулярных основ возраст-зависимых процессов в организме человека и разработки системы определения биологического возраста, включающая 150 биологических образцов (плазма крови) с аннотированными данными (доступны на платформе «Биовитрина» по адресу <https://bb.ibmc.msk.ru/Main/Home>). Каждый образец содержит следующую информацию: barcode, ID донора, тип биоматериала, пол, возраст, рост, вес, ИМТ, доступный объем, клинический партнер.

Разработаны протоколы роботизированной пробоподготовки образцов для протеомного анализа в формате 96 луночного планшета, протокол для

ультракоротких методов панорамного протеомного анализа и протокол биоинформатической обработки данных панорамного протеомного анализа. Для 25 образцов протеомный анализ включал в себя роботизированную пробоподготовку с использованием разработанного Протокола для солюбилизации белков образца и их расщепления трипсином в растворе.

На основании анализа литературы и данных публичных репозиториев определен перечень из 2227 белков, важных для диагностики заболеваний, связанных с возрастными изменениями. Впервые показано, что среди потенциальных белков-маркеров старения выявляются часто обнаруживаемые белки - неспецифичные маркеры системных нарушений и белки, одобренные FDA в качестве пригодных для использования в клинической практике.

Проведен синтез и очистка 49 пептидных стандартов с присоединением одного изотопно-меченого аминокислотного остатка. Степень чистоты определялась при помощи ВЭЖХ и составляет от 95,3 до 99,9 %, определение концентрации синтезированных пептидов осуществлялось при помощи аминокислотного анализа, а количество каждого синтезированного пептидного стандарта составляет не менее 100 мкг и находятся в диапазоне от 100,1 до 478,7 мкг.

Разработан протокол анализа концентрации белков в плазме крови человека, предназначенный для проведения измерений с использованием хромато-масс-спектрометра типа тройной квадруполь с хроматографическим разделением.

Проведен направленный масс-спектрометрический анализ 24 образцов плазмы крови людей различных возрастных групп в соответствии с разработанным Протоколом. В результате работ получен перечень детектированных белков с указанием их концентраций в каждом образце. Первичные данные MRM для перечня белков загружены в репозиторий PeptideAtlas через PASSEL и доступны по идентификатору (код эксперимента) PASS05901 (Username: PASS05901, Password: MU244ch).

По результатам анализа литературы и метаболомных репозиториев составлен перечень метаболитов, важных для диагностики социально значимых заболеваний и/или заболеваний, связанных с возрастными изменениями, доступных к детекции подходами на основе ЯМР, жидкостной хроматографии и газовой хроматографии с последующим масс-спектрометрическим анализом. Для составления перечня

перспективных метаболитов, ассоциированных с протеканием возрастзависимых патологий проведены работы по унификации наименования низкомолекулярных соединений.

Разработан Протокол оценки общего содержания метаболитов в образце, адаптированный к анализу больших серий биологических образцов. Следование Протоколу обеспечивает контроль качества проведения преаналитических стадий и оценку воспроизводимости экспериментов с помощью стандартных соединений, экстракцию низкомолекулярных соединений из целевых биологических образцов и их преаналитическую подготовку, рациональное использование ресурсов, формирование полуколичественных профилей метаболомов исследуемых образцов, формирование собственной библиотеки хромато-масс-спектров коровых низкомолекулярных соединений, циркулирующих в плазме крови человека.

Разработан протокол пробоподготовки для анализа внеклеточной ДНК, включая протокол анализа данных на присутствие 5-метил-цитозина, 6-метиладенина, 5-гидроксиметилцитозина, эффективность которого доказана при нанопоровом секвенировании модельной фрагментированной геномной ДНК, имитирующих вкДНК из плазмы крови. Экспериментально подтверждена возможность изучения фрагмента вкДНК путем нанопорового секвенирования. Сделаны рекомендации о количестве подготовленных образцов на один запуск секвенатора. Разработан и протестирован протокол секвенирования и обработки данных. Показано, что этот протокол позволяет проводить анализ распределения длин фрагментов – фрагмента вкДНК. Протокол позволяет идентифицировать фрагменты малых размеров от 50 п.н.

Разработан протокол получения *in vitro* модели старения мезенхимальных стволовых клеток (МСК) человека путём их обработки с помощью 400 мкМ H_2O_2 в течение 24 ч.

По результатам работ за отчётный период опубликовано 12 публикации и одна публикация принята в печать, также подготовлена к защите диссертация.

Работы выполнены в полном объеме в соответствии с ПП и ТЗ проекта.

СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ	12
ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	18
ВВЕДЕНИЕ	22
1.РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЕДИНИЧНОЙ МОЛЕКУЛЫ ФЕРМЕНТА ПО АСМ-ДАНЫМ: ПОДБОР УСЛОВИЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ МОДЕЛЬНОГО БЕЛКА, РЕКОНСТРУКЦИЯ ФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ МОДЕЛЬНОГО БЕЛКА НА ПОВЕРХНОСТИ.....	31
1.1. Подбор условий иммобилизации модельного белка ПХ на поверхность для визуализации в жидкости	33
1.1.1. Сорбция белка на поверхность из растворов с различной концентрацией...	33
1.1.2. Характеристика иммобилизованного белка с помощью радиальной функции распределения.....	35
1.1.3. Визуализация иммобилизованного белка при АСМ сканировании с высоким разрешением.....	37
1.2. Моделирование сорбции белка на поверхность	40
1.3. Подбор условий реконструкции ферментной системы для АСМ на основе данных спектрофотометрии	50
1.3.1. Результаты спектрофотометрических измерений.....	50
1.3.2. Определение параметров каталитической реакции.....	52
1.4. АСМ-визуализация ПХ в условиях функционирования	53
1.5. Разработка алгоритма обработки АСМ-данных для определения функциональных свойств	55
1.5.1. Анализ литературных данных по применению АСМ для исследования ферментных систем.....	56
1.5.2. Алгоритм обработки данных, полученных с помощью АСМ Dimension с функцией NanoTrack™.....	59
1.6. Разработка Протокола оценки функциональной активности единичной молекулы фермента по АСМ-данным для случая модельного объекта	63
1.7. Заключение к Разделу 1.....	66
2.РАЗРАБОТКА ПРОГРАММНО-ТЕХНИЧЕСКИХ РЕШЕНИЙ ДЛЯ СИСТЕМЫ РЕГИСТРАЦИИ ФЕРМЕНТНОЙ АКТИВНОСТИ С ПОМОЩЬЮ НАНОПОРОВОГО ДЕТЕКТОРА.....	67
2.1. Нанопоровый детектор как инструмент для исследования единичных молекул ферментов.....	67
2.2. Разработка электронных блоков для измерения сигнала	70
2.2.1. Обоснование принципа проектирования электронно-измерительной части нанопорового детектора.....	70
2.2.2. Принципиальная схема электронно-измерительной части нанопорового детектора.....	71
2.2.3. Выбор элементной базы и расчет шумовых параметров.....	72
2.2.4. Анализ шума входной эквивалентной схемы.....	74
2.2.5. Анализ обратной связи измерительной схемы с резистивной обратной связью.....	78
2.2.6. Измерение малых токов с использованием резистивной обратной связи...	80
2.3. Разработка конструкции ячейки для анализа	85

2.4. Описание схемы нанопорового детектора, как основы системы регистрации функциональной активности фермента	86
2.5. Программное обеспечение для работы на нанопоровом детекторе	86
2.6. Разработка методики встраивания белка в нанопору	88
2.7. Заключение к Разделу 2.....	89
3.СОЗДАНИЕ КОНСТРУКЦИИ ГИБРИДНОГО ЦИТОХРОМА P450 BM3 С ФДГ, УСТОЙЧИВОГО К ДЕЙСТВИЮ КОМПОНЕНТОВ КРОВИ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ КАНДИДАТНЫХ МОЛЕКУЛ ЭФФЕКТОРОВ	91
3.1. Построение структуры полноразмерной rt-PseFDH.....	92
3.2. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей форматдегидрогеназ из других источников.....	97
3.3. Выбор замен для стабилизации С-конца PseFDH.....	99
3.4. Анализ структуры мутантных PseFDH.....	100
3.5. Конструирование праймеров для проведения направленного мутагенеза с помощью ПЦР.....	102
3.6. Получение генетических конструкций с мутантными NPseFDH.....	103
3.7. Экспрессия и очистка препаратов рекомбинантных ферментов.....	104
3.8. Анализ чистоты полученных препаратов рекомбинантных ферментов.....	106
3.9. Получение и очистка гибридного фермента NPseFDH-P450_BM3 с новой мутантной NPseFDH_K383A/K395Q /K397Q.....	109
3.10.Заключение к Разделу 3.....	112
4.ВЫБОР МОДЕЛЬНОГО ОБЪЕКТА ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ГЕРОПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ СОЕДИНЕНИЙ	115
4.1. Модельные организмы в исследованиях старения: эволюция аннотаций баз данных и открытие ортологов.....	118
4.1.1. <i>Drosophila melanogaster</i>	133
4.1.2. Нематоды <i>Caenorhabditis elegans</i>	135
4.1.2.1. Генетические и геномные особенности <i>C. Elegans</i>	137
4.1.2.2. Продолжительность жизни у <i>C. Elegans</i>	138
4.1.3. <i>Danio rerio</i>	138
4.1.3.1. Возрастное изменение метаболизма <i>Danio rerio</i>	141
4.1.3.2. Старение организма <i>Danio rerio</i>	143
4.1.3.3. Исследование нарушений липидного обмена у <i>Danio rerio</i>	144
4.1.4. Мыши	148
4.1.4.1. Когнитивные и поведенческие нарушения у стареющих мышей. Их связь с нарушениями у человека.....	150
4.1.5. Исследование метаболизма у мышей.....	153
4.1.6. Кролики.....	156
4.2. Роль фосфолипидов в продлении активного долголетия	160
4.3. Разработка протоколов оценки количественного содержания компонентов липидных наночастиц (и композиций на их основе) во фракциях крови человека.....	163
4.3.1. Обоснование методологии, применяемой для решения научной задачи...164	
4.3.1.1. Биохимический анализ основных характеристик крови.....164	
4.3.1.2. Фракционирование плазмы/сыворотки крови с помощью высокоэффективной гель-хроматографии и ультрацентрифугирования.....164	
4.3.1.3. Выделение теней эритроцитов.....165	
4.3.2. Полученные результаты.....166	

4.3.2.1. Адаптация протоколов стандартных наборов ферментативного анализа белков и липидов в сыворотке крови для биохимического анализа в компонентах крови (сыворотка, плазма, фракции липопротеинов, лизат мембран эритроцитов).....	166
4.3.2.2. Фракционирование липопротеинов крови (ультрацентрифугирование, высокоэффективная гель-хроматография).....	169
4.3.2.3. Разработка протокола получения лизата мембран эритроцитов и оценка возможности его использования для комплексного анализа белков и липидов.....	172
4.3.3. Масс-спектрометрическое исследование препарата Витафосфолип®.....	176
4.3.3.1. Материалы и методы.....	177
4.3.3.2. Результаты.....	179
4.3.3.2.1. Масс-спектрометрический анализ препарата Витафосфолип®.....	179
4.3.3.2.2. Детекция эндогенных фосфатидилхолинов и сопутствующих метаболитов в плазме крови.....	180
4.3.3.2.3. Изменение интенсивности пиков основных фосфатидилхолинов, содержащихся в препарате Витафосфолип®, при разных концентрациях препарата в образце плазмы крови.....	183
4.4. Заключение к Разделу 4.....	188
5.ОТБОР МИШЕНЕЙ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ПРОЦЕССОВ СТАРЕНИЯ, ПРИГОДНЫХ ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕГО МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ	191
5.1. Получение набора данных о внутриклеточных мишенях белковой природы и нацеленных на них известных антивозрастных агентах.....	191
5.2. Получение набора данных о природных и синтетических соединениях, способных воздействовать на процессы, происходящие при нейродегенеративных заболеваниях, с указанием конкретных мишеней.....	192
5.3. Результаты расчётов классических молекулярно-динамических траекторий для выбранной модели ORF2p.....	208
5.4. Заключение к Разделу 5.....	212
6.ФОРМИРОВАНИЕ НАБОРОВ ДАННЫХ ПО ИЗВЕСТНЫМ ГЕРОПРОТЕКТОРАМ, ПОСТРОЕНИЕ МОДЕЛЕЙ ЗАВИСИМОСТЕЙ «СТРУКТУРА - ГЕРОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ» НА ОСНОВЕ МЕТОДОВ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ И ИХ ВАЛИДАЦИЯ.....	214
6.1. Формирование наборов данных по известным геропротекторам.....	216
6.1.1. Выборка референтных соединений.....	216
6.1.2. Подготовка обучающей выборки на основе информации из базы данных DrugAge.....	220
6.1.3. Подготовка обучающей выборки на основе информации о сенолитаках	224
6.2. Построение моделей (Q)SAR на основе обучающей выборки по геропротекторной активности для модельных организмов	225
6.3. Построение моделей (Q)SAR с использованием обучающих выборок, содержащих информацию о сенолитаках.....	230
6.4. Разработка специализированной версии программы PASS GERO	233
6.5. Заключение к Разделу 6.....	252
7.СБОР БИОМАТЕРИАЛА (И СОПУТСТВУЮЩЕЙ ДЕТАЛЬНОЙ КЛИНИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ) 900 ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП: 18-44 ГОДА (МОЛОДОЙ ВОЗРАСТ), 45-59 ЛЕТ	

(СРЕДНИЙ ВОЗРАСТ), 60-74 ГОДА (ПОЖИЛОЙ ВОЗРАСТ), 75-90 ЛЕТ (СТАРЧЕСКИЙ ВОЗРАСТ), БОЛЕЕ 90 ЛЕТ - ДОЛГОЖИТЕЛИ И ПЕРЕДАЧА ОБРАЗЦОВ В ГОЛОВНУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА (ЧАСТЬ 1).....	254
7.1. Формирование коллекции биоматериала	254
7.2. Размещение образцов в биобанке ИБМХ и сопроводительной информации в системе «Биовитрина»	261
8.ПРОВЕДЕНИЕ ПАНОРАМНОГО ПРОТЕОМНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ 50% ОБРАЗЦОВ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ УЛЬТРАКОРОТКИХ ГРАДИЕНТОВ	263
8.1. Разработка протокола роботизированной пробоподготовки образцов для протеомного анализа в формате 96 луночного планшета	263
8.2. Разработка протокола для ультракоротких методов панорамного протеомного анализа.....	263
8.3. Разработка протокола биоинформатической обработки данных панорамного протеомного анализа	266
8.4. Заключение к Разделу 8.....	266
9.ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ БЕЛКОВ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ АНАЛИЗА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ДОНОРОВ РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП	268
9.1. Материалы и методы	270
9.2. Результаты и обсуждение	272
9.2.1. Протеомные часы старения.....	272
9.2.2. Наиболее часто встречающиеся белки, ассоциированные со старением и развитием возраст-зависимых заболеваний.....	273
9.2.3. Формирование панели белков для количественного МС-анализа.....	275
9.3. Заключение к Разделу 9.....	281
10.ПОЛУЧЕНИЕ ПЕПТИДНЫХ СТАНДАРТОВ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОГО МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ	283
10.1. Методика	284
10.2. Результаты	285
10.3. Заключение к Разделу 10	288
11.РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА АНАЛИЗА КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ.....	289
11.1. Заключение к Разделу 11	290
12.НАПРАВЛЕННЫЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НЕ МЕНЕЕ 15% ОБРАЗЦОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЛЮДЕЙ РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП В СООТВЕТСТВИИ С РАЗРАБОТАННЫМ ПРОТОКОЛОМ	291
12.1. Методика направленного масс-спектрометрического анализа в режиме мониторинга множественных реакций (MRM/SIS)	292
12.1.1. Биологический материал.....	292
12.1.2. Пробоподготовка к масс-спектрометрическому анализу.....	292
12.1.3. Твердофазный синтез изотопно-меченных пептидных стандартов.....	292
12.1.4. Направленный масс-спектрометрический анализ образцов плазмы крови людей различных возрастных групп в соответствии с разработанным протоколом.....	293
12.1.5. Биоинформатический анализ.....	294

12.2. Результаты направленного масс-спектрометрического анализа в режиме мониторинга множественных реакций (MRM/SIS)	294
12.3. Заключение к разделу 12.....	303
13.ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ МЕТАБОЛИТОВ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ АНАЛИЗА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ДОНОРОВ РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП, ДОСТУПНЫХ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ РАЗНЫМИ МЕТАБОЛОМНЫМИ ПОДХОДАМИ	305
13.1. Получение научного задела для создания метаболических часов на основе прямой масс-спектрометрии.....	305
13.2. Особенности изменений метаболома человека в ходе процессов, ассоциированных со старением	307
13.3. Метаболомные маркеры заболеваний, ассоциированных со старением	309
13.4. Базы данных, содержащих информацию о метаболитах и других биомолекулах, связанных со старением	313
13.5. Формирование перечня метаболитов, перспективных для анализа в плазме крови доноров разных возрастных групп	314
13.6. Заключение к Разделу 13	315
14.РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА (МЕТОДИКИ) ОЦЕНКИ ОБЩЕГО СОДЕРЖАНИЯ МЕТАБОЛИТОВ В ОБРАЗЦЕ ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕЙ НОРМИРОВКИ ПРИ СОПОСТАВЛЕНИИ ОБРАЗЦОВ.....	317
15.ТЕСТОВОЕ НАНОПОРОВОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ (ВК)ДНК - ПОДБОР УСЛОВИЙ ПРОБОПОДГОТОВКИ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК И ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА, АНАЛИЗ ДАННЫХ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФРАГМЕНТОМА И МЕТИЛОМА	320
16.РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА ПОЛУЧЕНИЯ IN VITRO МОДЕЛИ СТАРЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК (МСК) ЧЕЛОВЕКА	323
16.1. Материалы и методы.	324
16.1.1. Культивирование МСК.....	324
16.1.2. Дифференцировка МСК.....	325
16.1.3. Исследование иммунофенотипа МСК методом проточной цитофлуориметрии.....	325
16.1.4. Протокол индукции клеточного старения.....	326
16.1.5. Исследование морфологии и аутофлуоресценции стареющих МСК.....	326
16.1.6. Оценка уровня активности β -галактозидазы.....	327
16.1.7. Исследование уровня АФК в стареющих МСК (иммунофлуоресцентное окрашивание).	328
16.1.8. Оценка прогрессии клеточного цикла (ПЦР-РВ).....	329
16.1.9. Исследование количества колониеобразующих единиц (КОЕ).....	329
16.1.10.Исследование профиля секретируемых стареющими клетками молекул с помощью иммуноферментного анализа (ИФА).....	330
16.1.11.Исследование влияния гипоксического preconditionирования МСК на терапевтические эффекты в отношении клеточной модели болезни Альцгеймера.....	330
16.1.12.Статистический анализ.....	332
16.2. Результаты и обсуждение.	332
16.2.1. Характеристика МСК.....	332

16.2.2. Моделирование стресс-индуцированного старения МСК в условиях <i>in vitro</i>	334
16.2.3. Исследование морфологии и аутофлуоресценции стареющих МСК.....	337
16.2.4. Оценка уровня активности β -галактозидазы.	338
16.2.5. Исследование уровня АФК в стареющих МСК (иммунофлуоресцентное окрашивание).....	341
16.2.6. Оценка прогрессии клеточного цикла в стареющих МСК (ПЦР-РВ).	343
16.2.7. Исследование количества колониеобразующих единиц (КОЕ) в стареющих МСК.....	344
16.2.8. Исследование профиля секретируемых стареющими МСК молекул с помощью ИФА.....	346
16.2.9. Исследование терапевтических эффектов КС от МСК в отношении возраст-ассоциированных заболеваний (влияние на поляризацию макрофагов).....	348
16.2.10. Протокол <i>in vitro</i> моделирования старения МСК человека.....	353
16.3. Заключение к Разделу 16	353
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	354
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	357
ПРИЛОЖЕНИЕ А	398
ПРИЛОЖЕНИЕ Б	408
ПРИЛОЖЕНИЕ В	410
ПРИЛОЖЕНИЕ Г	415
ПРИЛОЖЕНИЕ Д	426
ПРИЛОЖЕНИЕ Е	431
ПРИЛОЖЕНИЕ Ж	432
ПРИЛОЖЕНИЕ И	442
ПРИЛОЖЕНИЕ К	452
ПРИЛОЖЕНИЕ Л.....	457
ПРИЛОЖЕНИЕ М.....	460
ПРИЛОЖЕНИЕ Н	463
ПРИЛОЖЕНИЕ О.	488
ПРИЛОЖЕНИЕ П	499
ПРИЛОЖЕНИЕ Р	503
ПРИЛОЖЕНИЕ С	524
ПРИЛОЖЕНИЕ Т	536

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

(Q)SAR – Quantitative Structure-Activity Relationships ((количественные) зависимости структура-активность)

AUC – Area Under the Curve (площадь под кривой оперативной характеристики)

BA – Balanced Accuracy (сбалансированная точность)

BCA – бицинхоновая кислота

cCM – кондиционная среда от интактных МСК

CD – кластер дифференцировки

CDK – циклинзависимая киназа

CM-H2DCFDA – хлорметилпроизводное 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетата

CoCl₂ – хлорид кобальта

DCF – дихлорфлуоресцеин

DDR – ответ на повреждение ДНК

EBD – electron beam drilling – электронно-лучевое сверление

FBS – фетальная телячья сыворотка

FDA – Food Drug Administration, регулирующий орган США

FSC – параметр прямого светорассеяния

GO – от англ. GeneOntology, категории базы данных

hCM – кондиционная среда от гипоксически прекондиционированных МСК

HIF-1 – фактор, индуцируемый гипоксией 1

HLA-DR – антиген второго класса гистосовместимости

HPPP – от англ. Human Plasma Proteome Project, проект, направленный на исследование протеома плазмы человека

IAP – Invariant Accuracy of Prediction (инвариантная точность прогноза)

IL – интерлейкин

ISCT – Международное общество клеточной и генной терапии

LPS – липополисахарид

MCP-1 – моноцитарный хемотаксический белок 1

MEM – минимальная среда Игла

MRC1 – маннозный рецептор C-типа 1

Olink – технология детекции белков, при которой пары антител, меченные ДНК-олигонуклеотидами, связывают целевой антиген в растворе, обеспечивая гибридизацию и удлинение с помощью ДНК-полимеразы.

one-way ANOVA – однофакторный дисперсионный анализ

PASS – Prediction of Activity Spectra for Substances (программа для предсказания спектров биологической активности химических соединений)

PBS – фосфатно-солевой буфер

PMA – форбол-12-миристат-13-ацетата

PRIDE – от англ. PRoteomics IDentifications Database, протеомная база данных

Sarmath – программа для построения классификационных моделей зависимостей «структура-активность» применением самосогласованного экстремального классификатора

SASP – секреторный фенотип стареющих клеток

SA- β -gal – β -галактозидаза, ассоциированная со старением

SA- β -gal⁺ – клетки с детектируемой SA- β -gal активностью

SEM – стандартная ошибка среднего

SMILES – Simplified Molecular Input Line Entry System (спецификация однозначного описания состава и структуры молекулы химического вещества с использованием строки символов)

SomaScan – протеомный метод, основанный на использовании аптамеров (молекул ДНК/РНК)

SRM atlas – протеомная база данных экспериментов на основе мониторинга выбранных/множественных реакций (SRM/MRM)

SRM/MRM – мониторинг выбранных/множественных реакций (selected/multiple reaction monitoring, SRM/MRM)

SSC – параметр бокового светорассеяния

TGFB1 – трансформирующий фактор роста β

THP-1 – клетки острого моноцитарного лейкоза человека

TNF- α – фактор некроза опухоли α

two-way ANOVA – двухфакторный дисперсионный анализ

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

X-gal – 5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактопиранозид

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

АФК – активные формы кислорода

АЧХ – амплитудно-частотная характеристика

БД – база данных

БКГ – белок-кодирующий ген

гипМСК – МСК раннего пассажа ($p < 3$), прекондиционированные CoCl_2

гипМСК+ – МСК раннего пассажа ($p < 3$), прекондиционированные/ CoCl_2 и обработанные H_2O_2

ДМОГ – диметилноксалоилглицин

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНФ – 2,4-динитрофенол

ДФО – дефероксамин

ЖХ-МС/МС - жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией

ИФА – иммуноферментный анализ

КОЕ – количество колониеобразующих единиц

КС – кондиционная среда

КС – культуральная среда

М0 – интактные макрофаги, дифференцированные из THP-1

М1 – провоспалительный фенотип макрофагов

М2 – противовоспалительный фенотип макрофагов

МС – масс-спектрометрия, масс-спектрометрический

МСК – мезенхимальные стромальные/стволовые клетки

МСК ПП – МСК позднего пассажа ($p > 10$)

МСК РП – МСК раннего пассажа ($p < 3$)

МСК+ – МСК раннего пассажа ($p < 3$), обработанные H_2O_2

ОП – оптическая плотность

ОУ – операционный усилитель

ПГ – план-график

Протеом – набор белков

ПХ – пероксидаза хрена

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – ПЦР в реальном времени

СВЧ – сверхвысокочастотный частотный диапазон длин волн

ТЗ – техническое задание

УКВ – ультракоротковолновый диапазон

ВВЕДЕНИЕ

Одним из главных достижений медико-биологических наук является устойчивый рост продолжительности жизни населения. За последнее столетие был пройден путь от отсутствия стран с ожидаемой продолжительностью жизни более 50 лет до более чем 40 стран с ожидаемой продолжительностью жизни, превышающей 80 лет [1]. Население мира продолжает расти, причем лица старше 65 лет являются самой быстрорастущей возрастной группой. В 2019 году каждый одиннадцатый человек в мире старше 65 лет. В некоторых регионах к 2050 году каждый четвертый человек будет старше 65 лет.

Старение является ключевым фактором риска множественных расстройств. Увеличение хронологического возраста, как правило, сопровождается несколькими факторами, которые ухудшают качество жизни. Пожилые люди имеют более высокий риск и распространенность онкологических, сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний [2]. Известно, что во время старения страдают когнитивные функции – около 40% людей в возрасте 65 лет и старше страдают от той или иной формы потери памяти [3,4]. Несколько исследований показали, что легкие когнитивные нарушения затрагивают приблизительно 16% людей старше 70 лет; около 14% людей в той же возрастной группе страдают деменцией [5,6], у 15-20% пациентов с когнитивными нарушениями одновременно развивается деменция [6,7]. Важно отметить, что пожилые люди сталкиваются с трудностями в выполнении повседневных дел и демонстрируют ухудшение состояния с возрастом даже при отсутствии заболеваний [8,9]. Пожилые пациенты с когнитивными нарушениями более склонны к частым госпитализациям по сравнению с пациентами с неповрежденной когнитивной функцией [9]. Эти люди также сталкиваются с повышенным риском неблагоприятных исходов во время пребывания в больнице [10,11].

Существует несколько теорий, пытающихся объяснить процесс старения, но все они являются дискуссионными [12,13]. Известно, что на протяжении старения наблюдается хронический окислительный стресс, вызванный дисбалансом между выработкой свободных радикалов и антиоксидантной защитой, что способствует функциональному ухудшению организма [14].

Одним из фактов, связанных со старением, является ухудшение

функционирования иммунной системы, которая претерпевает ряд изменений, известных как иммуностарение, что приводит к повышенной уязвимости к инфекциям и опухолям [15]. Иммунная функция является важным маркером здоровья. Было показано, что по изменениям в иммунных функциях можно судить о процессе старения каждого человека и прогнозировать долголетие у мышей [16]. Высказано предположение, что функциональное состояние иммунных клеток участвует в провоспалительных реакциях и, следовательно, в скорости старения каждого человека [17].

На сегодняшний день клеточные и молекулярные механизмы, лежащие в основе старения, изучены лишь поверхностно, что является препятствием в разработке новых мер и методов лечения, которые могли бы предотвратить старение в целом и ухудшение функций мозга в частности. Старение является проявлением многочисленных изменений внутренних и внешних компонентов клеток. Особенно уязвимы к старению нейроны центральной нервной системы (ЦНС), поскольку накопление поврежденных белков, липидов и нуклеиновых кислот значительно ухудшает их жизнеспособность [18]. Более того, изменения в клеточной среде, например, астроцитов и олигодендроцитов, могут существенно влиять на нейроны [19]. Для старения ЦНС характерны такие процессы, как снижение синаптической эффективности и потеря нейронов [20]. Это неизбежно влияет на сенсорные, двигательные и когнитивные функции организма и тесно связано с развитием возрастных патологий [21].

Именно поэтому усилия исследователей сосредоточены на поиске механизмов, вовлеченных в процессы старения и связанных с ним заболеваний, что может привести к значительному улучшению медицинской помощи стареющему населению.

Разработка научно-обоснованных геропротекторных стратегий может обеспечить персонализированную модуляцию продолжительности активной жизни человека. Для этого необходимо иметь в арсенале методы их объективного тестирования на популяционном, организменном, клеточном и молекулярном уровнях.

Масштабность и комплексность выполняемого проекта определяется как совокупностью объектов исследования, так и спектром современных методов

анализа биосистем, которые предлагаются к использованию. Переход к предиктивно-превентивной персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, неразрывно связан с внедрением новых технологий в систему анализа оценки состояния организма и использованием лекарственных композиций с доказанным действием. Востребованность новых подходов, включающих проработанную инструментальную и методологическую составляющую, обусловлена острой нехваткой отечественных разработок в практически ориентированных биомедицинских исследованиях.

Изучение механизма функционирования белков в целом, и ферментов в частности, входит в сферу функциональной протеомики. В проекте разрабатывается новый подход для получения сведений о функциональной активности белка, который позволит получить знания о биохимической реакции на принципиально новом уровне единичных биомолекул. Новый подход основан на использовании молекулярных детекторов – атомно-силового микроскопа (раздел 1) и нанопорового детектора (раздел 2), для исследований функциональных свойств ферментов. Новый подход необходим для решения проблем протеомики в части оценки гетерогенности функциональных свойств фермента и установления механизмов реакций на уровне отдельным молекул. При использовании нового подхода появляется возможность получить информацию о свойствах ферментов не только в виде усредненных сигналов по совокупности молекул, но и непосредственно от единичных молекул. Новое направление исследований предоставляет принципиальную возможность обнаружить постулируемую взаимосвязь между пространственной структурой белка и его биологической активностью.

Одним из методов замедления старения организма является терапевтическое воздействие на биохимические процессы, происходящие при старении. Старение организма – природный биологический феномен. Постоянство и многообразие процессов, выстроенных в систему генетических, биохимических, патофизиологических и социальных закономерностей, побуждают к осознанию значимости и исследованию возможностей влияния на этот процесс. Для того чтобы найти и протестировать вещества, способные воздействовать на старение, необходимо: 1) выбрать основных участников ключевых биохимических процессов,

подходящих в качестве мишеней для действия терапевтических веществ, 2) разработать тестовые системы для проверки прямого и возможных побочных воздействий этих веществ на клеточные процессы, а также 3) изучить метаболизм этих соединений. Одним из метаболических процессов является окисление, а ключевыми ферментами окисления ксенобиотиков являются монооксигеназы семейства цитохрома P450, который использует NADPH в качестве кофермента. Этот фермент хорошо изучен и известно, что для его работы необходима система регенерации NADPH. Объектом исследования в работах, описанных в Разделе 3 является гибридный цитохром P 450. Ферменты первой и второй фазы ксенобиотиков оказывают значительное влияние на фармакокинетические параметры и процессы биотрансформации эндогенных соединений и продуктов метаболизма. Особый интерес представляют те ферменты, которые вовлечены в метаболизм как ксенобиотиков, так и эндогенных биоактивных соединений. Данные ферменты имеют значительную роль как в регуляции процессов старения (и онтогенеза в целом), липидного обмена, регуляции нервной и иммунной систем. Данные ферменты являются ключевыми в определении параметров фармакокинетики лекарств, уровня активации пролекарств, а также в развитии фармакорезистентности.

Процесс старения носит плеiotропный характер, и его механизмы сильно различаются у разных видов животных [22]. Тем не менее, при соответствующем анализе, разнообразие путей, связанных со старением, должно оказаться скорее помощью, чем помехой, поскольку каждая из различных животных моделей вносит свой вклад в понимание различных частей механизма старения – будь то роль конкретных генов, молекулярных механизмов или сложных межклеточных взаимодействий, участвующих в старении. Выбору модельных объектов посвящены работы, описанные в разделе (4). Точечные генетические или фармакологические воздействия в различных системах моделей животных позволяют идентифицировать маркеры старения в различных физиологических системах и/или функциях, поэтому совокупность данных, собранных в различных моделях, поможет расшифровать основные факторы, лежащие в основе старения. Модельные организмы являются незаменимыми инструментами для изучения генов, ассоциированных со старением, поскольку позволяют исследовать механизмы старения, схожие с таковыми у

человека, в более управляемых условиях и в течение короткого времени [23]. Такие организмы, как мышь (*Mus musculus*), нематода (*Caenorhabditis elegans*), плодовая мушка (*Drosophila melanogaster*) и дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*), играют ключевую роль в изучении генетики старения. Эти простые модельные системы могут независимо воспроизводить все фенотипы старения, что делает их наиболее популярными модельными организмами в исследованиях старения, о чем свидетельствуют многочисленные исследования [24,25]. Поиск по терминам «мышь» и «старение» в базе данных PubMed дает примерно 74 000 результатов, что является самым высоким показателем среди всех других видов. Эти организмы демонстрируют консервативные механизмы, регулирующие продолжительность жизни, например, инсулиноподобный сигнальный путь и пути аутофагии [26]. Однако остаётся вопрос: какие из модельных организмов наиболее близки к человеку по числу ортологов генов, связанных со старением, и какие из них обладают наибольшим разнообразием протеоформ?

С развитием технологий, таких как высокопроизводительное секвенирование и масс-спектрометрия, стало возможным проводить систематический анализ протеомов модельных организмов, включая альтернативный сплайсинг, посттрансляционные модификации и одноаминокислотные полиморфизмы [27,28]. Эти данные создают основу для детальной оценки функциональных возможностей организмов, а также позволяют рассмотреть широту спектра протеоформ, то есть разнообразие вариантов белков, которые один ген может кодировать. Информационные ресурсы, такие как UniProtKB, играют ключевую роль в аннотировании этих данных и являются важным инструментом для изучения генетического разнообразия на уровне протеома [29].

Часть работы по разделу 4 была направлена на оценку пересечения генов старения у человека с геномами 30 модельных организмов, с использованием данных о консервативных ортологах. В отличие от предыдущих исследований [24], которые были сосредоточены на ограниченном числе видов, наше исследование охватывает широкий спектр организмов, включая не только мышей, дрозофил и нематод, но и более редкие виды для определения потенциальной возможности их применения в исследованиях. Информация для поиска ортологичных генов была получена из ранее опубликованной работы [30], которая представляет собой

систематический обзор исследований по теме старения человека. Информация, касающаяся аннотации генома, необходима для точного моделирования молекулярных процессов, происходящих в организме человека как в норме, так и при патологии.

Одной из перспективных стратегий борьбы со старением является метаболическая манипуляция. Работы по этому направлению описаны в Разделе 5, в том числе обобщены полученные к настоящему времени сведения о внутриклеточных мишенях пептидной природы и нацеленных на них антивозрастных агентах, а также выбраны подходящие для дальнейших исследований мишени, для которых известна трехмерная структура. Анализ данных об обнаруженных белках-мишенях выявил белок ORF2p с активностью обратной транскриптазы и эндонуклеазы, ген которого кодируется активным ретротранспозоном L1. Поскольку активность ORF2p была выявлена при процессах, нарастающих с возрастом, то это делает ORF2p потенциальной терапевтической мишенью.

В рамках *in silico* поиска соединений, обладающих геропротекторной активностью использован более чем тридцатилетний опыт сотрудников ИБМХ по разработке и практическому применению методов компьютерного конструирования лекарств. Использованный задел позволяет осуществить построение обладающих определенной предсказательной способностью моделей зависимостей «структура – геропротекторная активность», и провести с использованием этих моделей поиск новых потенциальных геропротекторов. Для построения этих моделей и их валидации выполнено формирование обучающих выборок, содержащих информацию о структуре и геропротекторной активности соединений, подтвержденной в эксперименте. Работы, выполненные в рамках этого направления описаны в Разделе 6.

Одним из ключевых направлений проекта является поиск биомаркеров старения в биологических образцах. Ключевым этапом подготовки к таким исследованиям является создание биологических коллекций образцов крови от участников различных возрастных категорий, прошедших отбор по клиническим параметрам, соответствующим критериям физиологического старения. В рамках создания коллекции (Раздел 7) разработаны критерии включения в ту или иную

группу образцов, работы выполнены на основе анализа мировой литературы и опыта существующих клинических проектов. Важным условием формирования коллекции является обеспечение стандартных условий пробоподготовки, хранения и транспортировки образцов, а также строгое соблюдение преаналитических стадий для предотвращения ошибок и искажения результатов. Данный блок работ необходим для успешной реализации работ по проекту, в том числе необходимо: определить список параметров, отражающих ключевые процессы старения на молекулярном уровне; создать структурированную коллекцию биологических образцов от здоровых участников разного возраста; обеспечить стандартизированную методологию забора, хранения, пробоподготовки и анализа образцов (применение стандартных операционных процедур). Это позволит в дальнейшем максимально эффективно использовать полученные данные для разработки подходов к геропротекции, к созданию методов профилактики возраст-ассоциированных заболеваний и расширению периода здоровой жизни.

В последние десятилетия для выявления механизмов старения, значительное внимание уделяется изучению протеома плазмы крови. Циркулирующие белки являются привлекательными мишенями для изучения, являясь конечными эффекторами физиологических путей. Они адаптируются под воздействием возраста, влияя на метаболизм и иммунный ответ организма, что обуславливает изменения в белковом профиле. Понимание этих различий может помочь в разработке новых подходов к диагностике и лечению возраст-зависимых заболеваний. Определение белковых маркеров (Разделы 8-11) представляет собой основной инструмент клинической химии и лежит в основе диагностики многих патологических состояний. Направленная или таргетная масс-спектрометрия, благодаря высокой чувствительности, селективности, мультиплексному характеру анализа и возможности количественной оценки белковых аналитов, представляет особенный интерес для применения в диагностике. Представление о количественном и качественном составе протеома здорового человека остается неполным, тем более отсутствуют значения нормы для концентрации белков в крови человека для различных возрастных групп. Физиологически обусловленную разницу в содержании белков (физиологический “шум”), необходимо учитывать при разработке и валидации методов определения белковых маркеров с помощью масс-

спектрометрии. Данные о концентрации белков для различных возрастных групп являются одним из важнейших параметров для определения биологического возраста и оценки влияния терапии на процессы старения. Таким образом, задача по определению биологической вариабельности белков, имеющих важное значение в диагностике социально-значимых заболеваний и образцах, полученных от здоровых добровольцев разных возрастных групп является актуальной.

Технологические достижения последних десятилетий дали возможность проводить широкомасштабные исследования молекулярных данных живых организмов. Метаболомное профилирование (Разделы 13-14) заключается в изучении малых молекул в организме (обычно массой менее 1500 Да), которые представляют собой циркулирующие низкомолекулярные продукты метаболических реакций в ответ на геномные, транскриптомные, протеомные или экологические изменения. Несмотря на то, что метаболомика стала относительно недавно новым типом «омикс-» исследований, интерес к ней только растет, поскольку является наиболее чувствительным типом молекулярных данных к различным изменениям – возрастным, патологическим, анатомическим и пр. Панорамный масс-спектрометрический анализ метаболома нашел широкое применение для количественного анализа метаболитов и широко используется для идентификации биомаркеров заболеваний и поиска мишеней для воздействия лекарств.

Объектом исследования при выполнении работ описанных в разделе 15 является внеклеточная ДНК (вкДНК) – многообещающий потенциальный биомаркер различных биологических процессов, например, старения, из-за простоты сбора образцов и постоянно снижающихся затрат на геномное секвенирование. Процесс старения сопровождается изменениями количества апоптотических клеток, скоростью высвобождения ДНК в кровь и воспалительными процессами. Все эти факторы могут влиять на уровень вкДНК, представленность в ней ДНК различных тканей, распределение фрагментов по размерам, а также профиль модификаций (метилования) ДНК. Все большее число исследований демонстрируют потенциальное использование вкДНК в качестве неинвазивного биомаркера для определения физиологических и патологических состояний. Однако, прежде чем рекомендовать ее в качестве биомаркера в клинических

условиях, необходимо преодолеть некоторые недостатки в методологии анализа. Секвенирование единичных молекул на основе длинных прочтений позволяет определять одновременно состав, фрагментом и метилом ДНК и открывает новый потенциал вкДНК как биомаркера процесса старения, однако данных о использовании этой технологии для анализа внеклеточной ДНК недостаточно и необходимо определить динамический интервал изменения в норме и технические ограничения метода.

Моделирование процессов старения *in vitro* является нетривиальной задачей (см раздел 16). В настоящее время не существует общепринятых консенсусных клеточных моделей старения, равно как и однозначно трактуемых критериев для валидации таких моделей. Более того, процессы старения имеют специфику в зависимости от органа и ткани. Активно изучаются особенности старения различных типов клеток в составе органа (стромальных, паренхиматозных, стволовых). Несмотря на то, что клеточные модели старения имеют ряд ограничений, связанных с невозможностью воспроизводить особенности нейро-эндокринного уровня и другие системные регуляторные контуры, ассоциированные со старением, они открывают новые возможности для понимания молекулярных механизмов этого процесса, поиска и валидации маркеров биологического возраста и темпов старения, включая интегральные (омикс-) маркеры, а также терапевтических мишеней для увеличения продолжительности и качества жизни. Кроме того, стандартизованные клеточные модели старения являются необходимым инструментом разработки геропротекторных средств и технологий для скрининговой оценки их эффективности.

Таким образом, проект выполняется в актуальном направлении современной науки, в том числе: разрабатываются новые подходы к оценке функциональных свойств биологических объектов, выполняется поиск маркеров ускоренного старения для построения предсказательных моделей и оценки биологического возраста, выполняется изучение геропротекторных свойств соединений на животных моделях и моделях клеточного старения с учетом протеомных и метаболомных маркеров.

1. РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЕДИНИЧНОЙ МОЛЕКУЛЫ ФЕРМЕНТА ПО АСМ-ДАНЫМ: ПОДБОР УСЛОВИЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ МОДЕЛЬНОГО БЕЛКА, РЕКОНСТРУКЦИЯ ФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ МОДЕЛЬНОГО БЕЛКА НА ПОВЕРХНОСТИ

Актуальность изучения ферментативных систем обусловлена их определяющей ролью в организме. Стандартным подходом для их изучения является исследование одновременно большого числа молекулярных систем и наблюдение усредненных по ансамблю свойств. На сегодняшний день возможности современной науки позволяют исследовать свойства единичных молекул и получать сведения о биохимических системах на принципиально новом уровне, что значительно расширяет представление о протекании биохимических процессов в организме. Повышенный интерес к исследованиям единичных молекул ферментов, их свойств и активности, продолжает стимулировать развитие энзимологии единичных молекул.

Парадигма исследования биосистем на уровне отдельных молекул основана на предположении что современные знания об организме не полные, так как чувствительность современных биоаналитических систем ограничена и позволяет регистрировать сигнал от миллионов и миллиардов молекул. Обнаружение и изучение свойств отдельных белков является новым вектором развития биомедицинской науки. При анализе различных органов и тканей биологического материала получить полный протеом нет возможности. Как правило, протеомику и метаболомику предлагается использовать в качестве ранних или предсказательных диагностических систем в медицине. Однако, наличие детекционного барьера делает эту задачу невозможной, так как появляющиеся первые молекулы, которые могут охарактеризовать тот или иной патологический процесс или заболевание, невидимы; а обнаруживаются только когда нарабатается уже большое их количество, что уже должно характеризовать развитую стадию того или иного патологического процесса. Поэтому для того, чтобы перейти к предсказательной, или ранней диагностике и даже для оценки состояния организма, необходимо разработать детектор, который, наподобие детектора Гейгера-Мюллера позволяет идентифицировать каждую молекулу, используя, конечно, какой-либо другой

идентификационный признак молекулы, а не ее радиоактивность. В этом и состоит задача сегодняшнего дня, и разработка методологии исследования функциональных свойств отдельной молекулы фермента с помощью АСМ является одним из этапов решения этой задачи.

Подробно используемая концепция подхода описана в отчетной публикации по теме проекта: Ponomarenko, E.A.; Ivanov, Y.D.; Valueva, A.A.; Pleshakova, T.O.; Zgoda, V.G.; Vavilov, N.E.; Ilgisonis, E.V.; Lisitsa, A.V.; Archakov, A.I. From Proteomics to the Analysis of Single Protein Molecules. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, 25, 10308. <https://doi.org/10.3390/ijms251910308>.

В качестве объекта исследования – модельного белка выбрана пероксидаза хрена (ПХ), хорошо охарактеризованный белок, функциональная активность которого может быть исследована традиционным спектрофотометрическим методом, который доступен для проверки полученных данных. Для АСМ-анализа важно подобрать условия сорбции на поверхность в виде отдельно лежащих объектов, что важно при исследовании биосистемы на уровне отдельных молекул. Ранее в ИБМХ выполнялись работ по исследованию ПХ, в том числе и с помощью АСМ. Но существенным для настоящего проекта является определение возможности визуализации белка в условиях, близких к нативным, т.е. визуализации в жидкой среде. Необходимо добиться устойчивой адгезии объектов на поверхности и избежать десорбции в процессе добавления/удаления компонентов ферментной реакции.

Особенностью АСМ-исследования является использование низкоконцентрированных буферных растворов, поскольку высокое содержание соли может привести к ее сорбции на поверхности и искажению параметров визуализируемых объектов. Поэтому в рамках выполнения работ по п 1.1 ПГ выполнена реконструкция ферментной реакции для АСМ-исследования и подтверждено сохранение активности в выбранном буфере спектрофотометрическим методом. В кювете спектрофотометра воспроизведены параметры АСМ-системы – концентрация буфера, соотношение количества молекул белка, субстрата и кофактора.

Существенным отличие АСМ-системы от ферментной системы в кювете является наличие иммобилизованного белка (сорбированного на поверхности), что

является необходимым условием для применения метода АСМ. Сохранение активности фермента в условиях иммобилизации также остается важным вопросом. В рамках проекта проведено моделирование сорбции ПХ на поверхность слюды - подложки, используемой для реконструкции системы для АСМ-исследования. Методы молекулярной динамики подтверждают доступность активного центра для субстрата в процессе ферментной реакции.

1.1. Подбор условий иммобилизации модельного белка ПХ на поверхность для визуализации в жидкости

1.1.1. Сорбция белка на поверхность из растворов с различной концентрацией

На данном этапе работ выполнен подбор условий визуализации модельного белка, в соответствии с пунктом 1.1 ПГ. В качестве модельного белка был выбран хорошо изученный и доступный гемсодержащий фермент – пероксидаза хрена (ПХ), Mr = 40 кДа. ПХ регулярно используется для исследования структуры и функции ферментов и дает возможность разработать специальные инструменты для практического применения в биомедицинских исследованиях.

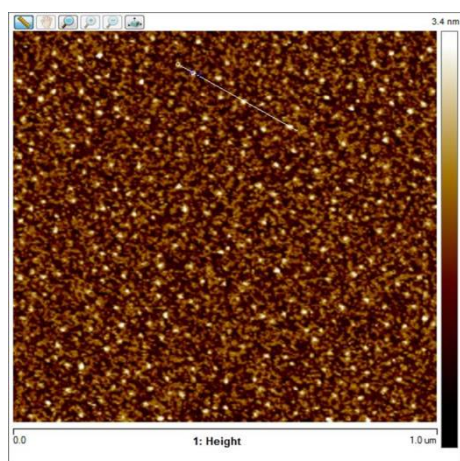
В соответствии с п.4.1 ТЗ выполнен подбор условий визуализации модельного белка в виде отдельных биомакромолекул. В том числе проведен подбор условий нековалентной иммобилизации биомолекул на поверхность АСМ-подложки, при которых возможно визуализировать единичные молекулы в мономерной форме. Полученные результаты показали, что использование высоких (порядка микромолярных) концентраций растворов приводит к тому, что биомолекулы, склонные к агрегации, находятся в виде олигомеров. Работа же с малыми концентрациями позволяет сместить равновесие в сторону мономерной формы белков и следить за свойствами и мономеров, и олигомеров.

В выбранных условиях сорбция белка проведена следующим образом: на поверхность свежесколотой слюды (размер подложки не менее 15*15 мм) наносится раствор белка (объем 3-5 мкл), инкубируется при комнатной температуре, после чего поверхность отмывается проточной деионизованной водой (1 мл). Для визуализации в воздухе подложка высушивалась, в случае визуализации в жидкости – после отмывки сразу передавалась на АСМ-измерения. Предполагается, что в условиях сохранения влажности белок сохраняет свою нативную структуру благодаря наличию слоя адсорбированной воды.

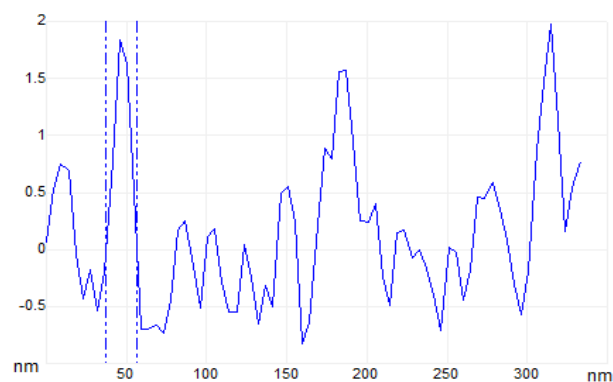
На рисунке 1.1 приведен пример АСМ-изображений молекул ПХ сорбированных на поверхности слюды из буферного раствора (2мМ PBS) с концентрацией белка 10^{-7} М (рисунок 1.1 (а)), профиль поперечного сечения молекул на изображении (рисунок 1.1 (б)) и график функции распределения визуализированных объектов по высотам $\rho(h)$ (рисунок 1.1 (в)), сформированные на основе обработанных АСМ-изображений.

В соответствии с п 3.1 ТЗ получены сведения об олигомерном состоянии белка. Оценка агрегатного состояния белка осуществлялась на основе графиков функций распределения визуализированных объектов по высотам $\rho(h)$ (рисунок 1.1 (в)), построенных на основе данных, полученных путем обработки АСМ-изображений (рисунок 1.1 (а)). Графики функций распределения показывают, что преимущественное содержание (более 95%) всех визуализированных частиц находится в диапазоне высот от 1 до 2 нм. Мономодальная форма распределения также свидетельствует о наличии объектов одного типа. В связи с чем можно сделать вывод, что наблюдаемые при АСМ сканировании объекты можно отнести к мономерам.

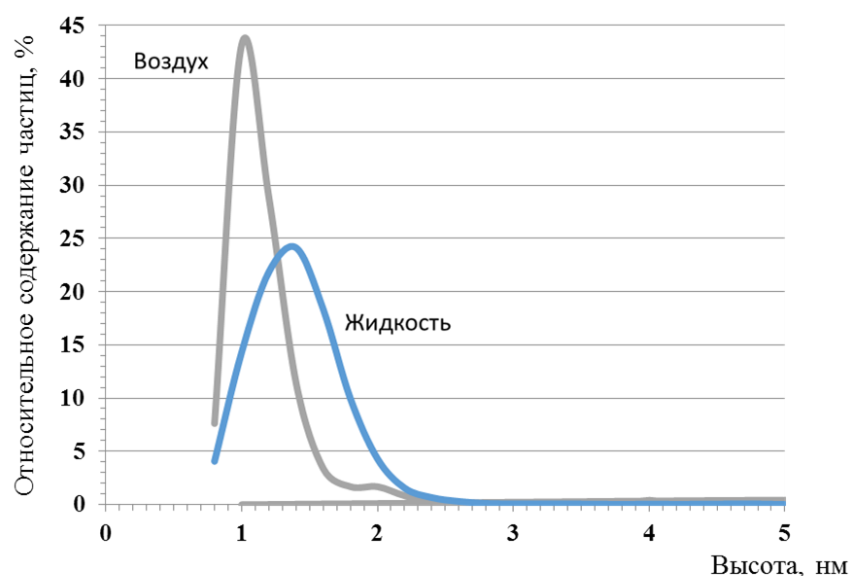
Подобранные условия сорбции позволили провести визуализацию молекул ПХ в жидкости (буфере для ферментной реакции). Из полученных данных следует, что визуализированные частицы адсорбируются преимущественно в мономерной форме. Проанализированы АСМ-данные, на основании которых было проведено сравнение агрегатного состояния молекул ПХ при сканировании в жидкости и в воздухе, и показано, что агрегатное состояние сохраняется и соответствует мономерной форме (см. также подраздел 1.1.3).



(a)



(б)



(в)

Рисунок 1.1 – (а) пример АСМ-изображений молекул белка ПХ, сорбированных на поверхности слюды из буферного раствора (2мМ PBSD) белка ПХ концентрацией 10^{-7} М, (б) профиль поперечного сечения соответствующей линии на изображении (в) график функций распределения визуализированных объектов по высотам $\rho(h)$

1.1.2. Характеристика иммобилизованного белка с помощью радиальной функции распределения

При проведении работ по подбору условия иммобилизации фермента на поверхность (см. подраздел 1.1.1) выполнено исследование расположения объектов на поверхности. Задача, которая стояла на данном этапе – определить наличие или отсутствие взаимодействия между объектами на поверхности (2D система) и насколько это взаимодействие отражает поведение этих же объектов в растворе, т.е. в объеме (3D система). Исследовано две системы объектов, сорбированных на поверхности: золотые частицы (ЗНЧ), как пример частиц с определенным зарядом и

молекулы пероксидазы хрена (ПХ) – модельный белок для исследования системы на уровне единичных объектов.

Подробно работы описаны в публикации, представленной в составе пакета отчетной документации: Kraevsky, S.V.; Valueva, A.A.; Ershova, M.O.; Shumov, I.D.; Ivanova, I.A.; Kanashenko, S.L.; Ryazantsev, I.A.; Ivanov, Y.D.; Pleshakova, T.O. Using the Radial Distribution Function to Analyze Atomic Force Microscopy Images of Colloidal Systems. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, 26, 210. <https://doi.org/10.3390/ijms26010210>.

Было обнаружено, что ЗНЧ могут упорядоченно рассредоточиваться на поверхности (рисунок 1.2). Традиционно при описании структуры конденсированных сред используется радиальная функция распределения (РФР). Логика расчета РФР 3D систем была перенесена на 2D систему, где в узлах решетки располагались ЗНЧ иммобилизованные на свежесколотой слюде. Показано, при небольших концентрациях частиц 1 ч/кв.мкм (200-300 частиц на 15x15 кв.м), первый пик РФР находится на расстоянии в несколько раз превышающего средний диаметр частицы 16 нм. Это указывает на наличие отталкивающих сил. Существенную роль при этом играет одноименность отрицательных зарядов цитратной оболочки ЗНЧ и гидратированной поверхности свежесколотой слюды, на которой, предположительно могут быть локализованы ионы K^+ .

Единичные биомакромолекулы исследуемой ПХ имеют положительные участки глобулы, которые позволяют сорбировать ее на поверхности (рисунок 1.2). Первый пик РФР, определенный для такой системы сравним с размером частицы, что говорит об отсутствии отталкивающих или притягивающих сил на таких расстояниях. Или по крайней мере такие силы не превышают силу взаимодействия со слюдой. Такое случайное распределение по поверхности характерно для поверхностной концентраций ниже 50 молекул ПХ на 1 кв. мкм. Поверхностная концентрация такой систем подчинена распределению Пуассона. Особенностью данного распределения является форма зависимости стандартного отклонения ожидания от количества объектов, обнаруженных на поверхности. Погрешность измерения поверхностной концентрации будет пропорциональна корню квадратному от числа найденных частиц.

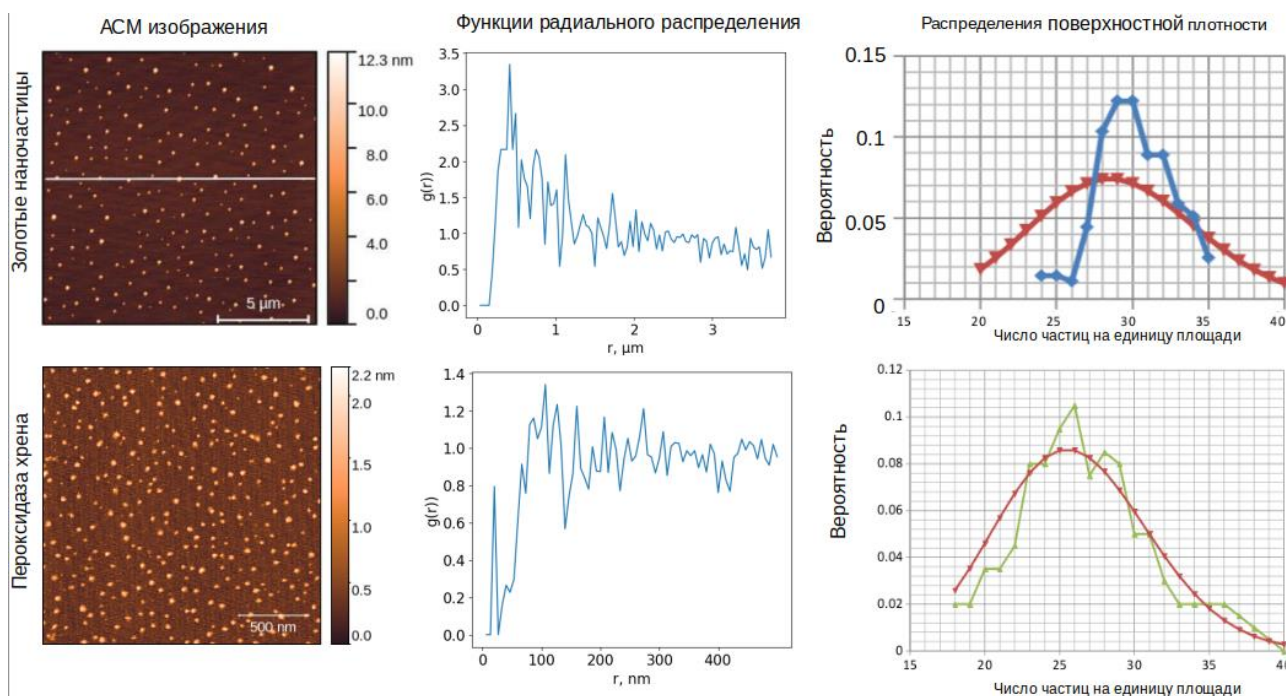


Рисунок 1.2 – АСМ изображения (левая панель), функции радиального распределения (средняя панель) и распределение поверхностной плотности (правая панель) для золотых наночастиц и молекул пероксидазы хрена, визуализированных поверхности на свежесколотой слюде. На изображении распределения поверхностной плотности красной линией показан теоретический график распределения Пуассона

1.1.3. Визуализация иммобилизованного белка при АСМ сканировании с высоким разрешением

При сорбции белка ПХ из растворов с концентрацией 0.1 мкМ при 25°C на поверхности наблюдалось две группы объектов с высотой $1,00 \pm 0,20$ нм ($85,8 \pm 9,6$ %) и с высотой $1,45 \pm 0,20$ нм ($14,2 \pm 9,6$ %) [35]. Для описания полученных данных ранее не учитывались латеральные размеры визуализируемых объектов, которые могут зависеть от радиуса кривизны кантилеверов. АСМ-измерения производились с помощью кантилеверов NSG10, у которых радиус закругления составляет 10 нм, что вносит большую погрешность в определении латеральных параметров объектов. Для решения данной проблемы использовались кантилеверы NSG01_DLS для сканирования на воздухе и SCANASYST-FLUID+ для сканирования в жидкости, у которых радиус закругления составляет 1-3 нм и около 2 нм соответственно.

При АСМ-визуализации, сорбированных молекул ПХ из растворов 0.1 мкМ при 25°C, в высоком разрешении на воздухе (рисунок 1.3 А) наблюдаются компактные объекты высотой $1,00 \pm 0,20$ нм (90,7%), так же присутствует вклад частиц с высотой $1,4 \pm 0,20$ нм (7,4%) (рисунок 1.4 А, черная линия). Полученный результат согласуется с приведенными ранее данными. Стоит отметить, что

максимальные высоты объектов в жидкости возрастают и составляют $1,7 \pm 0,2$ нм (47,6%), а также выделяется группа объектов с максимальной высотой $2,2 \pm 0,2$ нм (34,8%) (рисунок 1.4 А, красная линия). Возрастание максимальной высоты объектов в жидкости обусловлено тем, что сорбированные молекулы ПХ максимально приближены к нативному состоянию и используемые кантилеверы (SCANASYST-FLUID+) обладают низкой силовой константой от 0,35 до 1,40 Н/м, а, следовательно, воздействие кантилевера на визуализируемые объекты минимальны. Однако, если обратить внимание на функции относительного распределения объектов по объемам (рисунок 1.4 Б), то разница между двумя режимами сканирования отсутствует, что обусловлено малыми высотами и большими площадями, визуализированных объектов на воздухе, и большими высотами, и меньшими площадями объектов, визуализированных в жидкости (рисунок 1.4 В).

По результатам АСМ-визуализации с высоким пространственным разрешением в соответствии с п.4.1. ТЗ проведен выбор типа АСМ-данных, используемых для оценки функциональной активности. Рекомендуется оценивать как высоту объекта, так и его латеральные размеры, что позволит выделить целевые молекулы. Например, как видно из рисунка 1.4 объектами для наблюдения являются молекулы с высотой от 1.5 до 2.4 нм, которые соответствуют высоте отдельных молекул ПХ, визуализированных в жидкости. Возможность выделения целевых объектов по заданной высоте и площади (а соответственно и объему) была рекомендована при разработке алгоритма обработки изображений (см. подраздел 1.5.) и вошла в рекомендации по выбору объектов наблюдения на поверхности в соответствии с п.3.1 ТЗ. Возможность отсека нецелевых объектов по высоте или объемы позволит сфокусироваться на объектах наблюдения -молекулах белка при использовании функции NanoTrack™ (см ниже).

Существование двух групп объектов с разными высотами и объемами может свидетельствовать о нахождении сорбированного белка в двух пространственных состояниях на поверхности. Далее, в подразделе 1.2 будет рассмотрено молекулярное моделирование сорбции белка ПХ на поверхность, результаты которого позволят лучше интерпретировать результаты АСМ-визуализации.

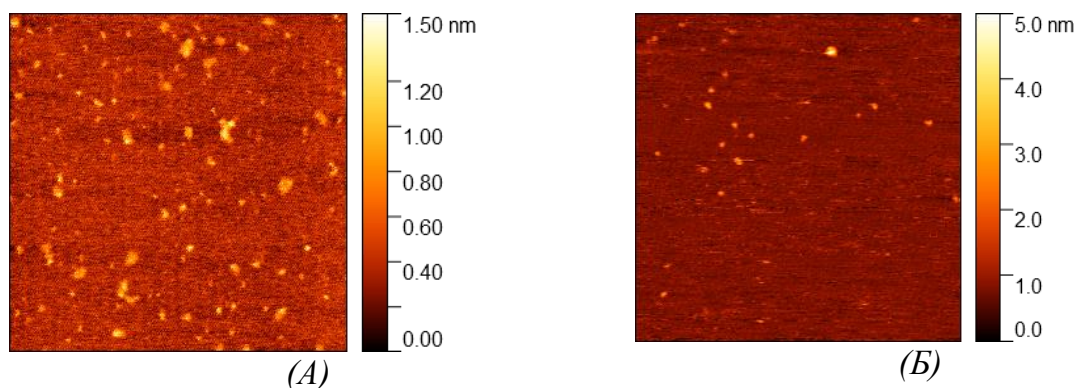


Рисунок 1.3 – Типичные АСМ-изображения сорбированных молекул ПХ из растворов с концентрацией 0.1 мкМ при 25°C в режиме сканирования на воздухе (А) и в жидкости (Б). Размер АСМ-изображений составляет 500х500 нм

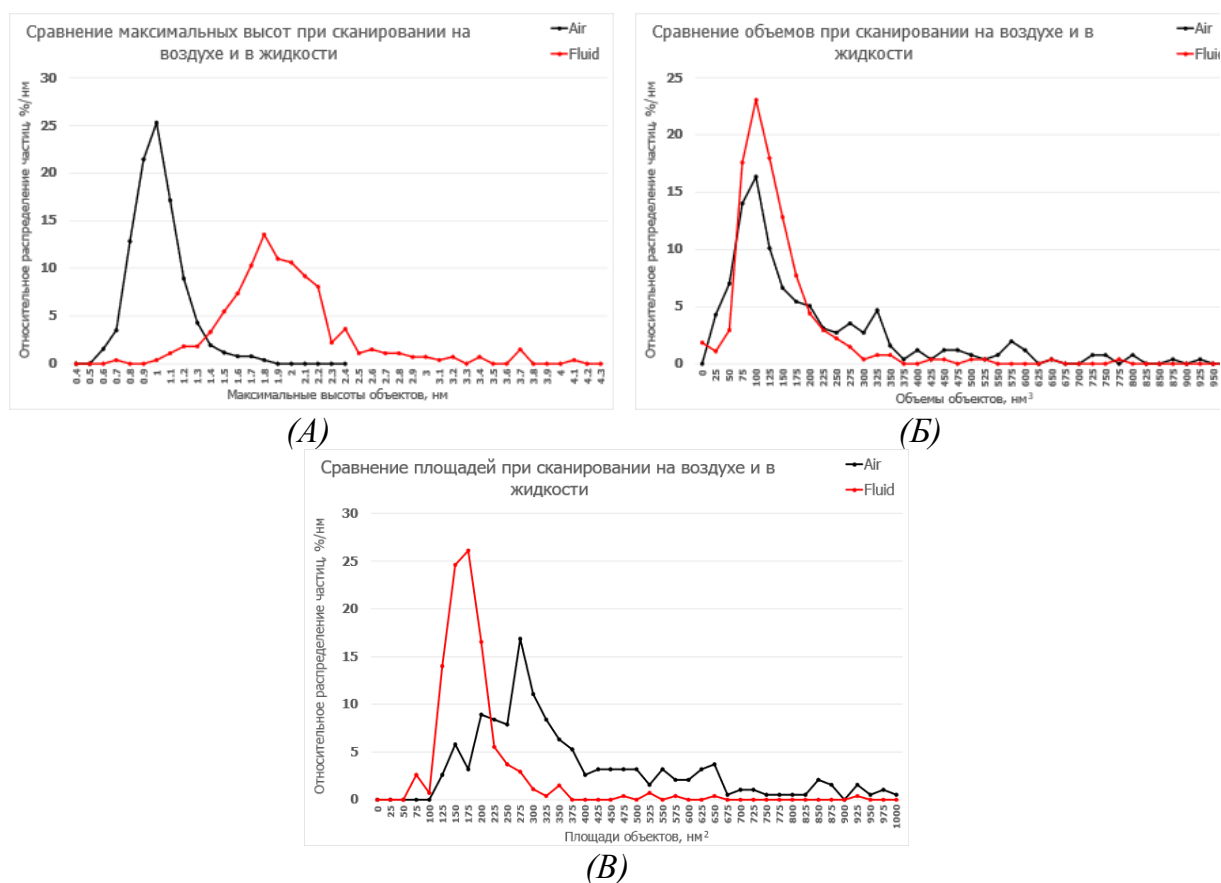


Рисунок 1.4 – Функции относительного распределения по максимальным высотам (А), объемам (Б) и площадям (В) объектов, визуализированных в двух режимах: на воздухе (черные линии) и в жидкости (красные линии)

1.2. Моделирование сорбции белка на поверхность

Ab initio («из первых принципов») квантовомеханическое моделирование многоатомных белковых систем на современных вычислительных платформах остается крайне сложной задачей. Поэтому для моделирования биомакромолекул чаще всего применяются методы, основанные на классической механике, такие как молекулярная динамика (МД). Для описания сорбции ионов на минеральных поверхностях, например, смектитов и слюды, в МД разработаны эффективные силовые поля. К числу популярных силовых полей для белковых молекул относятся: GROMOS, CHARMM, AMBER, OPLS, MMFF94 и другие, а для неорганических материалов — такие как ClayFF и Interface FF.

При комбинировании силовых полей для построения системы «белок — алюмосиликат» могут возникать артефакты. Например, при использовании широко известного силового поля ClayFF [36] кристаллическая структура алюмосиликата может нарушаться в ходе длительной МД, что не наблюдается в экспериментальных данных. Это связано с тем, что в ClayFF для ускорения вычислений были исключены большинство ковалентных связей (за исключением связи Н-О), в то время как стабильность кристаллической решётки в растворе поддерживается за счёт увеличенных парциальных зарядов атомов. Эти особенности достаточно для моделирования системы вода:алюмосиликат с одиночными ионами в течение относительно коротких времен МД, но они оказываются недостаточными для моделирования системы белок:алюмосиликат, где требуется значительно большее время моделирования — десятки или сотни наносекунд.

Целью данной части работ является демонстрация возможности проведения МД-эксперимента по адсорбции белка на слюде с использованием пероксидазы хрена в качестве примера, а также разработка протокола такого эксперимента и оценка структурно-функциональных свойств белка на поверхности.

Для моделирования использована комбинация силовых полей CHARMM36m [37] для белка и растворителя, а для мусковита, одного из видов алюминиевой слюды, — силовое поле Interface FF [37,38]. В качестве начальной модели пероксидазы хрена выбрана её кристаллографическая структура (PDB код 1H55) [37–39]. МД-симуляции проводились с использованием программы GROMACS 2024.2 [37–40], а для визуализации результатов использовался PyMol 3.0.0 [41].

Подготовка молекулярных структур и топологий для мусковита, белка, воды и ионов была осуществлена с помощью веб-сервиса CHARMM-GUI [42–46]. Начальный размер системы составил приблизительно $15 \times 15 \times 15$ нм, где в нижней части по оси Z была размещена периодическая молекула мусковита с противоионами калия, общей толщиной около 1 нм. Для обеспечения различных начальных условий было подготовлено 5 независимых конфигураций, в которых минимальное расстояние между молекулой пероксидазы и слюдой составляло 1 нм. Эти конфигурации различались взаимным расположением белка и слюды (рисунок 1.5). Системы были заполнены реальным водным растворителем (модель воды TIP3P) [47], а часть молекул воды была заменена на противоионы натрия и хлора для нейтрализации заряда системы, с концентрацией ионов 0,15 М. Концентрация фосфат-анионов в буфере PBS была пренебрежимо, поэтому не включались в системы. МД проводились в трехмерных периодических граничных условиях. Отсечка для нековалентных взаимодействий была установлена на 1,2 нм, ковалентные связи поддерживались с помощью алгоритма LINCS, для термостата использовался метод пересчета скоростей [48], а для расчёта электростатики — суммирование по методу Эвальда [49].

Перед каждым стартом продуктивной МД проводилась минимизация энергии методом сопряженных градиентов (5000 шагов) и уравнивающая МД в течение 10 нс в NVT-ансамбле с шагом интегрирования 1 фс. В процессе уравнивания на атомы пероксидазы и гема накладывался потенциал $400 \text{ кДж/моль} \times \text{нм}^2$ по каждой оси, а на атомы слюды (за исключением ионов калия) — потенциал $1000 \text{ кДж/моль} \times \text{нм}^2$ по каждой оси. После уравнивания проводилась продуктивная МД в NVT-ансамбле на протяжении 50 нс с шагом 2 фс, при этом потенциал на атомы слюды оставался равным $1000 \text{ кДж/моль} \times \text{нм}^2$. После завершения первой продуктивной МД растворитель был удалён, а система повторно сольватирована таким образом, чтобы толщина водного слоя над поверхностью слюды составила примерно 1 нм, с добавлением противоионов натрия и хлора. Повторно проводились минимизация и уравнивающая МД, после чего начиналась вторая продуктивная МД, которая продолжалась 500 нс с теми же параметрами.

Для анализа МД-траекторий использовались стандартные утилиты GROMACS (rms, gyrate, dssp [50], sasa, density). Для поиска контактов между белком

и поверхностью слюды, а также для генерации симулированных АСМ-изображений, применялась библиотека MDAnalysis [51] для языка программирования Python.

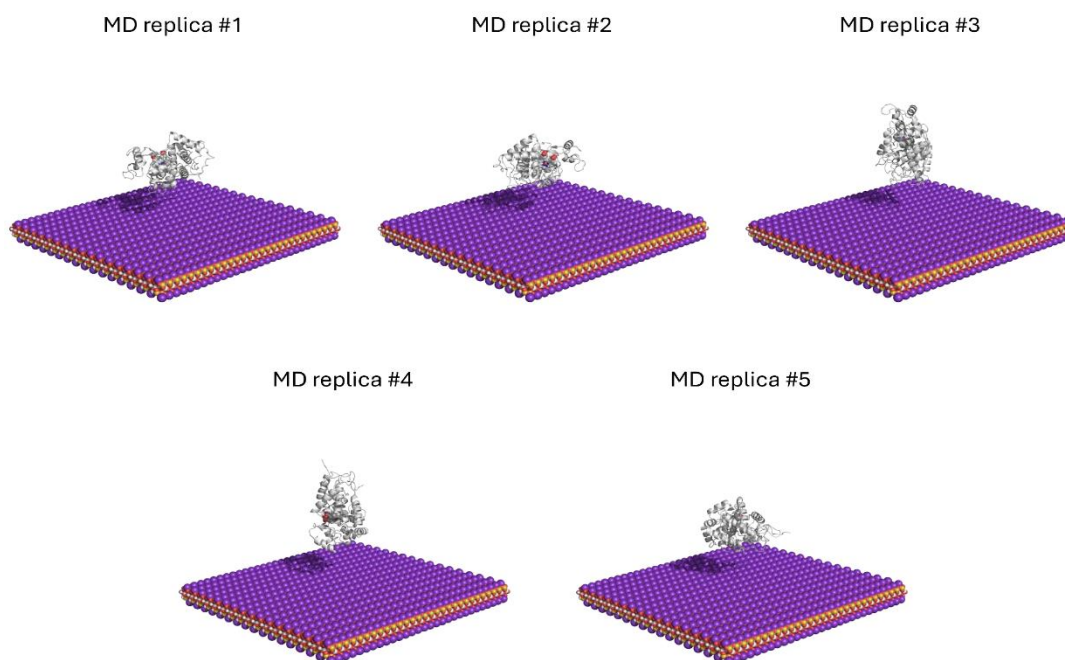


Рисунок 1.5 – Стартовые конфигурации системы мусковит:пероксидаза для 5 независимых стартов МД. Атомы гема показаны с помощью шаровой модели. Растворитель и противоионы натрия и хлора не показаны

В ходе первой продуктивной МД адсорбция белка на слюде не была зафиксирована (рисунок 1.6). Мы предполагаем, что этот эффект обусловлен образованием гидратных оболочек как вокруг белка, так и вокруг мусковита, что затрудняет адсорбцию белковых молекул на заряженных поверхностях, таких как слюда. Также не было обнаружено каких-либо контактов белок:слюда в пакете MDAnalysis (данные не показаны). Однако полученная конфигурация стала отправной точкой для второго этапа, на котором из системы была удалена значительная часть молекул растворителя. После удаления воды был проведен более длительный МД-эксперимент, которого, по нашим оценкам, достаточно для того, чтобы белок адсорбировался на поверхности и, если возможны, произошли конформационные изменения пероксидазы. Этот этап также моделирует процесс высушивания образца, который используется при пробоподготовке для АСМ.

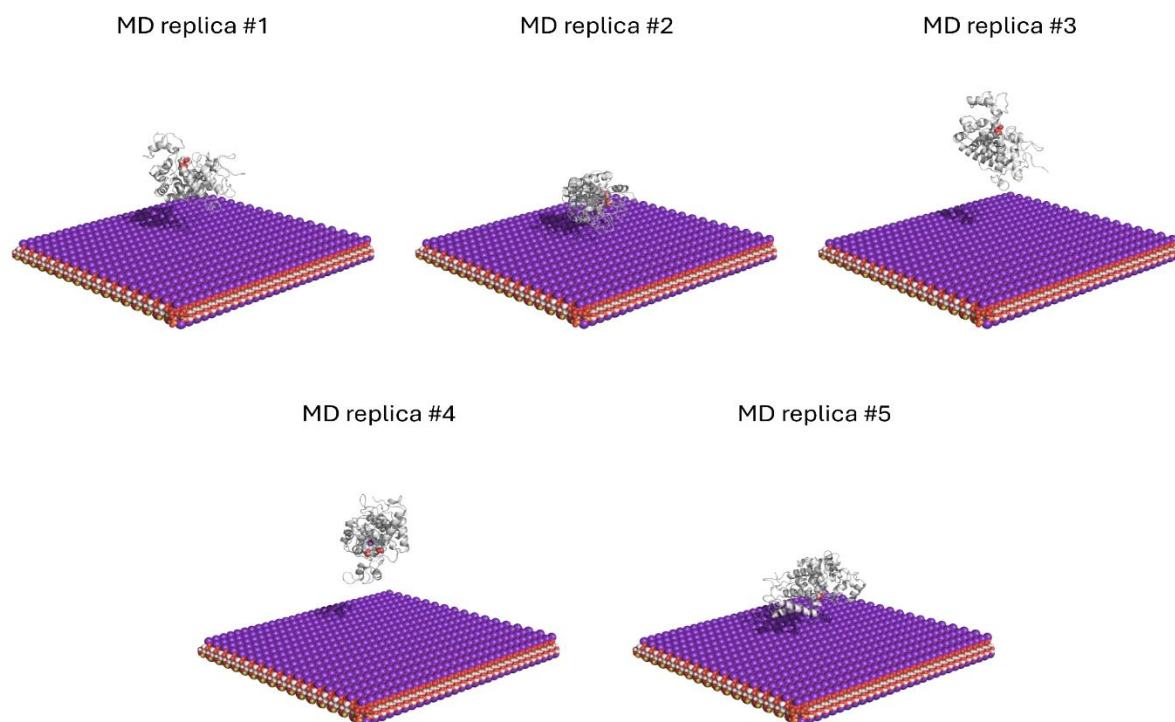


Рисунок 1.6 – Конфигурации системы мусковит:пероксидаза для 5 независимых стартов МД после 50 нс МД в водном окружении. Атомы гема показаны с помощью шаровой модели. Растворитель и противоионы натрия и хлора не показаны

После второго этапа симуляции адсорбция белка была зафиксирована во всех пяти независимых запусках МД. Финальные кадры симуляций показаны на рисунке 1.7. Из этих изображений видно, что существует несколько возможных способов адсорбции пероксидазы, при этом гем остается доступным для растворителя, что предполагает сохранение каталитической активности.

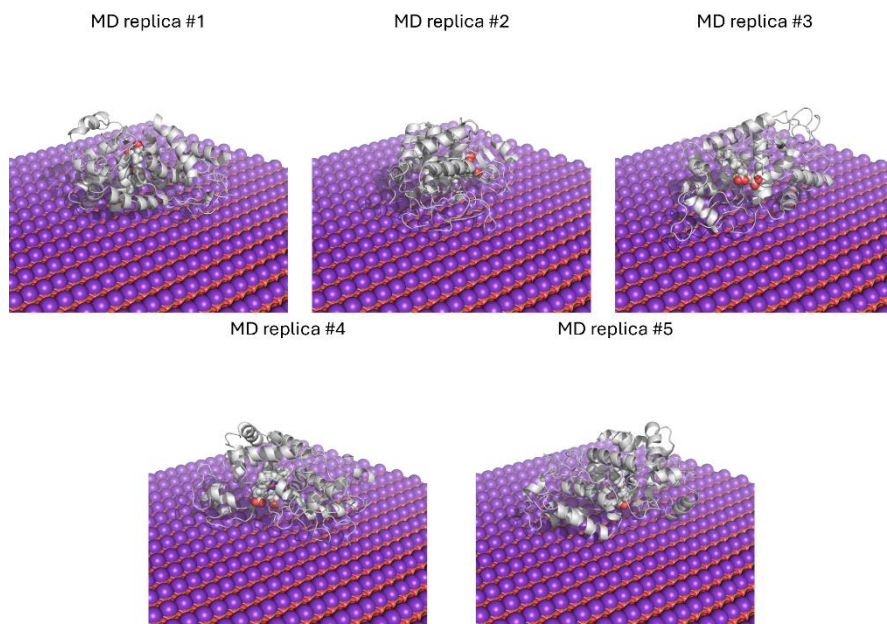


Рисунок 1.7 – Конфигурации системы мусковит:пероксидаза для 5 независимых стартов МД после 500 нс МД с небольшим количеством воды. Атомы гема показаны с помощью шаровой модели. Растворитель и противоионы натрия и хлора не показаны

На рисунке 1.8 представлены графики парциальной плотности для мусковита, гема и пероксидазы, полученные в ходе пяти независимых стартов МД. Из графиков видно, что высота белка около гема составляет примерно 4 нм над поверхностью слюды, в то время как сам гем располагается на высоте около 0,5–1 нм от поверхности. Это свидетельствует о том, что гем не закрыт слюдой в каждом из пяти стартов, что сохраняет возможность каталитической активности белка на поверхности. Особое внимание стоит обратить на то, что кривые парциальной плотности слюды и белка не пересекаются, что может быть связано с неровностью поверхности слюды, упорядоченным расположением противоионов калия относительно мусковита и проникновением боковых цепей аминокислот в микронеровности слюды. Подобная картина наблюдается и на симулированных АСМ-изображениях (рисунок 1.9), где высоты объектов также составляют около 4 нм, а латеральные размеры — примерно 5–6 нм. Эти результаты не совпадают с данными, получаемыми в реальных АСМ-экспериментах, но соответствуют размерам биомакромолекулы, определённым из ее кристаллической структуры ($4,3 \times 4,8 \times 5,8$ нм). Различия в высотах могут быть объяснены влиянием механического воздействия АСМ-кантилевера, который может деформировать биомолекулы в ходе эксперимента.

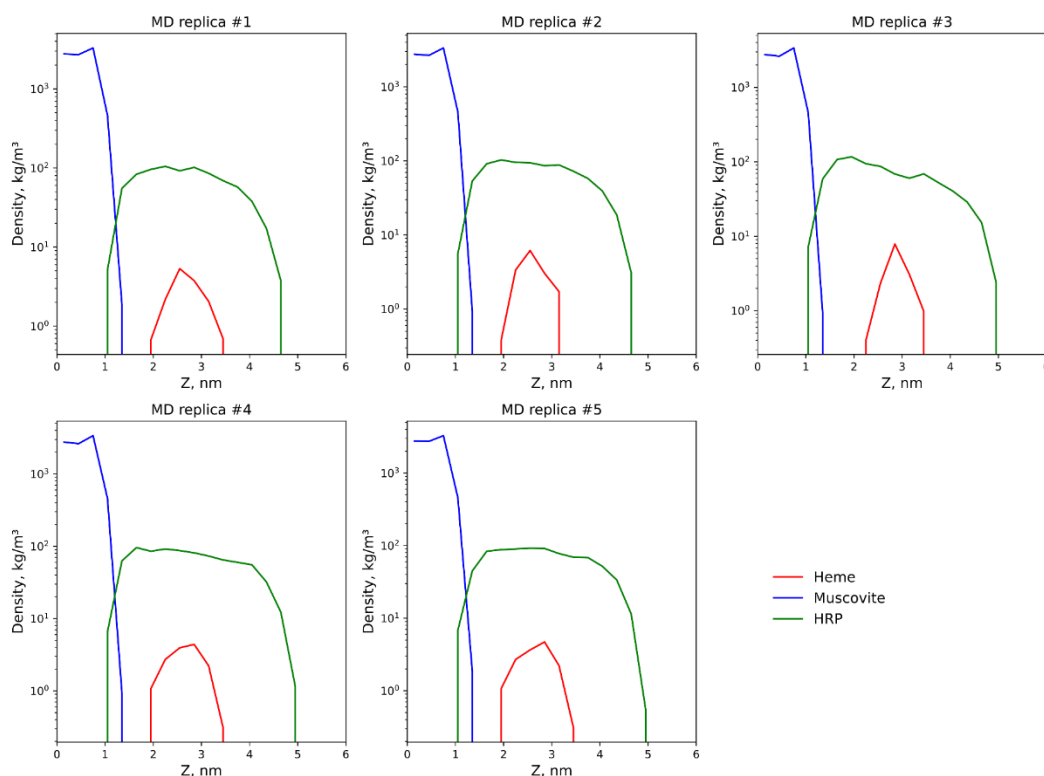


Рисунок 1.8 – График парциальной плотности мусковита, пероксидазы и гема. По оси X линейная шкала, по оси Y логарифмическая шкала

Для набора статистики по адсорбции было проведено 5 независимых запусков МД. На рисунке 1.10а показан процент сходства между номерами аминокислотных остатков, которые взаимодействуют с поверхностью слюды. Из графика следует, что пероксидаза может взаимодействовать с поверхностью как минимум тремя различными сторонами. Кроме того, помимо анализа остатков, непосредственно участвующих в межмолекулярных взаимодействиях, мы исследовали все межмолекулярные контакты в динамике в течение последних 100 нс. Коэффициент сходства Жаккара (рисунок 1.10б), превышающий 0,1, указывает на сходство распределения контактов в траекториях 1–2, 4–5 и 3, что подтверждает участие трех сторон пероксидазы в процессе адсорбции. Интересно, что в АСМ-экспериментах также были зафиксированы три формы белка, которые, вероятно, связаны с адсорбцией на поверхность.

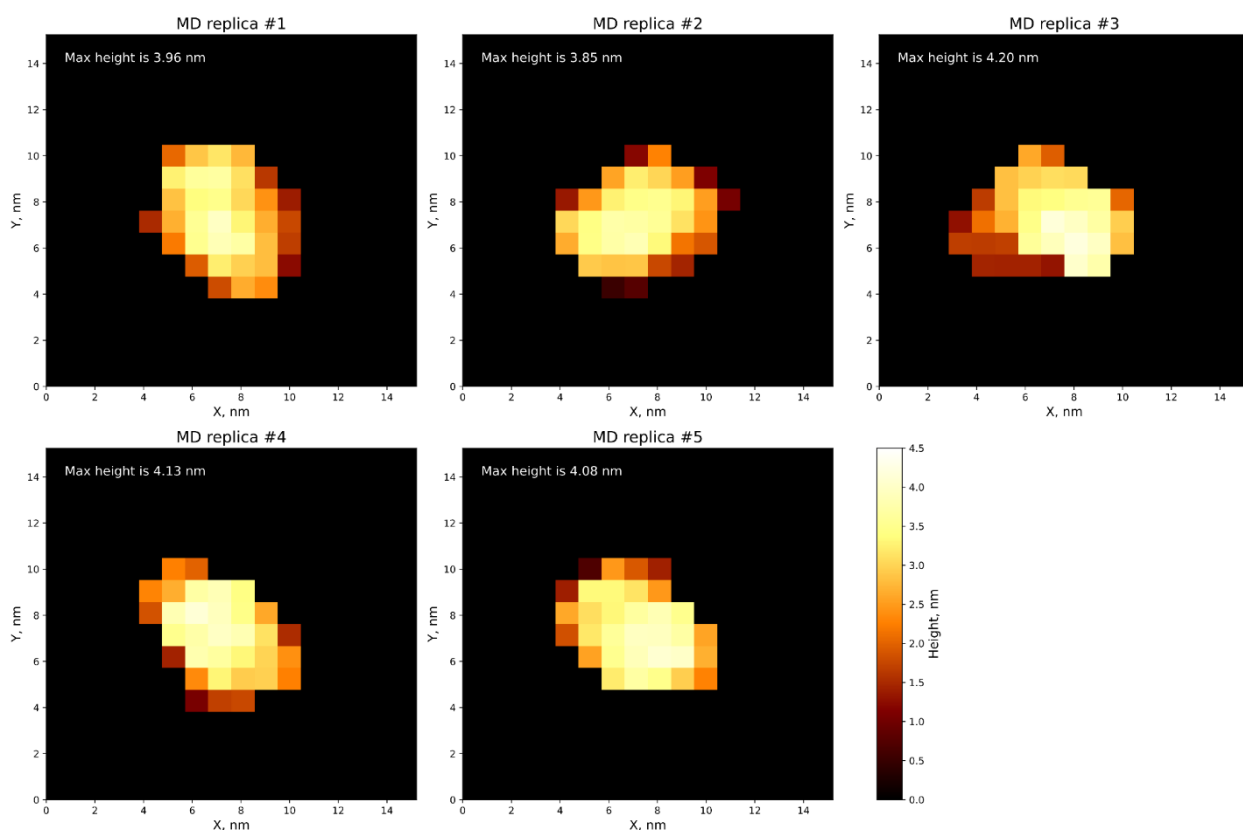


Рисунок 1.9 – Симулированные АСМ-изображения, полученные из моделирования МД с ограниченным количеством воды, с радиусом закругления АСМ-зонда 1 нм

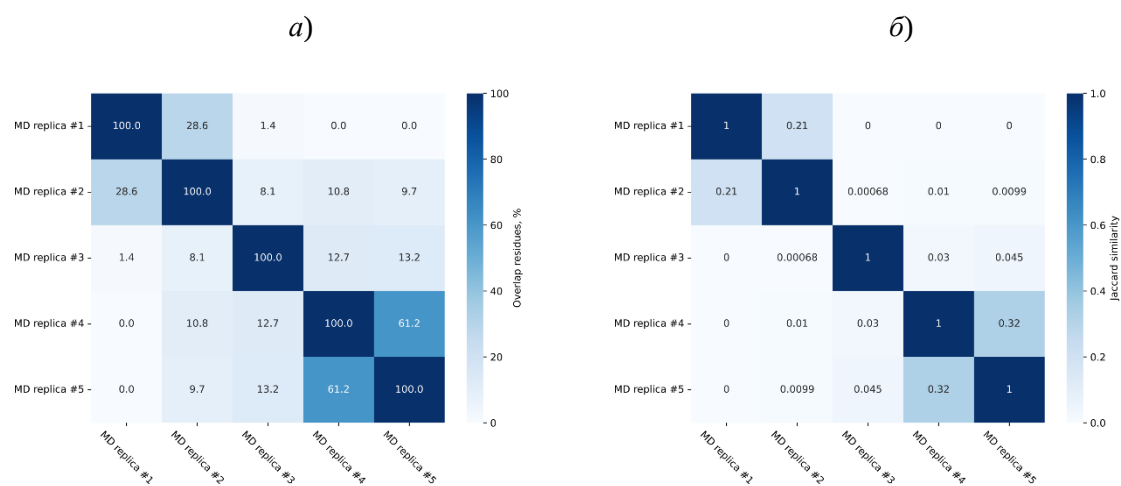


Рисунок 1.10 – Тепловые карты: а) % попарно перекрывающихся аминокислотных остатков, взаимодействующих с мусковитом в МД-траекториях с ограниченным количеством воды; б) коэффициентов сходства Жаккара контактов белок:пероксидаза МД-траекторий с ограниченным количеством воды за последние 100 нс

Таблица 1.1 – Названия и номера аминокислотных остатков пероксидазы, взаимодействующие с мусковитом не менее 50% времени МД

MD replica #1	MD replica #2	MD replica #3	MD replica #4	MD replica #5
Q1	N47	R19	R27	E25
D150	S60	V23	S28	R27
R153	L127	T110	D56	S28
R159	Q128	L111	N57	D29
N255	F130	G113	T59	R62
T257	L133	Y185	N72	F68
D258	N137	Q203	P78	G69
R283	Q147	R206	R82	N70
T288	D150	G207	A85	P78
T291	R153	L208	S89	R82
G292	N154	K232	P210	P210
T293	N189	T270	G213	G213
Q294	N255		N214	N214
	T288		A217	A217
	T293		R224	S308
	Q294		N300	
			R302	
			S308	

В таблице 1.1 приведены названия и номера аминокислотных остатков, которые наиболее активно участвуют в адсорбции пероксидазы на мусковит. В траекториях 1-2, 4-5 и 3 наблюдаются пересечения номеров остатков. Для наглядности на рисунке 1.11 представлены карты взаимодействий белок:слюда. Из этих карт видно, что контакт пероксидазы со слюдой происходит уже в первые наносекунды моделирования, а затем наблюдается дальнейший рост числа контактов в процессе МД. Эти данные косвенно свидетельствуют о низкой свободной энергии процесса адсорбции белка, что может быть полезно при изучении адсорбции низкокопийных белков или при работе с растворами с низкой концентрацией белков.

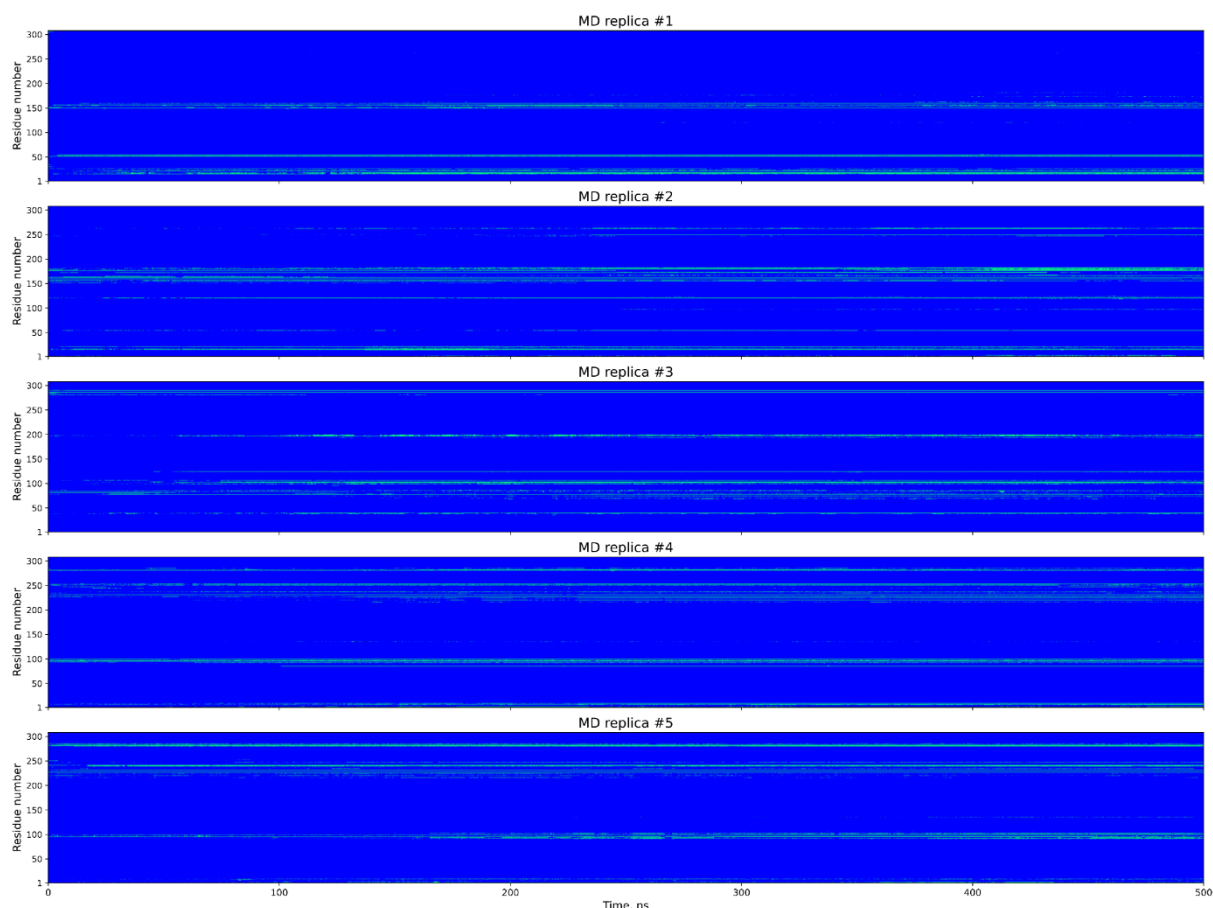


Рисунок 1.11 – Карта контактов между аминокислотными остатками пероксидазы и мусковитом в течение МД с ограниченным количеством растворителя. Точками зеленого цвета показаны кадры МД контакта пероксидазы с мусковитом, синими точками — кадры МД без межмолекулярных контактов

Помимо вопроса возможности адсорбции белка на поверхности важен вопрос стабильности белковых молекул на поверхности и сохранение структурно-функциональных характеристик. Поскольку пероксидаза является гем-содержащим белком, то это позволяет напрямую оценить доступность для катализа. Для этого мы измерили площадь, доступную растворителю (рисунок 1.12), для молекулы гема. Значения не колебались значительно в течение времени МД, сравнимы с кристаллической референсной структурой. Также это показывает, что гем не закрыт вследствие адсорбции на поверхность. Сам белок остается стабильным и не претерпевает денатурацию в течение второго этапа продуктивной МД, о чем свидетельствует развертка вторичной структуры с помощью алгоритма DSSP. Элементы вторичной, в частности α -спирали, сохраняются в течение всего времени МД (рисунок 1.13).

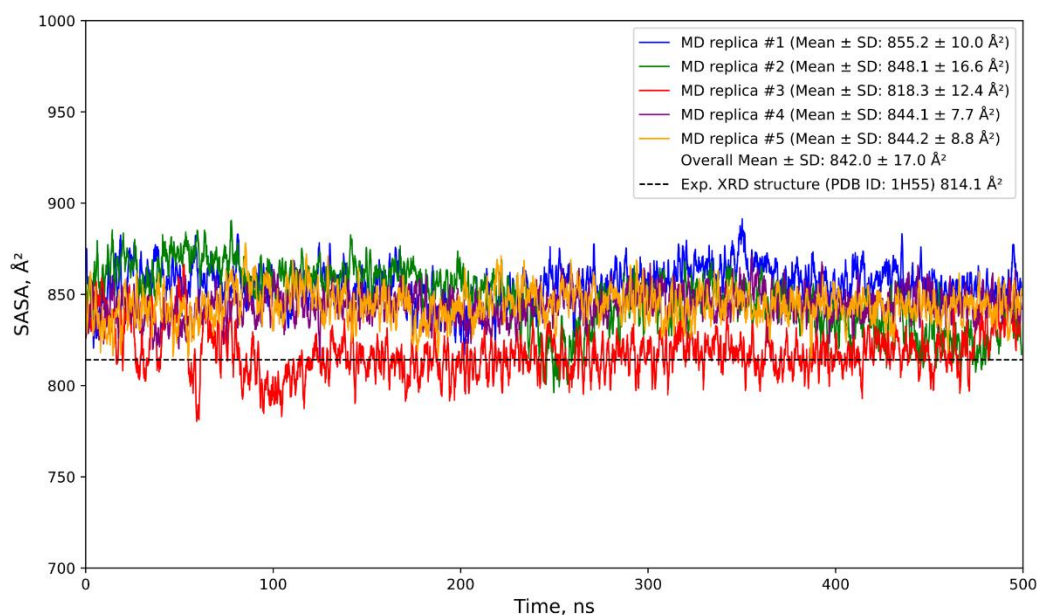


Рисунок 1.12 – Площадь, доступная растворителю, для гема в течение МД с ограниченным количеством растворителя

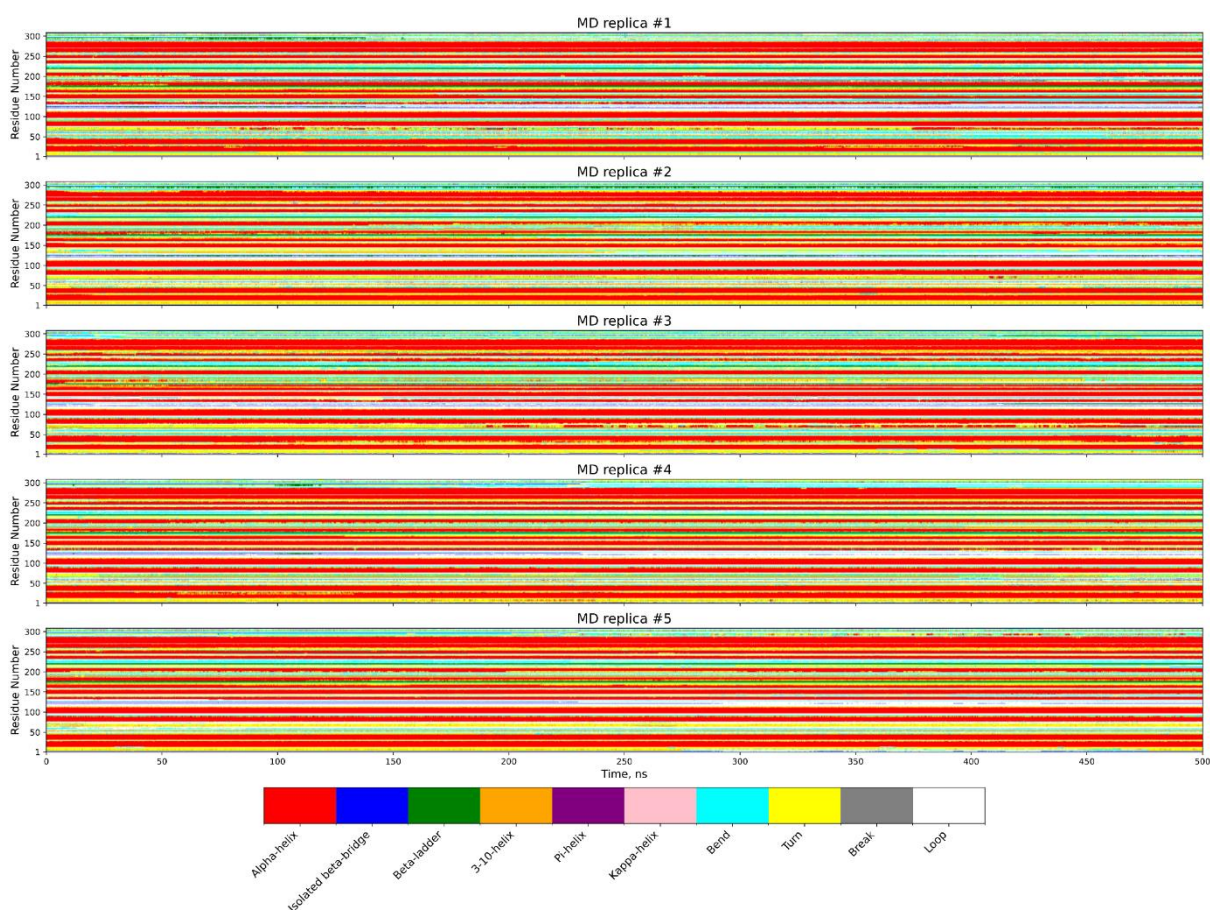


Рисунок 1.13 – Развертка отнесения аминокислотных остатков пероксидазы к различным элементам вторичной структуры с помощью алгоритма DSSP. Точкой показан каждый аминокислотный остаток, а цветом — тип вторичной структуры

Таким образом, был разработан протокол для моделирования адсорбции белка на различных поверхностях, включающий этап удаления значительного количества растворителя из системы. Во всех пяти независимых стартах МД была успешно зафиксирована адсорбция пероксидазы хрена на слюду. При этом сохраняются физические размеры белка, его вторичная структура остается неизменной, а в каждой из трех позиций белка на слюде гем остается открытым для растворителя и не перекрывается слюдой, что свидетельствует о сохранении доступности для субстрата.

По результатам работ, описанных выше в подразделах 1.1 и 1.2 готовится публикация, которая будет подана в редакцию на следующем этапе работ и представлена в составе пакета отчетной документации за второй этап проекта.

1.3. Подбор условий реконструкции ферментной системы для АСМ на основе данных спектрофотометрии

В соответствии с п.4.1. ТЗ выполнено доказательство работоспособности ферментной системы в условиях измерений альтернативными методами исследований, для этого условия реконструкции ферментной системы для АСМ-анализа (концентрация соли в буфере, соотношение количества молекул белка, субстрата и кофактора) воспроизведены в кювете для спектрофотометрического метода – традиционного метода исследования ферментных систем.

Материалы и методы

В работе использовались пероксидаза хрена (К.Ф. 1.11.1.7) (Sigma-Aldrich Chemical, США), ABTS - 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (Leap Chem Co., Россия), 33%-ный водный раствор перекиси водорода (Germeon), PBS (Pierce). Все реагенты имели аналитическую или спектроскопическую чистоту.

Концентрацию H_2O_2 ($\epsilon_{240}=43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) и пероксидазы хрена ($\epsilon_{403}= 1,03 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) в исходном растворе определяли УФ-видимым методом [52,53]. Все растворы готовились с использованием деионизированной воды (Millipore).

1.3.1. Результаты спектрофотометрических измерений

Сравнение активности пероксидазы хрена (ПХ) в стандартных и АСМ-условиях

Активность ПХ регистрировали с использованием хромогенного субстрата ABTS по изменению оптической плотности растворов во времени с помощью спектрофотометра ПЭ-5400УФ, РФ. Реакция основана на одноэлектронном окислении ABTS в соответствующий радикальный катион (рисунок 1.14), $ABTS^{\bullet+}$, имеющий максимум поглощения при 405 нм ($\epsilon_{405}=36\ 000\ M^{-1}\ cm^{-1}$) [54,55].

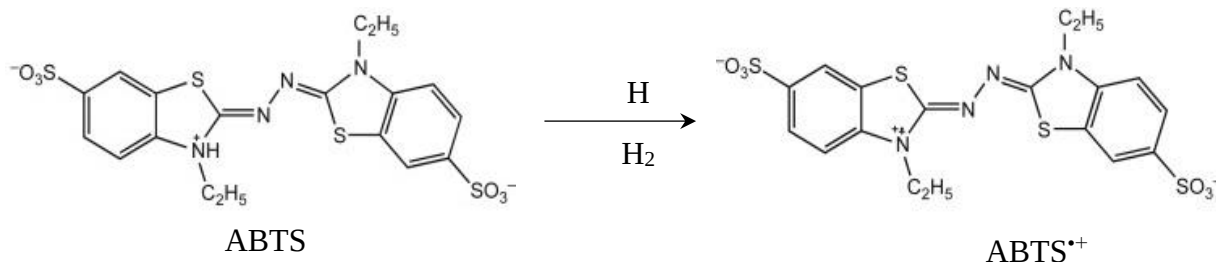


Рисунок 1.14 – Схема окисления ABTS

Реакции проводили в 3 мл кварцевой кювете с длиной пути 1 см, для чего в реакционную смесь, содержащую 2,95 мл 300 мкМ ABTS и 30 мкл 1 мкМ ПХ, добавляли 8,5 мкл 1М H_2O_2 для активации реакции [54].

На первом этапе сравнили, как протекает реакция в 10 мМ PBS pH 7,4 и 2 мМ PBS pH 7,2. Подбор условий необходим по нескольким причинам. Во-первых, для проведения реакции в АСМ-условиях необходимо использовать растворы с уменьшенным количеством солей, для этого оптимально подходит 2 мМ PBS pH 7,2. Во-вторых, реакция должна приходить к максимальным значениям в течение 10-15 минут, чтобы иметь возможность зарегистрировать изменения с помощью АСМ. Как показано на рисунке 1.15, меньшая скорость получения продукта окисления наблюдалась при использовании 2 мМ PBS pH 7,2. В связи с этим все дальнейшие реакции проводились в данном растворе.

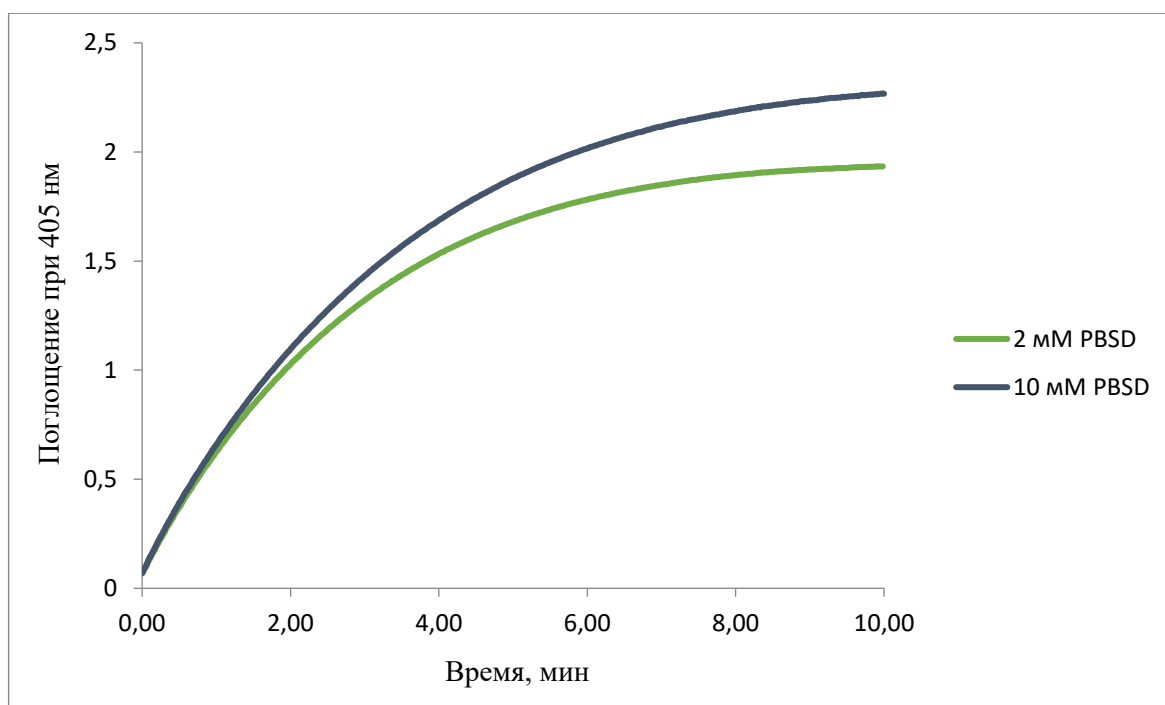


Рисунок 1.15 – График поглощения продукта окисления ABTS во времени при использовании PBSD различной концентрации, [ABTS] = 300 мкМ

1.3.2. Определение параметров каталитической реакции

Для определения кинетических характеристик фермента использовались те же концентрации ПХ и H_2O_2 , используемые в определении активности фермента, концентрация ABTS варьировалась от 0,3 мМ до 45 мМ. Все измерения проводили в трех повторах. Оптическую плотность при 405 нм регистрировали каждую секунду в течение 10 мин.

Начальная скорость реакции рассчитывалась по линейному участку каждой кривой ($R^2 > 0,98$).

Построение зависимости скорости реакции ПХ от концентрации ABTS проводилось с помощью программы OriginPro 8.0 (рисунок 1.16). Константа Михаэлиса (K_M) и максимальная скорость реакции ($V_{\max}$) для ПХ были получены с использованием уравнения Михаэлиса-Ментен:

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}.$$

Расчет K_{cat} проводился по следующей формуле: $V_{\max} = K_{\text{cat}} \cdot [\text{Et}]$ (K_{cat} – число оборотов фермента, т.е. сколько молекул субстрата превращены в продукт в единицу времени одной молекулой фермента; Et – общая концентрация фермента). Все полученные характеристики представлены в таблице 1.2.

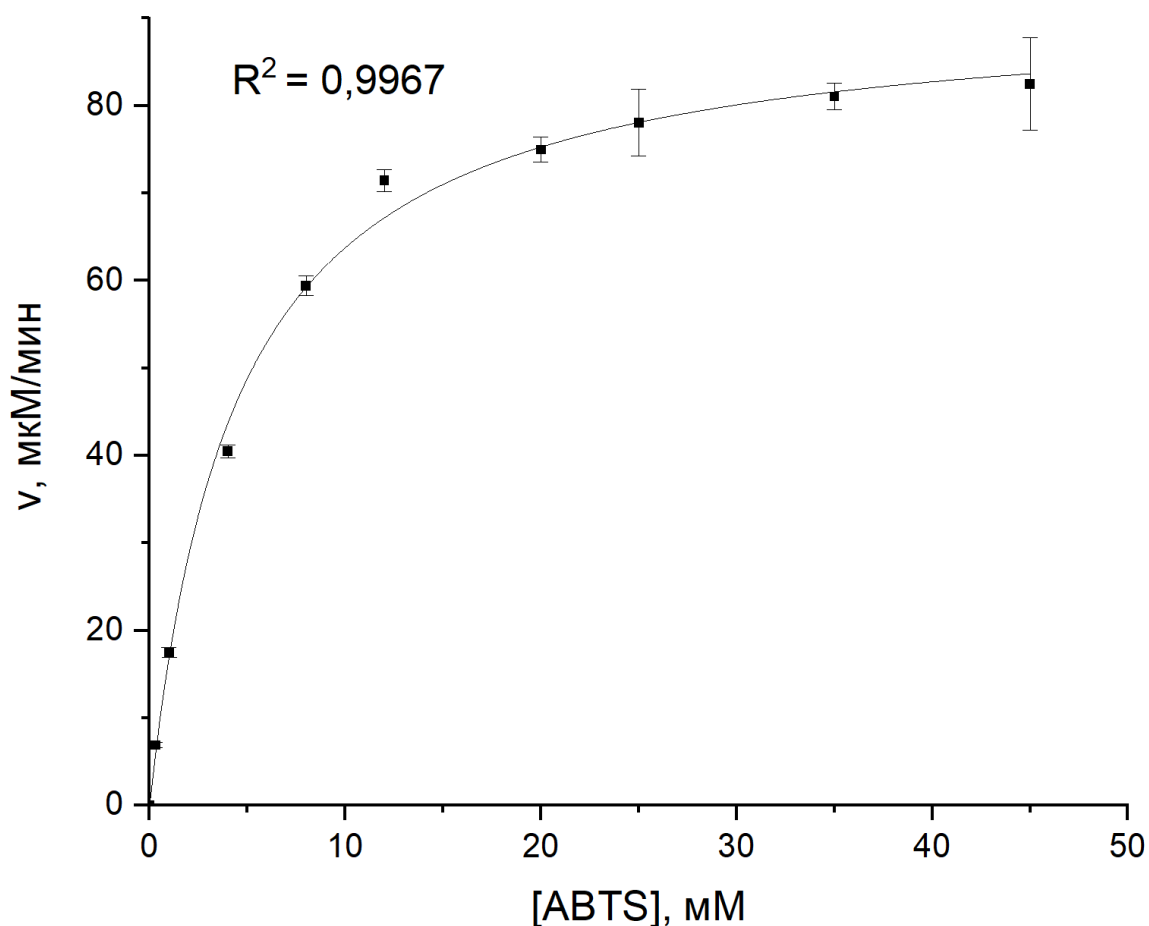


Рисунок 1.16 – Зависимость скорости реакции, катализируемой ПХ, от концентрации ABTS

Таблица 1.2 – Кинетические параметры реакции, характерные для ПХ, при использовании в качестве субстрата ABTS

K_M , мМ	$4,4 \pm 0,4$
$V_{\max}$, мкМ/мин	$92 \pm 1,8$
K_{cat} , с ⁻¹	153 ± 9
K_{cat}/K_M , мМ ⁻¹ с ⁻¹	35 ± 5

1.4. АСМ-визуализация ПХ в условиях функционирования

На данном этапе работ произведена реконструкция ферментной системы модельного белка на поверхности, в соответствии с п .4.1 ТЗ.

На основе литературных данных, представленных в п.1.5.1, а также опыта исследований определения каталитической активности фермента и свойств единичных биомолекул ВМЗ с помощью АСМ, проведенных ранее в лаборатории нанобиотехнологии ИБМХ [56], предложен подход визуализации системы ПХ для

дальнейшего мониторинга активности на основе измерений амплитуды флуктуаций высот в процессе функционального цикла.

Для реализации подхода предлагается схема (опыт), включающая следующие этапы визуализации: единичной молекулы ПХ в условиях отсутствия компонентов реакции; визуализация и измерение высот ПХ с добавлением субстрата (ABTS); визуализация и измерение высот с добавлением перекиси водорода (H_2O_2), выступающей активатором реакции; визуализация и измерение высот при добавлении ингибитора (NaN_3). Концентрация компонентов системы подтверждена результатами спектрофотометрического анализа, описанного в п. 1.3.1.

Для полученных данных была предложена схема (контроль) измерений, в которой проводилась инактивация сорбированной молекулы до этапа запуска реакции: сначала производилось сканирование единичной молекулы ПХ в отсутствие компонентов реакции; далее визуализация и измерение высот при добавлении ингибитора (NaN_3); после визуализация и измерение высот ПХ с добавлением субстрата (ABTS); и в завершении визуализация и измерение высот с добавлением перекиси (H_2O_2), выступающей активатором реакции.

Каждый компонент системы вносился в процессе непрерывного сканирования образца. В результате процесса сканирования формировался пул последовательных изображений каждой стадии. Так как в процессе обработки данных выявилась проблема миграции участков молекулы, обладающих наибольшими высотами (рисунок 1.17), то далее полученные изображения обрабатывались алгоритмом, описанным в п.1.5.2.

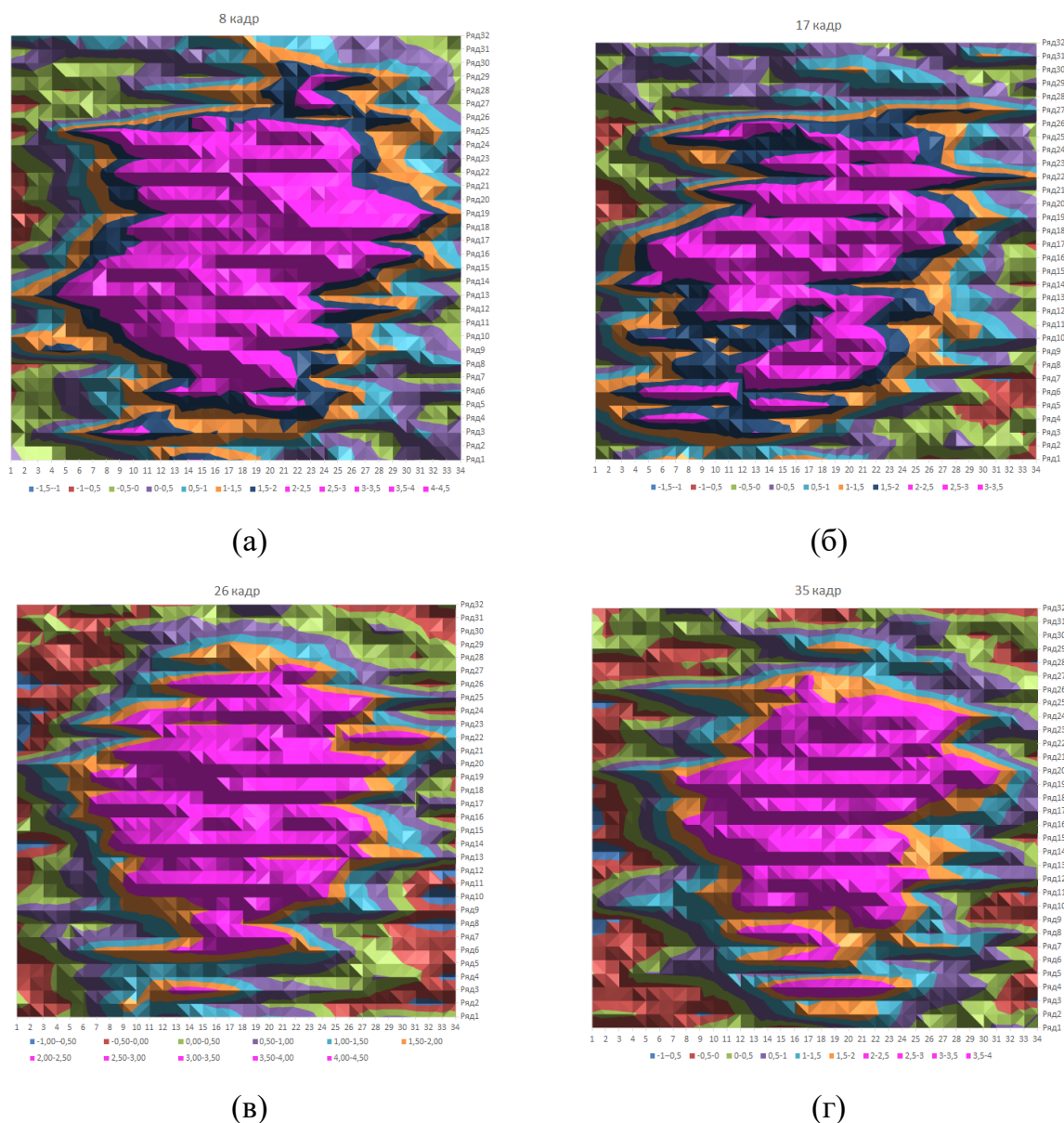


Рисунок 1.17 – Пример обработанных данных АСМ изображений, полученных в результате последовательного сканирования. (а) – изображение, полученное спустя 1,7 мин сканирования; (б) – изображение, полученное спустя 3,6 мин сканирования; (в) – изображение, полученное спустя 5,5 мин сканирования; (г) – изображение, полученное спустя 7,4 мин сканирования соответственно. Розовым участком выделены пиксели высот, превышающих значение 2 нм

1.5. Разработка алгоритма обработки АСМ-данных для определения функциональных свойств

В соответствии с п 4.1 ПГ выполнена разработка способов автоматической обработки данных. На первом этапе анализировались литературные источники, содержащие результаты исследования ферментных систем с помощью АСМ. Далее предложенный нами ранее способ выделения объектов на АСМ-изображении [57]

был адаптирован для решения задач проекта и разработан алгоритм, позволяющий автоматически обрабатывать коллекцию изображений, полученную для каждой стадии ферментной реакции в АСМ-исследовании.

1.5.1. Анализ литературных данных по применению АСМ для исследования ферментных систем

Методы АСМ, используемые для исследования ферментных систем, можно разделить на две большие группы: АСМ-визуализация и силовая спектроскопия на основе АСМ (АСМ-СС). Фокус анализа литературных источников был на результатах исследований ферментативных реакций, и таких исследований пока не так много, в отличие от АСМ-исследований механистических свойств отдельных молекул ферментов.

По результатам работ подготовлен обзор, поданный в печать и прошедший первый этап рецензии. Статья будет представлена в составе отчетной документации на следующем этапе работ по проекту.

Большинство исследований сосредоточены на системах отдельных ферментных молекул с использованием АСМ-СС, в которых исследуются процессы сворачивания/разворачивания белка. Принцип построения кривых силы основан на мониторинге отклонения зонда и смещения пьезоэлектрического элемента во время цикла приближения и освобождения зонда АСМ относительно поверхности образца [58]. Графически кривые силы показывают приложенную силу как функцию расстояния между кончиком зонда и образцом. Исследование динамических субангстремных перестроек атомов, участвующих в катализе, является экспериментально сложной задачей [59].

К сожалению, АСМ-СС обычно требует значительного времени получения данных по сравнению с АСМ-визуализацией, что ограничивает широкое применение этого подхода. Кроме того, этот режим не позволяет детализировать область ферментной глобулы, для которой регистрируется параметр. В результате АСМ-СС может предоставить дополнительную информацию о механизме ферментативной реакции и изменении структурных свойств молекулы в ходе реакции на уровне отдельных молекул, однако кинетические параметры реакции с помощью этой методики определить невозможно.

Исследование ферментных систем на основе данных АСМ-визуализации (т. е.

измерений топографии поверхности, метод, который использован в настоящей работе) началось достаточно давно [60]. В работе [60] были изучены колебания высоты молекул лизоцима с помощью АСМ в режиме таппинга в жидкости. Суть данной работы заключается в том, что измерения высоты производились путем фиксации зонда на монослое лизоцима без сканирования в течение 32 секунд. Данный метод позволил обнаружить колебания молекул лизоцима при наличии в системе субстрата на уровне 1 нм, однако в других системах, таких как буферный раствор белка, белок с ингибитором, белок с ингибитором и субстратом, колебания отсутствовали. Авторы статьи связывают колебания с возможными конформационными изменениями лизоцима, вызванными гидрофобными взаимодействиями при гидролизе. Было рассчитано, что для изгиба кантилевера на 1 нм требуется сила 50 пН, а энергия, связанная с этим изгибом, составляет примерно 0,1 эВ. Энтальпия гидролиза составляет около 0,5 эВ на молекулу субстрата, что достаточно для изгиба кантилевера. Эти измерения указывают на то, что наблюдаемые скачки измеряемой высоты в присутствии субстрата, вероятно, обусловлены ферментативной активностью лизоцима.

Хотя АСМ успешно применялась для визуализации белковых структур, ранние исследования, сосредоточенные на динамике изменений белковых глобул в ходе реакции, были затруднены низкой скоростью сканирования АСМ. Скорость сканирования стандартного оборудования составляла в среднем одну строку в секунду, поэтому для получения одного изображения с требуемым разрешением требовалось до нескольких минут, тогда как биологические реакции протекают в миллисекундных и более коротких временных масштабах. Динамические процессы в белковых молекулах происходят в нескольких временных масштабах: от десятков фемтосекунд до сотен секунд [61]. Поэтому улучшение временного разрешения АСМ является ключом к визуализации динамических и подвижных биологических молекул и четкому разрешению их детальных характеристик [62].

Значительный прорыв в изучении биологических процессов был достигнут, поскольку набор инструментов был достигнут с разработкой ряда инструментов и проектированием высокоскоростных систем на основе АСМ (BC-АСМ). Другим примером использования BC-АСМ является визуализация расщепления целевой ДНК комплексом CRISPR/Cas9 в течение жизненного цикла [63]. Данные AFM

предоставили данные о функциях комплекса CRISPR/Cas9, включая сборку комплекса, поиск целевой ДНК, расщепление цепи и высвобождение продукта, что улучшило понимание механизма действия инструмента редактирования генов. Особый интерес представляет то, что это исследование продемонстрировало колебание домена HNH нуклеазы Cas9, который отвечает за расщепление сайта, при связывании с целевой ДНК и показало дифференциацию между активными и стабильными закрытыми конформациями одной молекулы Cas9 и комплекса Cas9–РНК на поверхности слюды.

Другим примером использования ВС-АСМ является изучение структурной динамики ламинина-111 и ламинина-332 в физиологических условиях [64]. Результаты показывают, что домен спиральной спирали ламинина-332 высокодинамично изогнут вокруг определенного центрального молекулярного шарнира, тогда как домены спиральной спирали ламинина-111 сохраняют свою относительно стабильную S-образную конфигурацию. Кроме того, были обнаружены структурные флуктуации в кластере С-концевых доменов LG ламинина-111 и ламинина-332 между компактной и открытой конформациями, которые могут играть роль в регуляции связывания адгезионных рецепторов. Таким образом, было продемонстрировано, что ВС-АСМ может выявлять специфичные для изоформ конформационные изменения, происходящие в различных доменах ламинина, тем самым предоставляя новое понимание динамической структуры и специфической сборки ламинина, влияющих на функциональные свойства цепи.

Анализ данных АСМ-визуализации, полученных с помощью ВС-АСМ, существенно отличается от анализа ранее использованных данных, полученных с использованием стандартного оборудования. Например, в исследовании [56] колебания высоты отдельных молекул CYP102A1 регистрировались на каждом этапе каталитического цикла фермента при гидроксировании лауриновой кислоты с использованием адаптированного метода, описанного в [60]. На каждом этапе регистрировались АСМ-изображения не менее десяти различных молекул фермента. Сначала регистрировался рельеф поверхности путем выбора объекта на изображении, высота которого соответствовала высоте белковой глобулы. Затем во время АСМ-визуализации отключалось сканирование по медленной оси Оу. Таким образом, изображение получалось в виде «сечений» для каждой визуализированной

молекулы, т. е. регистрировалась временная развертка одной линии сечения изображения топографии. Траектория колебаний максимальной высоты этой молекулы в зависимости от времени $h_{\max}(t)$ определялась на изображении сечений одиночной молекулы. Для сравнительного анализа траекторий разных молекул была проведена их линейная подгонка. По результату такого воздействия вычислялась величина (амплитуда колебаний высоты для одиночной молекулы за временной интервал). К сожалению, время наблюдения для каждой молекулы не превышало 30–40 с. Зарегистрировать сигнал от одиночной молекулы в течение более длительного периода времени не удалось, предположительно из-за дрейфа субстрата. Поэтому для одной молекулы не удалось обнаружить изменения высоты молекулы на всех стадиях каталитического цикла, поэтому в данной работе представлены данные, усредненные по результатам измерения разных молекул на разных стадиях каталитического цикла.

В работе [56] измерения проводились с помощью атомно-силового микроскопа Dimension 3100 (Bruker, США). На сегодняшний день появилась новая модификация оборудования — атомно-силовой микроскоп Dimension FastScan (Bruker, США), обладающий уникальной функцией позиционирования NanoTrack™. Область сканирования может быть позиционирована и удерживаться для индивидуально выбранных объектов в пределах одного АСМ-изображения. Получается коллекция изображений, анализ которых для каждого сканирования позволяет определить параметры визуализированной ферментной глобулы в процессе ее функционирования. Так, можно выделить кончик молекулы или область интереса для визуализированного объекта, предположительно связанную с активным центром молекулы фермента. Можно отслеживать максимальную высоту белковой глобулы в течение длительного времени [57], регистрируя высоту каждого пикселя и определяя соотношение между ними. Этот же подход был использован в настоящей работе, но для обеспечения возможности автоматизации процесса был разработан специальный алгоритм.

1.5.2. Алгоритм обработки данных, полученных с помощью АСМ Dimension с функцией NanoTrack™

В соответствии с п.4.1. ТЗ выполнена разработка способов автоматической обработки данных. Работы выполнены для наблюдения за отдельными стадиями или

промежуточными продуктами биохимических реакций в экспериментах с одной молекулой, что требует развития методологии получения и обработки АСМ-изображений. Методика АСМ-мониторинга флуктуаций высот единичных молекул разработана с применением функции позиционирования NanoTrack™, осуществленной на базе АСМ Dimension FastScan («Bruker», США). При сканировании происходит позиционирование области сканирования на отдельных выбранных объектах в пределах одного АСМ-изображения (см. рисунок 1.18). При обработке пула последовательных изображений необходим подбор параметров исходя из пространственных характеристик визуализированной глобулы фермента. Параметры могут содержать как целевую область визуализируемого объекта, которая, предположительно, связана с активным центром молекулы фермента; так и область молекулы целиком. В случае наблюдения за определённой частью молекулы возможно регистрировать более детальные изменения флуктуаций высот в процессе каталитического цикла, чем в случае наблюдения за другим параметром — максимальной высотой белковой глобулы в одной точке. Разработанный алгоритм обработки АСМ-изображений позволяет определить статистический разброс в величине высоты молекул по выделенному участку визуализированной белковой глобулы во времени, либо стадиях каталитического цикла. Разработанный алгоритм будет использован при изучении ферментативных реакций на уровне единичных молекул.

Область сканирования может быть позиционирована и сохранена для отдельных выбранных объектов в пределах одного АСМ-изображения (рисунок 1.18 (a)). Формируется коллекция изображений, анализ которых для каждого скана позволяет определить параметры визуализированной ферментной глобулы в процессе ее функционирования. Таким образом, можно выделить вершину молекулы (рисунок 1.18 (b)) или иную интересующую для визуализированного объекта, предположительно связанную с активным центром молекулы фермента. Можно отслеживать максимальную высоту белковой глобулы в течение длительного времени [9], регистрируя высоту каждого пикселя и определяя соотношение между ними. Для настоящей работы принцип, предложенный в [57] был адаптирован для решения задачи проекта, автоматизирован с помощью Python, введена функция установки порогов отсечения (по высоте и по площади),

предоставлена возможность одновременного получения сведений о высоте, объемах и площадях, усредненных значения, экспорт в виде таблицы и предварительных графиков.

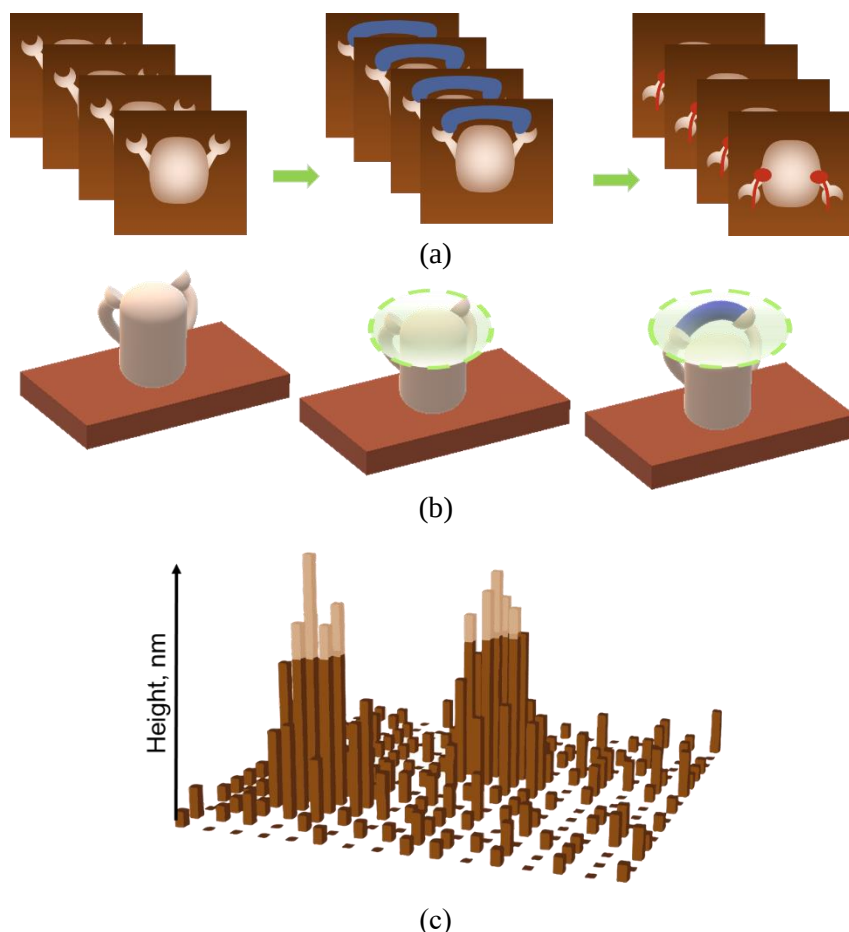
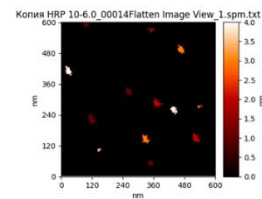
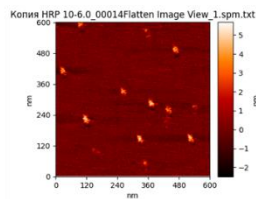


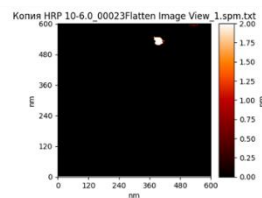
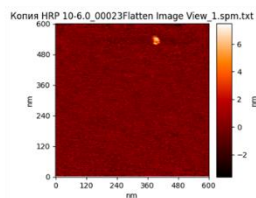
Рисунок 1.18 – Данные АСМ для регистрации изменений высоты молекул во время функциональной активности с использованием функции позиционирования NanoTrack™. (а) Первый шаг — формирование коллекции изображений для отдельных выбранных объектов. Коллекция создается для каждого исследования каталитического круга. (б) Второй шаг — выбор интересующей области для визуализируемого объекта (отмечена зеленым контуром). (с) Третий шаг — обработка данных. Высота каждого пикселя и связь между ними могут быть определены с помощью специального скрипта. Рассматривается только кончик молекулы, а высота пикселей над определенным уровнем (светлая область на (с)) используется для расчета. Предполагается, что отношение высоты пикселей на изображении отдельной молекулы может быть связано с активностью молекулы во время работы. Сравнение данных, полученных для различных каталитических исследований, позволяет получить связи между высотой и активностью на уровне отдельной молекулы

В результате применения алгоритма для каждого скана был получен «двойник», содержащий информацию об объектах, выделенных по рекомендации величины высоты и площади (см. рисунок 1.19)

1-ый скан



10-ый скан



19-ый скан

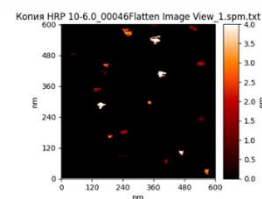
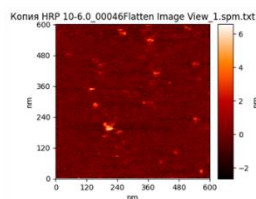


Рисунок 1.19 – Пример АСМ-изображений после применения алгоритма обработки данных в части выделения целевых объектов. Левая панель – исходное изображение, правая панель – соответствующее изображение с объектами – молекулами, выделенными для обсчета

Для каждой стадии реакции пул изображений обрабатывается и выводится график зависимости колебаний высоты пикселей, составляющих верхушку молекулы (см. рисунок 1.19) от времени. Например, на рисунке 1.20 приведен график, полученный на начальной стадии реакции – визуализации молекул ПХ в отсутствие компонентов реакции.

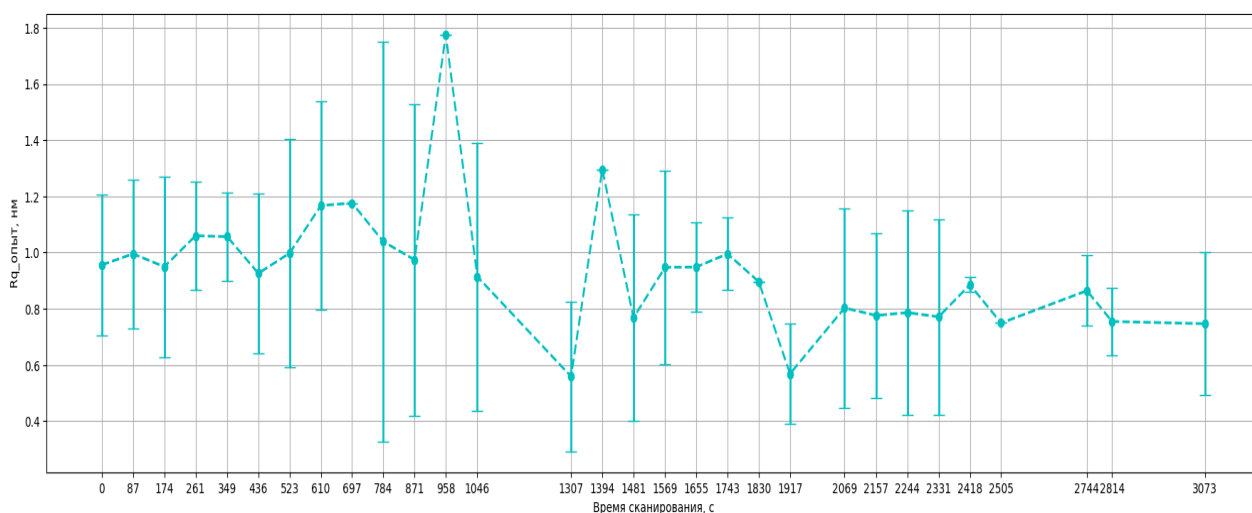


Рисунок 1.20 – Пример графика, отражающего колебание высоты молекул в отсутствие компонентов реакции. По оси Ох – время, секунды, по оси Оу – значения отклонения высоты «верхушки» молекулы

1.6. Разработка Протокола оценки функциональной активности единичной молекулы фермента по АСМ-данным для случая модельного объекта

В соответствии с п 5.1 ТЗ разработка протокола оценки функциональной активности единичной молекулы фермента по АСМ-данным должны соответствовать определенным требованиям, выполнение которых описано ниже.

Требование «работа с модельным объектом должна выполняться с использованием активной и инактивированной формы фермента» выполнена при составлении дизайна эксперимента. Как видно из рисунка 1.21, реализовано две схемы – одна из которой включает стадию инактивации фермента с помощью ингибитора;

Требование «реконструкция ферментной системы должна быть выполнена в условиях, близких к нативным» выполнено и АСМ-визуализация проведено в жидкой среде в условиях измерений, проверенных независимо спектрофотометрическим методом (см подраздел 1.3).

Требование «протокол оценки функциональной активности должен учитывать олигомерное состояние белка на поверхности» выполнено – при использовании разработанного алгоритма для обработки данных предусмотрены функция автоматического выделения целевых объектов по параметру высоты и площади, что позволяет задать целевые объекты в нужно олигомерном состоянии (см. подраздел 1.1.3 и 1.5).

Требование «алгоритмы автоматической обработки данных должны включать возможность выбора объектов для наблюдений из совокупности АСМ-визуализированных объектов» выполнено см выше и подраздел 1.5.

Разработанный протокол представлен в Приложении А.

Работа с модельным объектом выполнена с использованием активной и инактивированной формы фермента, реконструкция ферментной системы выполнена в условиях, близких к нативным, в соответствии с п.5.1 технического задания.

Пример результатов АСМ-визуализации модельного белка ПХ с применением разработанного Протокола приведены на рисунке 1.21. Как видно из рисунка в отсутствие компонентов реакции высоты наблюдаемых молекул не меньше, чем при добавлении субстрата и кофактора (левая панель, серые и голубые боксы), а в случае инактивированной формы высота молекул на первой стадии выше, чем на последующих стадиях (правая панель, контроль, серые боксы). На основании данных эксперимента были получены референсные значения уровней шума измеряемых сигналов как опытной, так и контрольной схемы измерений, в соответствии с п. 3.1 технического задания, пример которых приведен на рисунке 1.22.

Полученные результаты измерений в дальнейшем будут использованы как параметры изменения активности в процессе каталитического фермента в зависимости от времени и (или) стадии функционального процесса.

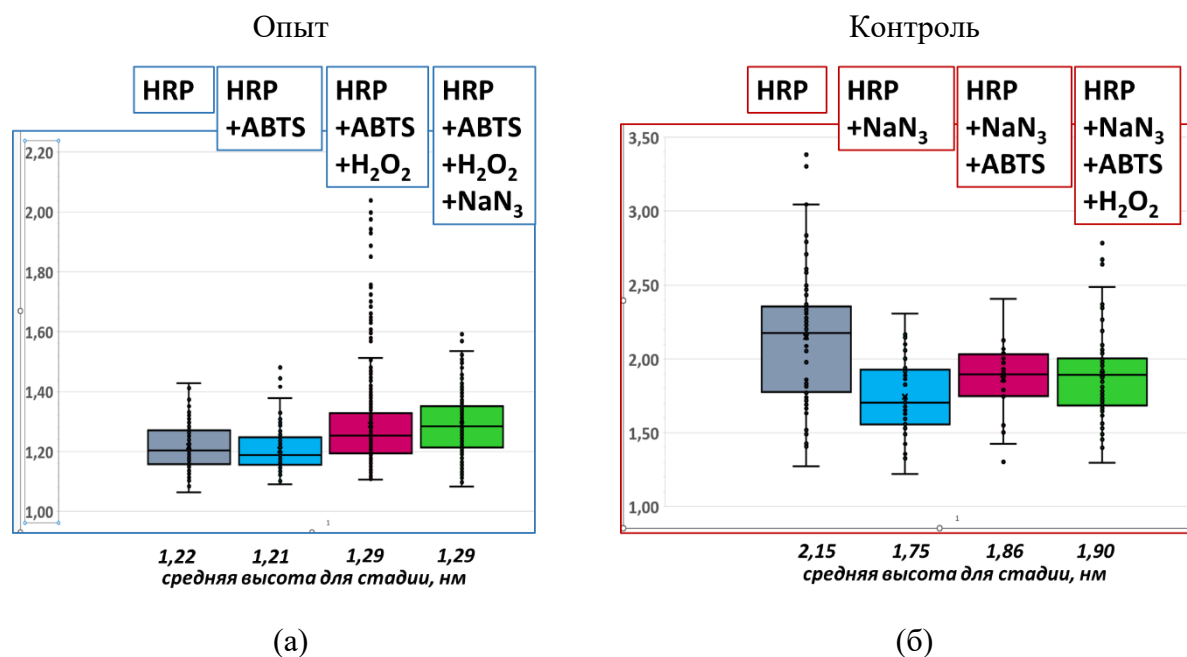


Рисунок 1.21 – Оценка функциональной активности фермента на разных стадиях каталитического цикла по АСМ-данным (а) опыт – классическая схема каталитической реакции фермента, где ингибирование происходило на последней стадии цикла (б) контроль – схема эксперимента, в которой ингибирование происходило на второй стадии измерений



Рисунок 1.22 – Пример определения референсных значений колебаний высоты молекулы. Стандартное отклонение амплитуды колебания заданной области в пределах одной молекулы составило 0,22 нм. Стандартное отклонение амплитуды колебания заданной области в пределах контрольной зоны (подложка без белка) – 0,12 нм. Область обсчета, выделенная алгоритмом обработки в обоих случаях – составила 16x16 pix

1.7. Заключение к Разделу 1

В результате выполненных работ по п.1.1 ПГ и 6.1.2 ТЗ разработан Протокол оценки функциональной активности единичной молекулы фермента по АСМ-данным для случая модельного объекта. Проведенные работы соответствуют п. 3.1 ТЗ – получены результаты АСМ-визуализации модельного белка в условиях ферментной активности, включающие: сведения об олигомерном состоянии белка; рекомендации по выбору объектов наблюдения на поверхности; референсные значения уровней шума измеряемых сигналов.

В ходе выполнения работ для подготовки образцов использовано новое общелабораторное оборудование (термостат, центрифуга-встряхиватель, система очистки воды, аналитические весы и термошейкер-инкубатор), закупленное по договорам №24-3527 от 18.10.24 с ООО «Пушинские лаборатории»; №122 от 22.11.24 с ООО «Русхимбио», №57/223 от 30.08.24 с ООО «Русмедторг», №66/223 от 05.09.24 с ООО «БиоТех» и №68/223 от 06.09.24 с ООО «Пушинские лаборатории».

Работы соответствуют п.п 4.1 и 5.1 ТЗ и выполнены в полном объеме.

По результатам работы опубликованы две публикации:

1.Ponomarenko, E.A.; Ivanov, Y.D.; Valueva, A.A.; Pleshakova, T.O.; Zgoda, V.G.; Vavilov, N.E.; Ilgisonis, E.V.; Lisitsa, A.V.; Archakov, A.I. From Proteomics to the Analysis of Single Protein Molecules. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 10308. <https://doi.org/10.3390/ijms251910308> (Публикация № 1 в составе пакета отчетной документации).

2.Kraevsky, S.V.; Valueva, A.A.; Ershova, M.O.; Shumov, I.D.; Ivanova, I.A.; Kanashenko, S.L.; Ryazantsev, I.A.; Ivanov, Y.D.; Pleshakova, T.O. Using the Radial Distribution Function to Analyze Atomic Force Microscopy Images of Colloidal Systems. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26*, 210. <https://doi.org/10.3390/ijms26010210>. (Публикация № 9 в составе пакета отчетной документации).

Также подготовлен и подан в печать обзор «AFM for studying the functional activity of enzymes», который находится в издании *Biomolecules* на втором этапе рецензии и будет представлен в составе отчета на следующем этапе работ.

2. РАЗРАБОТКА ПРОГРАММНО-ТЕХНИЧЕСКИХ РЕШЕНИЙ ДЛЯ СИСТЕМЫ РЕГИСТРАЦИИ ФЕРМЕНТНОЙ АКТИВНОСТИ С ПОМОЩЬЮ НАНОПОРОВОГО ДЕТЕКТОРА

В соответствии с пунктом 1.2. ПГ и 3.2 ПГ разработана принципиальная схема нанопорового молекулярного детектора как основы системы регистрации функциональной активности фермента. В рамках разработки схемы спроектирована принципиальная электрическая схема нанопорового детектора. Эта электрическая схема включает в себя четыре операционных усилителя (ОУ) и один цифровой переменный резистор, а также вспомогательные резисторы и конденсаторы, и может быть условно разделена на четыре части: цифровой переменный резистор, дифференциальный усилитель, фильтр второго порядка и первичный каскад усиления. Также схема нанопорового детектора включает в себя разработанную на отчетном этапе специализированную измерительную ячейку (кювету), разделенную на два отсека перегородкой с нанопорой. Работоспособность разработанной схемы продемонстрирована в статье, опубликованной по результатам работ, выполненных на отчетном этапе:

Ivanov, Y.D.; Vinogradova, A.V.; Nevedrova, E.D.; Ableev, A.N.; Kozlov, A.F.; Shumov, I.D.; Ziborov, V.S.; Afonin, O.N.; Vaulin, N.V.; Lebedev, D.V. Bukatin A.S., Afonicheva P.K., Mukhin I.S., Usanov S.A., Archakov A.I. Solid-State Nanopore-Based Nanosystem for Registration of Enzymatic Activity of a Single Molecule of Cytochrome P450 BM3. //International Journal of Molecular Sciences. — 2024. — V. 25. — No. 19. — 10864. DOI: 10.3390/ijms251910864 (Web of Science Q1, Scopus Q1).

В опубликованной по результатам выполненных работ статье экспериментально продемонстрирована работоспособность разработанной схемы и ее пригодность для измерения малых токов, в том числе порядка нескольких пА (<10 пА).

2.1. Нанопоровый детектор как инструмент для исследования единичных молекул ферментов

Активность фермента по отношению к субстрату является ключевым характеристическим параметром любой ферментной системы [65]. Физические принципы, лежащие в основе большинства методов, которые обычно используются в энзимологии (и, более того, в исследовании белков в целом), основаны на

получении сигналов от большого ансамбля молекул фермента. Соответственно, ферментативная активность, измеряемая этими методами, представляет собой величину, которая усредняется по указанному выше молекулярному ансамблю [66]. При этом ранее Иванов и др. показали, что в одном и том же образце физико-химические свойства разных молекул одного и того же фермента существенно различаются [67]. Это было достигнуто с помощью так называемых молекулярных детекторов, которые позволяют исследователям сосредоточиться на отдельных молекулах фермента [68].

В настоящее время определение физико-химических свойств отдельных молекул ферментов стало одним из приоритетных направлений современной биохимии. Исследования ферментов отдельных молекул получили название энзимологии единичных молекул [69]. Ключевой выгодной особенностью этого подхода является прямое определение физико-химических свойств отдельных макромолекул отдельных ферментов; эти данные не усредняются по большому ансамблю макромолекул — в отличие от макроскопических методов [67]. Методы, используемые в энзимологии единичных молекул, позволяют исследователям осуществлять прямой мониторинг функционирования ферментов на различных стадиях их каталитического цикла, характеризуя их промежуточные состояния [70].

В настоящее время разрабатывается альтернативный подход на основе нанопор для изучения функционирования молекул отдельных ферментов [71]. Этот подход на основе нанопор не требует иммобилизации исследуемого фермента. В этом подходе нанопора с размером, сопоставимым с размером фермента, формируется в диафрагме, а исследуемый фермент ограничивается в нанопоре. Диафрагма помещается между двумя камерами (называемыми цис- и транс-соответственно), которые заполнены раствором электролита. Приложение напряжения к камерам, разделенным нанопорой с ограниченной молекулой фермента, индуцирует ионный ток через нанопору. Функционирование фермента приводит к колебаниям измеряемого ионного тока [72–77].

Для этой цели часто используют биологические (природные) нанопоры [76]. Эти нанопоры получают с использованием порообразующих белков, таких как α -гемолизин или цитолизин А [71,76]. При взаимодействии единичных молекул белков с бислойной липидной мембраной образуется нанопора строго заданного

размера. Достоинства детекторов на базе биологических нанопор заключается в высокой воспроизводимости характеристик нанопор, и относительно простоте и доступные процедуры их формирования. Также, большим преимуществом белковых нанопор является то, что их можно конструировать с помощью передовых методов молекулярной биологии, таких как мутагенез [78]. Поэтому можно вносить четко определенные локальные изменения в структуру порообразующего белка — например, заменяя одну аминокислотную группу на другую или путем связывания малых органических молекул в определенными участками белковой поры. Используя такие методы, в литературе приводятся примеры разработанных биосенсоров на базе нанопор из α -гемолизина, например, с гидрофобными группами, которые связывают органические молекулы [79] или с цепью, содержащей связанный биотин для изучения биотин-связывающих белков [80]. Белковые нанопоры, тем не менее, имеют два недостатка. Первый из них — ограниченный размер поры, который определяется структурой порообразующего белка [71]. Этот фактор существенно ограничивает список ферментов, доступных для изучения с использованием биологических нанопор. Второй недостаток биологических нанопор — их ограниченная химическая и временная стабильность [71].

В качестве альтернативы биологическим нанопорам были предложены искусственные твердотельные нанопоры для изучения отдельных молекул белков [71,81–83]. Эти нанопоры могут быть сформированы в мембранах из нитрида кремния (Si_3N_4 , или в общем виде Si_xN_y) или диоксида кремния [84] с помощью коммерчески доступного электронного микроскопа [85,86]. В качестве основы используются структуры Si_xN_y нанометровой толщины, полученные методом нанолитографии. Этот метод был назван электронно-лучевым сверлением (EBD) [85,87]. Метод EBD основан на стандартной кремниевой технологии [85]. Соответственно, EBD является универсальным и относительно простым, что позволяет изготавливать устройства на основе нанопор как для биомедицинских исследований [71,88], так и для квантовой электроники [86].

Исходя из вышеизложенного и в соответствии с п. 5.2 технического задания, в ходе выполнения работ по настоящему проекту на отчетном этапе была разработана схема, позволяющая использовать в нанопоровом детекторе как

неорганические нанопоры на базе нитрида кремния SixNy, так и с использованием органической полимерной мембраны, позволяющей использовать белковые нанопоры. Общая схема этого детектора описана в статье, опубликованной по результатам работ на отчетном этапе [89]. В соответствии с этой схемой, нанопоровый детектор включал измерительную ячейку с двумя камерами (цис-камеру и транс-камеру) объемом по 700 мкл каждая. Эти камеры разделены между собой чипом SixNy либо полимерной мембраной, в которых формирована нанопора необходимого размера. Перед экспериментом обе камеры были заполняют сверхчистой водой. В ходе эксперимента сверхчистую воду заменяют на рабочий буферный раствор. После каждого измерения чип промывают сверхчистой водой.

При измерениях к камерам прикладывают постоянное напряжение с использованием электродов Ag/AgCl. Ионный ток измеряют с помощью усилителя с низким ($\sim 0,5$ пА) внутренним уровнем шума и регистрируют с помощью 16-битного аналого-цифрового преобразователя. Сигнал обрабатывают с использованием фильтра Баттерворта с частотой 1 кГц. Для исключения влияния внешних электромагнитных помех вся измерительная схема детектора помещалась в клетку Фарадея.

2.2. Разработка электронных блоков для измерения сигнала

2.2.1. Обоснование принципа проектирования электронно-измерительной части нанопроволочного детектора

Как отмечено выше, системы измерения тока — включая и сверхмалые токи в диапазоне от до 10^{-8} А — чрезвычайно важны для изучения физических явлений в том числе и в биомедицинских исследованиях [76,90,91]. Измерения тока требуют компактной измерительной части с низким уровнем шума входного тока. Для изучения функционирования единичных молекул белков необходимо регистрировать очень малые токи — порядка 10 пА [76]. Эти токи обычно регистрируются на частоте 10 кГц [91]. Полоса пропускания в 10 кГц является компромиссом с нижней границей для достижения меньшего шума при измерении [91], поскольку всегда желательно, при возможности, увеличить полосу пропускания.

Измерения малых токов могут выполняться с помощью пассивных компонентов в конфигурации шунтирования или обратной связи по отношению к

активному усилителю с использованием резисторов в качестве пассивных чувствительных элементов [92].

Хотя шунтирующие структуры обеспечивают простую реализацию, они вызывают высокую ошибку напряжения смещения и не могут обеспечить измерение напряжения зажима. Поэтому в типичных системах в качестве головного каскада используется операционный усилитель (ОУ) с резистивной обратной связью. В дополнение к этому используется еще один подход, заключающийся в использовании усилителя тока для усиления входного тока, устраняющего источники шума на следующих каскадах.

Таким образом, идеальная система измерения низкого тока обеспечивает следующие функции: измерение малых токов с максимальной доступной полосой пропускания и чувствительностью, измерение двунаправленных токов и контроль напряжения на входном узле (режим измерения тока при фиксированном напряжении).

2.2.2. Принципиальная схема электронно-измерительной части нанопорового детектора

Исходя из изложенного выше в предыдущем разделе, измерительная аппаратура, способная зарегистрировать функционирование единичных молекул фермента, является по своей сути сверхчувствительным амперметром. Принципиальная схема такого сверхчувствительного амперметра представлена на рисунке 2.1.

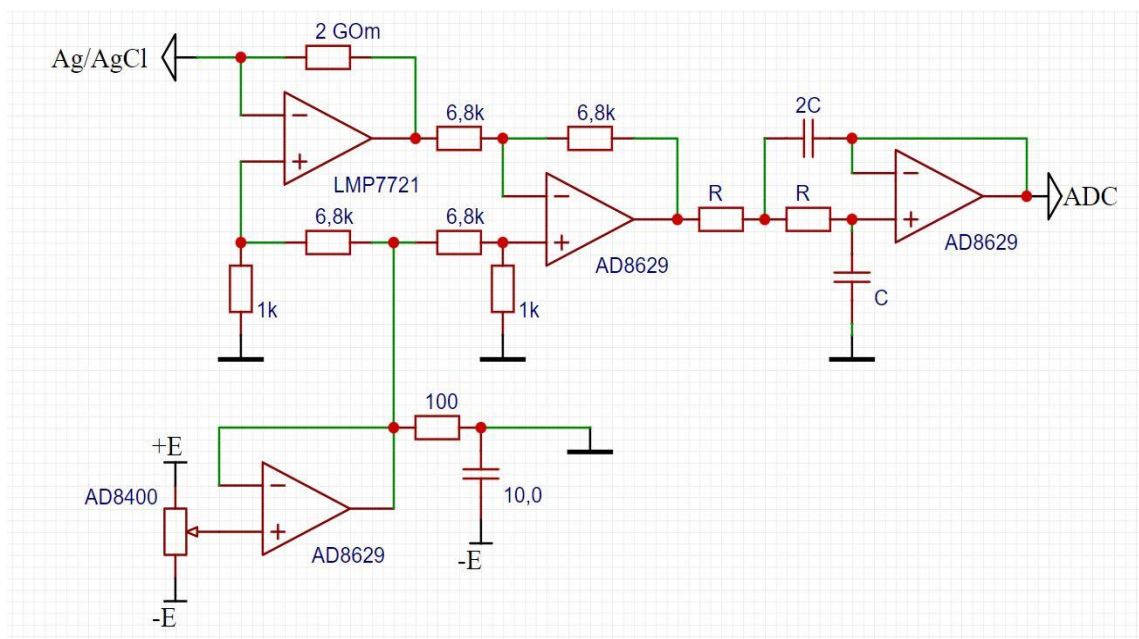


Рисунок 2.1 — Принципиальная схема электрической части нанопорового детектора — сверхчувствительного амперметра

Эта схема включает в себя четыре операционных усилителя и один цифровой переменный резистор, а также несколько резисторов и конденсаторов, выступающих в роле обвязки, задающей необходимые параметры цепи. Такую схему можно условно разделить на четыре части: цифровой переменный резистор (подключенный как повторитель напряжения для формирования средней точки, чтобы исключить потребность в биполярном питании общей схемы), дифференциальный усилитель, фильтр второго порядка и первичный каскад усиления.

2.2.3. Выбор элементной базы и расчет шумовых параметров

В электронных схемах существует множество источников шума, которые негативно влияют на рабочие характеристики системы [93–97] (тепловой шум, дробовой шум, шум мерцания и шумы окружающей среды [98]). Таким образом, измерение малых токов в диапазоне пА и фА является сложной задачей из-за возникновения различных типов шумов в измерительных цепях, которые порождены не идеальностью электронных компонентов, влиянием измерительной цепи на измеряемую схему, наличием микрофонного эффекта на рабочем столе и механическими воздействия на него во время проведения замеров, а также качеством изготовления печатной платы и монтажа компонентов на ней. Все эти факторы в той или иной степени влияют на количество генерируемых шумов, что снижает отношения сигнал/шум.

В резисторах и на р-п переходах возникают напряжения и токи шумов, обусловленные тепловым движением носителей зарядов в случае резистора и флуктуациями электрического тока при прохождении дискретных носителей зарядов в случае р-п перехода [89].

Резистор R генерирует напряжение шумов $u_{R,r}$ с плотностью шумового напряжения [94,95,97]:

$$|u_{R,r}(f)|^2 = 4kTR, \quad (1)$$

где $k = 1.38 \times 10^{-23}$ ВАс/К – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура резистора, К. Плотность шумового напряжения пропорциональна температуре эксплуатации и номиналу резистора. Такой шум называют тепловым.

Р-п переход, генерирует шумовой ток $i_{D,r}$ с плотностью шумового тока [94–97]:

$$|i_{D,r}(f)|^2 = 2qI_D, \quad (2)$$

где $q = 1,6 \cdot 10^{-19}$ Ас — заряд электрона. Плотность шумового тока пропорциональна току I_D через р-п переход. Такой шум называют дробовым.

В резисторах и р-п переходах существует еще один вид шума. Он отличается тем, что его плотность обратно пропорциональна частоте, он называется фликкер-шум [99]. У резисторов фликкер-шум пренебрежимо мал, а для р-п перехода его плотность описывается выражением:

$$|i_{D,r(1/f)}(f)|^2 = \frac{k_{(1/f)} I_D^{\gamma_{(1/f)}}}{f}, \quad (3)$$

где $k_{(1/f)}$ и $\gamma_{(1/f)} \approx 1 \dots 2$ экспериментально полученные константы.

Еще одна составляющая помех — это трибоэлектрический эффект [100], который заключается в появлении разности потенциалов между движущихся друг относительно друга токопроводящей жилы и изоляции провода. Полученная таким образом разность потенциалов вызывает протекание тока, называемого трибоэлектрическим [100]. Для поливинилхлоридной (ПВХ) и полиэтиленовой изоляции кабеля значение трибоэлектрического тока составляет около сотен пА. Избыточный трибоэлектрический ток можно свести к минимуму, уменьшив длину кабеля от источника до амперметра или заменив провод на специализированный коаксиальный или биаксиальный кабель.

Кроме того, следует проявлять особую осторожность при монтаже и эксплуатации печатной платы, чтобы избежать дополнительных помех в электрической цепи. Не следует допускать повышенной влажности внутри корпуса прибора и различных загрязнений печатной платы, которые могут поглощать влагу из воздуха ввиду своей гигроскопичности, что приведет к току утечки между выводами электронных компонентов. Так, например, поверхность печатной платы может генерировать ток в несколько наноампер, если паяльный флюс или другие загрязнения не очищены должным образом. Для решения этой проблемы, каждое соединение цепи должно быть тщательно промыто чистящим составом и полностью высушено перед использованием.

Электрические помехи, создаваемые внешними факторами, сильно влияют на качество получаемых измерений низкого тока из-за емкостной связи между окружающей средой и измерительной частью. Источники радиочастотных или электромагнитных помех — такие, как линии электропередач частотой 50/60 Гц и радиоволны ультракоротковолнового (УКВ) и сверхвысокочастотного (СВЧ) диапазонов — являются распространенными источниками шума [101]. Для устранения или минимизации влияния внешних электромагнитных полей необходимо экранирование измерительной системы [102].

Таким образом при проектировании малошумящей измерительной аппаратуры следует учитывать множество факторов, которые могут повлиять на точность измерения.

2.2.4. Анализ шума входной эквивалентной схемы

Модель эквивалентной входной схемы, широко используемая во многих биологических измерениях, к которым относится исследования клеточных мембран и нанопор, приведена на рисунке 2.2.

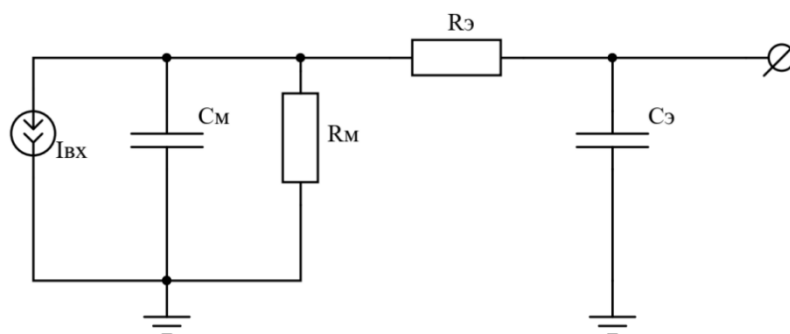


Рисунок 2.2 – Эквивалентная входная схема

Между измерительной системой и системой измерения присутствует сложная модель импеданса, это импеданс биопрепарата, растворов и измерительных электродов. Входная схема может не только генерировать значительный входной шум, но и влиять на точность системы измерения низких токов, что влияет на шумовые характеристики системы, поэтому важно анализировать их вместе. Как правило, электрод используется для доступа к электрическим измерениям из клеток или тканей, и, следовательно, последовательное сопротивление доступа R_s и паразитная емкость C_s электрода на входном узле измерительной системы представлены в электрической эквивалентной входной модели. Параллельно с I_s , присутствует емкость мембраны, C_M . Кроме того, сопротивление раствора, R_M , является сопротивлением отключения мембраны. R_M непосредственно влияет на минимальный измеряемый ток, поскольку он создает ток шунтирования утечки.

Типичные значения электрических параметров эквивалентной электрической входной схемы в случае нанопор, формируемых в бислойных липидных мембранах, приведены в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Типичные значения электрических параметров эквивалентной электрической входной схемы

R_M	C_M	$R_э$	$C_э$	I_{BX}	F_s
1ГОм	320пФ	1кОм	1пФ	1 – 100пА	10кГц

Эквивалентный импеданс эквивалентной входной цепи определяется как:

$$Z_{BX} = \frac{\left(\frac{Z_{C_M} R_M}{Z_{C_M} + R_M} + R_s \right) Z_{C_s}}{\left(\frac{Z_{C_M} R_M}{Z_{C_M} + R_M} + R_s \right) + Z_{C_s}}, \quad (4)$$

где $Z_{C_s} = \frac{1}{sC_s}$ – импеданс паразитной емкости электрода; $Z_{C_M} = \frac{1}{sC_M}$ – импеданс емкости мембраны; R_M – активное сопротивление раствора; R_s – активное сопротивление электрода.

С помощью арифметических преобразований из уравнения (4) получаем: s

$$Z_{\text{вх}} = \frac{R_M + R_s + sR_M C_M R_s}{1 + as + bs^2}, \quad (5)$$

где $a = R_M C_M + C_s R_M + C_s R_s$ – коэффициент;

$b = R_M C_M R_s C_s$ – коэффициент.

Тогда получается, что входная цепь генерирует ток шума с плотностью шумового тока:

$$S_I = \frac{4kT \operatorname{Re}\{Z_{\text{вх}}\}}{|Z_{\text{вх}}|^2}, \quad (6)$$

где $k = 1.38 * 10^{-23} \frac{\text{Вас}}{\text{К}}$ – постоянная Больцмана;

T – температура окружающей среды вокруг составляющих эквивалентную схему (растворов, электродов и т.д.);

$\operatorname{Re}\{Z_{\text{вх}}\} = \frac{R_M + R_s + \omega^2 a R_M C_M R_s}{(1 - \omega^2 b)^2 + \omega^2 a^2}$ – действительная часть импеданса;

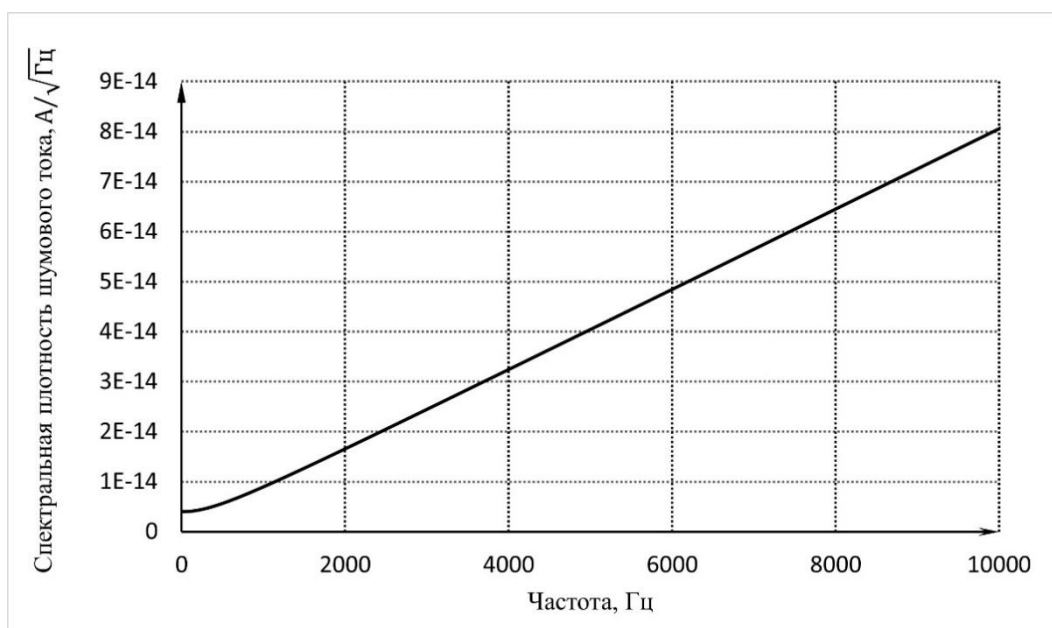
$|Z_{\text{вх}}|^2 = (\operatorname{Re}\{Z_{\text{вх}}\})^2 + (\operatorname{Im}\{Z_{\text{вх}}\})^2 = \left(\frac{R_M + R_s + \omega^2 a R_M C_M R_s}{(1 - \omega^2 b)^2 + \omega^2 a^2} \right)^2 + \left(\frac{\omega R_M C_M R_s (1 - \omega^2 b) - \omega a (R_M + R_s)}{(1 - \omega^2 b)^2 + \omega^2 a^2} \right)^2$ – квадрат модуля импеданса.

Была также рассчитана спектральная плотность шумового тока при различных значениях частоты. В таблице 2.2 представлены значения корня квадратного спектральной плотности шумового тока при различных частотах.

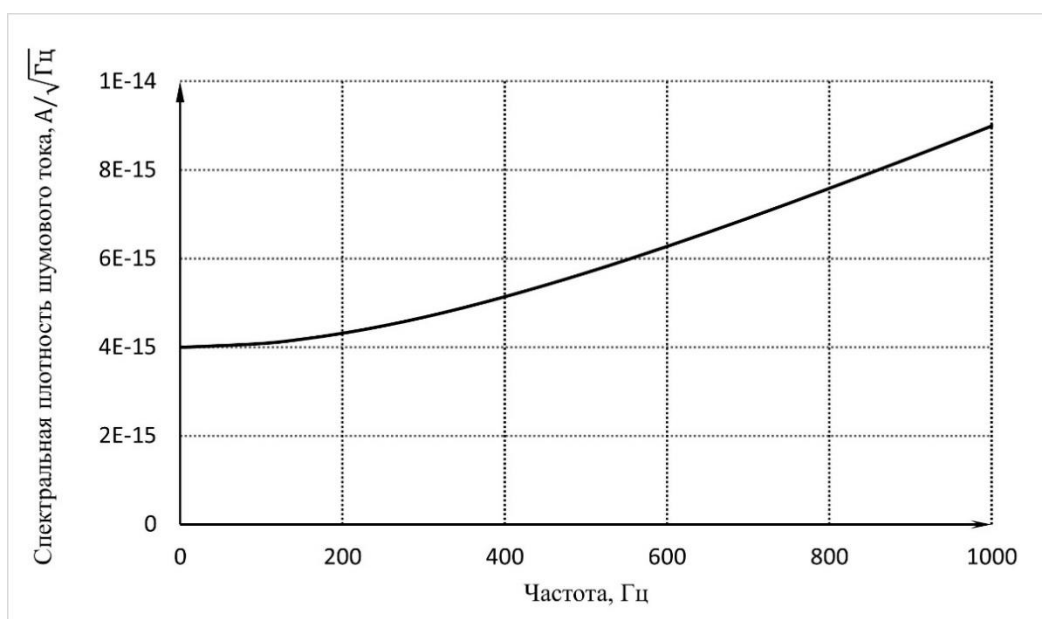
Таблица 2.2 – Значения корня квадратного спектральной плотности шумового тока входной цепи при различных частотах

$\sqrt{S_I}, \text{А}/\sqrt{\text{Гц}}$	$f, \text{Гц}$
$4,001 * 10^{-15}$	1
$4,002 * 10^{-15}$	10
$4,081 * 10^{-15}$	100
$8.992 * 10^{-15}$	1000
$8,061 * 10^{-14}$	10000

По полученным значениям был построен график зависимости плотности шумового тока от частоты. Данный график представлен на рисунке 2.3.



(a)



(б)

Рисунок 2.3 – График зависимости спектральной плотности шумового тока входной эквивалентной цепи от частоты

Таким образом, спектральная плотность шумового тока медленно возрастает до частоты 200 Гц и не сильно зависит от частоты. Свыше 200 Гц значения быстро возрастают и генерируемый шум становится соразмерным со значениями измеряемого тока.

2.2.5. Анализ обратной связи измерительной схемы с резистивной обратной связью

Операционный усилитель (ОУ) является основным строительным блоком для системы измерения напряжения и тока. Участие ОУ в качестве преобразователя делает его шумовые характеристики критически важными для общей шумовой характеристики системы. Для измерения токов может быть использована схема, показанная на рисунке 2.4. Конфигурация входного сигнала ОУ позволяет одновременно записывать входные токи, а также фиксировать входное напряжение.

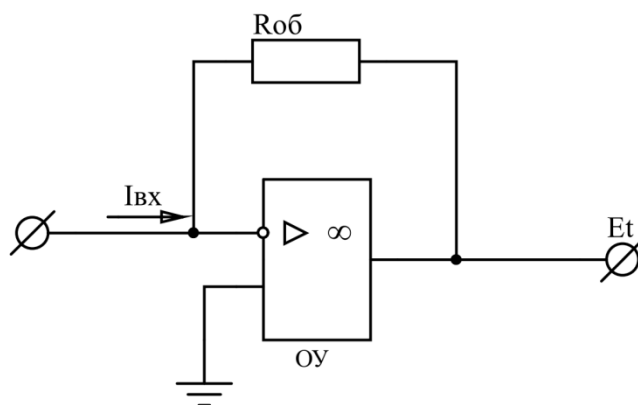


Рисунок 2.4 – Источник напряжения, управляемый током

Идеальная передаточная функция схемы, представленной на рисунке 2.4, проста и выглядит следующим образом:

$$E_t = -R_{об} I_{BX}, \quad (7)$$

где I_{BX} – входной ток; $R_{об}$ – резистор обратной связи

Из формулы (7) получается, что модуль измеряемого входного тока зависит от сопротивления резистора обратной связи:

$$I_{BX} = \frac{E_t}{R_{об}}, \quad (8)$$

Далее рассмотрим шумовую схему, преобразователя тока в напряжение. На рисунке 2.5 представлена шумовая схема источника напряжения, управляемого электрическим током.

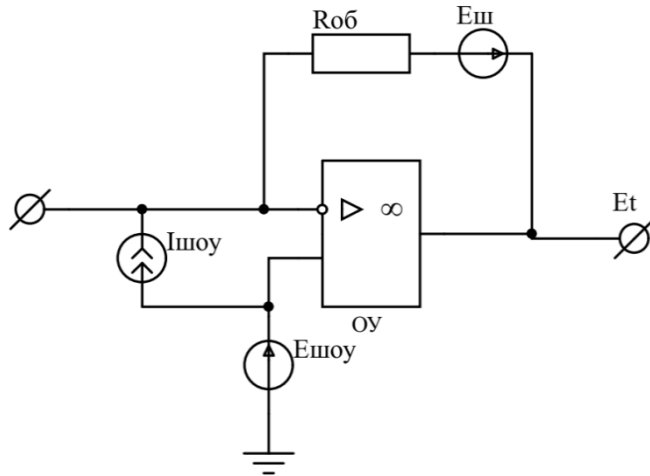


Рисунок 2.5 – Шумовая схема источника напряжения, управляемого током

Общее шумовое напряжение на выходе операционного усилителя E_t зависит от шумового напряжения операционного усилителя, шумового тока операционного усилителя и теплового шума резистора обратной связи:

$$E_t = \sqrt{E_{\text{ш}}^2 + E_{\text{шou}}^2 \Delta f^2 + I_{\text{шou}}^2 R_{\text{об}}^2 \Delta f^2}, \quad (9)$$

где $E_{\text{ш}}^2 = 4kTR_{\text{об}}\Delta f$ – шумовое напряжение резистора;

$I_{\text{шou}}^2$ – шумовой ток операционного усилителя;

$E_{\text{шou}}^2$ – шумовое напряжение операционного усилителя.

В ходе анализа литературы был выбран операционный усилитель LMC 662, который имеет следующие шумовые характеристики: $I_{\text{шou}} = 0.2 \frac{\text{фА}}{\sqrt{\text{Гц}}}$; $E_{\text{шou}} = 22 \frac{\text{нА}}{\sqrt{\text{Гц}}}$

Из формул (8) и (9) следует, что формула модуль входного тока выглядит следующим образом:

$$I_{\text{вх}} = \sqrt{\frac{4kT\Delta f}{R_{\text{об}}} + \frac{E_{\text{шou}}^2 \Delta f^2}{R_{\text{об}}^2} + I_{\text{шou}}^2 \Delta f^2}, \quad (10)$$

Из формулы (8) следует, что величина измеряемого входного тока тем меньше, чем больше сопротивление обратной связи, а из формулы (10) видно, что увеличение сопротивления приводит к увеличению шумового напряжения (слагаемые 1 и 3 в формуле (10)). Таким образом найдем сопротивление при котором слагаемые 1 и 3 равны.

$$\frac{4kT\Delta f}{R_{\text{об}}} = I_{\text{шou}}^2 \Delta f^2, \quad (11)$$

Из формулы 11 находим сопротивление обратной связи:

$$R_{об} = \frac{4kT\Delta f}{I_{шoy}^2 \Delta f^2} = \frac{1.6 * 10^{-20}}{(10^{-15})^2 * 3^2} = 1,7 \text{ ГОм}$$

при $T = 290 \text{ К}$.

Таким образом, на этапе работ, описанных в данном разделе было определено значение резистора обратной связи, которое необходимо для дальнейшего анализа.

2.2.6. Измерение малых токов с использованием резистивной обратной связи

В ходе анализа и сравнения элементной базы был выбран операционный усилитель LMP7721. В таблице 2.3 представлены основные характеристики операционного усилителя LMP7721, использованные при расчете шумовых параметров.

Таблица 2.3 – Основные характеристики операционного усилителя LMP7721

Полоса пропускания операционного усилителя GBW, МГц	15
Входной шумовой ток $I_{nin}, \frac{\text{пА}}{\sqrt{\text{Гц}}}$	0,01
Входное шумовое напряжение $E_{nin}, \frac{\text{нВ}}{\sqrt{\text{Гц}}}$	7
Шумовое напряжение при частоте 1Гц $E_a, \frac{\text{нВ}}{\sqrt{\text{Гц}}}$	100

На рисунке 2.6 показана шумовая схема усилителя с резистивной обратной связью и входной эквивалентной схемой.

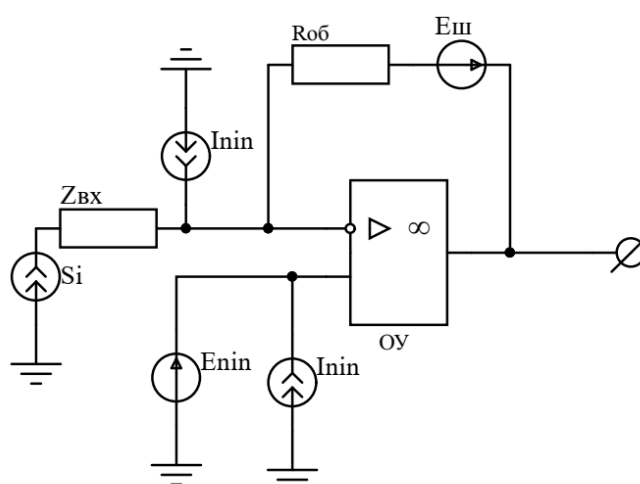


Рисунок 2.6 – Шумовая схема усилителя с резистивной обратной связью и входной эквивалентной цепью

На рисунке 2.7 показана упрощенная шумовая схема усилителя с резистивной

обратной связью и входной эквивалентной цепью, где источники шумов операционного усилителя и резистора приведены к единому источнику шума на неинвертированном входе операционного усилителя.

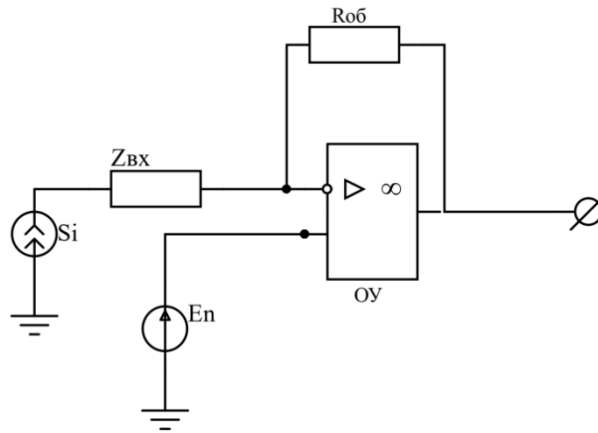


Рисунок 2.7 – Шумовая схема усилителя с резистивной обратной связью и входной эквивалентной цепью

Для начала приведем все шумы ОУ к шумовому напряжению на неинвертированном входе. И сначала определи коэффициент усиления шума, согласно схеме на рисунке 2.7, формула для которого выглядит следующим образом:

$$NG = 1 + \frac{R_{об}}{Z_{вх}}, \quad (12)$$

Полоса пропускания сигнала ограничена полосой пропускания операционного усилителя с замкнутым контуром. Используя произведение коэффициента усиления на полосу пропускания из спецификации, полосу пропускания замкнутого контура можно определить с помощью уравнения:

$$CLB = \frac{GBP}{NG}, \quad (13)$$

где CLB – полоса пропускания замкнутого контура;

GPB – полоса пропускания ОУ.

Используя уравнение 14 находим полосу пропускания:

$$\Delta f = CLB * K, \quad (14)$$

где K = 1,57 – поправочный коэффициент для фильтра первого порядка.

Так как источник шумового напряжения состоит из широкополосного шума и $1/f$ шума, будем искать их отдельно. Преобразование спектральной плотности широкополосного шума в среднеквадратичный шум выглядит следующим образом:

$$E_{nb} = E_{nin} \sqrt{\Delta f}, \quad (15)$$

Теперь найдем $1/f$ составляющую шума, найдем среднеквадратичный шум при частоте 10 Гц:

$$E_f = E_a \sqrt{\Delta f} = 100 \frac{\text{нВ}}{\sqrt{\text{Гц}}} * \sqrt{1 \text{ Гц}} = 284,6 \text{ нВ}, \quad (16)$$

Нормализуем любое измеренное значение шума в области $1/f$ к шуму на частоте 1 Гц:

$$E_{nf} = E_f \sqrt{\ln \left(\frac{\Delta f}{0,1} \right)}, \quad (17)$$

Таким образом получаем общее шумовое напряжение:

$$E_{NV} = \sqrt{E_{nf}^2 + E_{nb}^2}, \quad (18)$$

Произведем преобразование шума тока в шум напряжения, для этого надо среднеквадратичный шум умножить эквивалентное сопротивление цепи:

$$E_{NI} = I_{nin} \sqrt{\Delta f} Z_o, \quad (19)$$

где $Z_o = Z_{\text{вх}} || R_{\text{об}}$ – эквивалентное сопротивление цепи.

Таким образом, получаем спектральную плотность шумового напряжения на не инвертированном входе ОУ:

$$E_n = \frac{\sqrt{E_{NI}^2 + E_{NV}^2}}{\sqrt{\Delta f}}, \quad (20)$$

Теперь можно получить спектральную плотность выходной мощности, S_V , измерителя тока, которая задается приведенным ниже уравнением:

$$S_V = E_{\text{ш}}^2 + E_n^2 (1 + (Y_{\text{вх}} R_{\text{об}})^2), \quad (21)$$

где E_n^2 – входной шум операционного усилителя, включающий тепловые шумы и шумы мерцания;

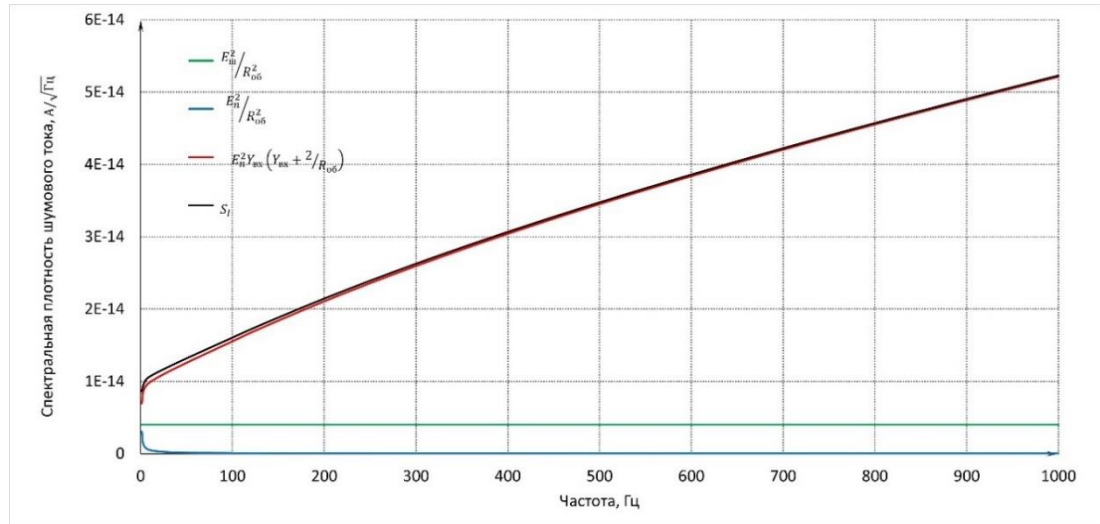
$E_{\text{ш}}^2$ – тепловой шум резистора обратной связи, $R_{\text{об}}$;

$Y_{\text{вх}} = \frac{1}{Z_{\text{вх}}}$ – пропускная способность эквивалентной входной цепи.

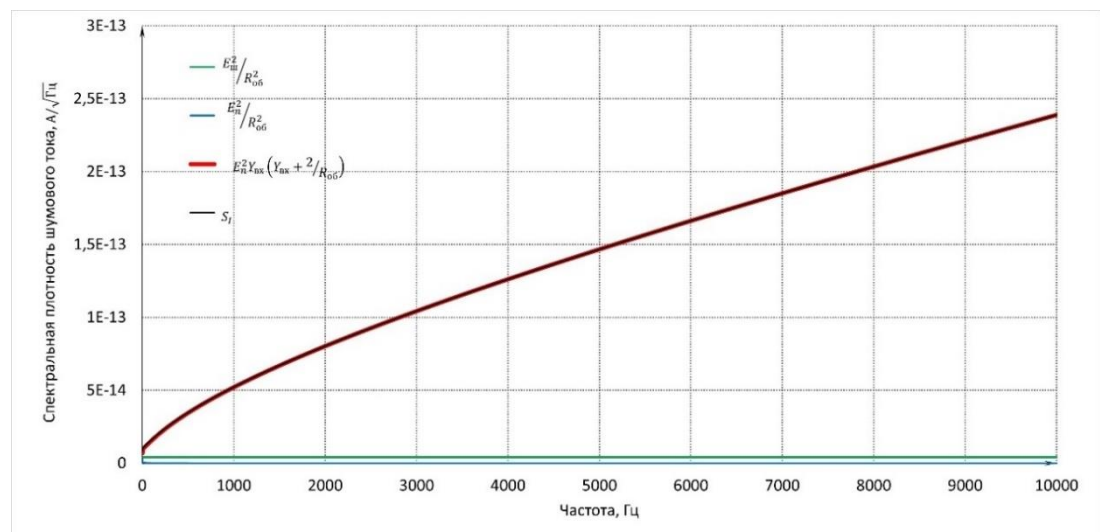
Из приведенных выше уравнений спектральная плотность мощности входного шума, связанного с током, S_I , может быть получена при помощи (21) разделив на $R_{\text{об}}^2$:

$$S_I = \frac{E_{\text{ш}}^2 + E_n^2}{R_{\text{об}}^2} + E_n^2 Y_{\text{вх}} \left(Y_{\text{вх}} + \frac{2}{R_{\text{об}}^2} \right), \quad (22)$$

Была рассчитана спектральная плотность шумового тока при различных значениях частоты. По полученным значениям был построен график зависимости плотности шумового тока от частоты. Данный график представлен на рисунке 2.8.



(а)



(б)

Рисунок 2.8 – Спектральная характеристика мощности шумового тока от усилителя с резистивной обратной связью и входной эквивалентной цепью

Доминирующим источником шума на более низких частотах является тепловой шум резистора обратной связи, при более высоких частотах преобладает шум, заключающийся в прохождении шума операционного усилителя через входную эквивалентную цепь. Наибольшая составляющая шума достигается на частотах более 10 кГц.

Для ограничения частоты пропускания и уменьшения шума был применен

активный фильтр нижних частот 2-го порядка (Салена-Ки). Данный фильтр представлен на рисунке 2.9.

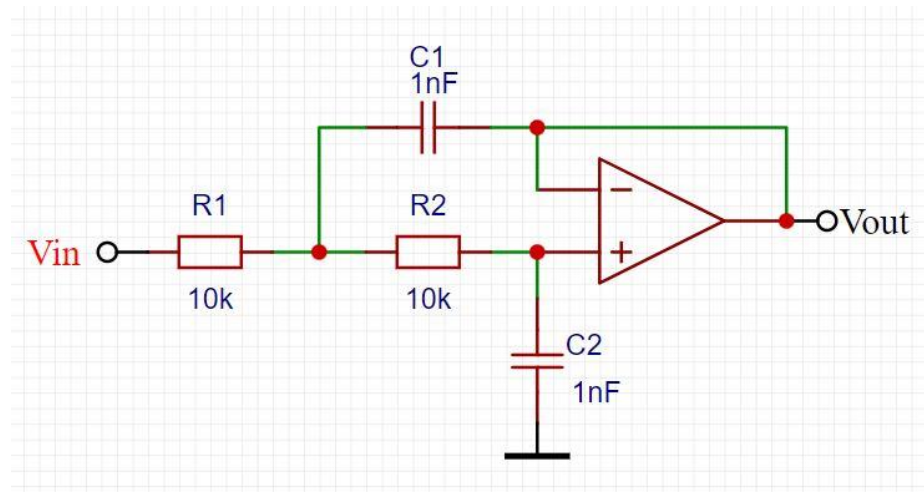


Рисунок 2.9 – Фильтр нижних частот

Передаточная функция данного фильтра имеет следующий вид:

$$H(s) = \frac{1}{1 + C_2(R_1 + R_2)s + C_1(1 - K_v)s + C_1C_2R_1R_2s^2}, \quad (23)$$

где K_v – коэффициент усиления сигнала, s – оператор Лапласа.

При $K_v = 1$ получаем:

$$H(s) = \frac{1}{1 + C_2(R_1 + R_2)s + C_1C_2R_1R_2s^2}, \quad (24)$$

Частота среза данного фильтра выглядит так ($R_1 = R_2 = R$):

$$\omega_o = \frac{1}{R\sqrt{C_1C_2}}, \quad (25)$$

При $R = 10$ кОм, $C_1 = 100$ нФ, $C_2 = 220$ нФ, получаем что частота среза:

$$f = \frac{1}{2\pi\omega_o} = \frac{1}{2\pi R\sqrt{C_1C_2}} = 1073,022 \text{ Гц}, \quad (26)$$

Добротность фильтра:

$$Q = \frac{R\sqrt{C_1C_2}}{2RC_2} = 0,34$$

Из формулы (24) найдем АЧХ фильтра:

$$|K(j\omega)| = \frac{1}{\sqrt{(1 - \omega^2 R^2 C_1 C_2)^2 + (2RC_2\omega)^2}}$$

На рисунке 2.10 представлена АЧХ фильтра в диапазоне частот до 2 кГц.

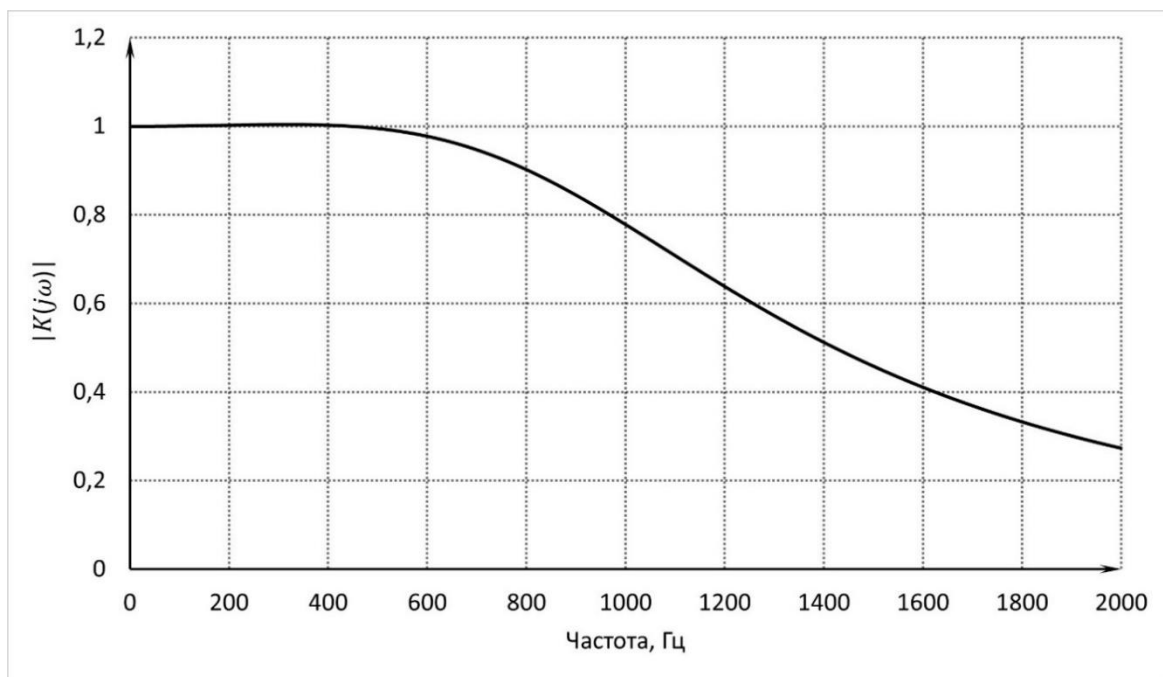


Рисунок 2.10 – АЧХ фильтра нижних частот

Таким образом, сделанные нами за отчетный период расчеты позволили нам выбрать оптимальные параметры схемы регистрации тока, обеспечивающие необходимые шумовые характеристики в полосе пропускания в соответствии с п.5.2 ТЗ.

2.3. -Разработка конструкции ячейки для анализа

Важным фактором в разработке технологии изготовления измерительных ячеек для нанопорового детектора является выбор материала. Поскольку речь идет о низких концентрациях исследуемых ферментов в растворе, требуется обеспечить максимально возможную чистоту проведения эксперимента. При этом такие материалы, как кварц, золото, оксид титана и прочие не подходят либо из-за высокой сложности при их механической обработке, либо из-за их высокой стоимости. По этим причинам в качестве материала для изготовления измерительных ячеек был выбран фотоотверждаемый полимер, использование которого позволяет изготавливать кюветы для нанопорового детектора методом 3D-печати. Такой подход обеспечивает простоту и технологичность изготовления кювет. При этом фотоотверждаемые композиции, используемые для 3D-печати, изготавливаются на основе производных акриловой и метакриловой кислот [103], преимуществом которых является твердость, стойкость к воздействию света и кислорода. Из этих

соображений на отчетном этапе выполнения проекта для изготовления измерительных ячеек для нанопорового детектора был выбран метод 3D-печати с использованием фотоотверждаемой акрилатной композиции.

2.4. Описание схемы нанопорового детектора, как основы системы регистрации функциональной активности фермента

В соответствии с п.1.2ПГ, на отчетном этапе была разработана схема нанопорового детектора, как основы системы регистрации функциональной активности фермента, представленная в виде отдельного документа в составе пакета отчетной документации (см файл «КНП.46-подтв_док-ты_Пункт 1.2ПГ-Схема НП-детектора_этап1_(1)»).

На листе 1 разработанной схемы показан сборочный чертеж измерительной жидкостной ячейки показан. Эта ячейка состоит из двух камер, разделенных кремниевой пластиной с нанопорами. Объем каждой камеры составляет 0,7 мл, так как такой объем исследуемого буферного раствора является оптимальным при исследовании единичных молекул ферментов.

На листе 2 разработанной схемы показаны общий вид и сечение кремниевой пластины с четырьмя нанопорами.

На листе 3 разработанной схемы показана принципиальная электрическая схема электронного блока регистрации ионного тока, являющегося важнейшим элементом нанопорового детектора как системы регистрации функциональной активности фермента. Этот электронный блок имеет уровень собственных шумов не хуже 0,5 пА в диапазоне частот 0-10 кГц, обеспечивая частоту оцифровки сигнала в пределах от 1 до 50 кГц, что соответствует требованиям п. 5.2 ТЗ.

2.5. Программное обеспечение для работы на нанопоровом детекторе

Программное обеспечение выполнено на языке структурного программирования LabView, применяющейся в автоматизированных системах научных исследований. Оно включает в себя панель виртуального прибора, описывающей внешний интерфейс системы (рисунок 2.11) и блочную диаграмму, описывающей логику работы виртуального прибора (рисунок 2.12).

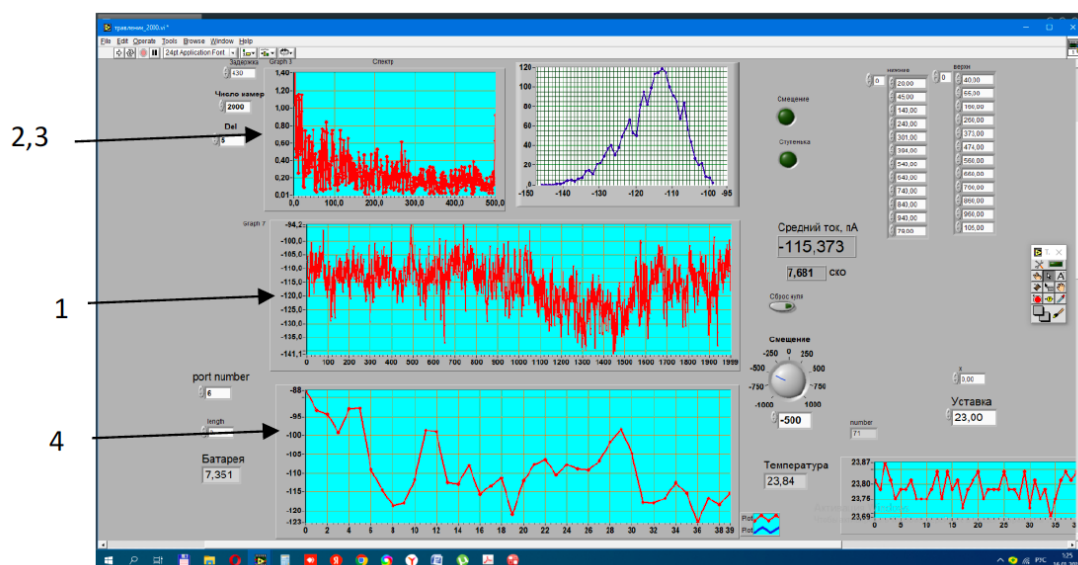


Рисунок 2.11 — Виртуальная панель прибора

Как видно из рисунка 2.11 на диаграмме 1 отображается текущая реализация изменения ионного тока, протекающего через нанопору в течение одной секунды, диаграммы 2 и 3 отображают частотный спектр и амплитудное распределение сигнала, диаграмма 4 – изменение средних значений через 1 секунду. Полученные зависимости записываются в файл и будут использованы в дальнейшем при статистической обработке при разработке алгоритма регистрации ферментативной активности.

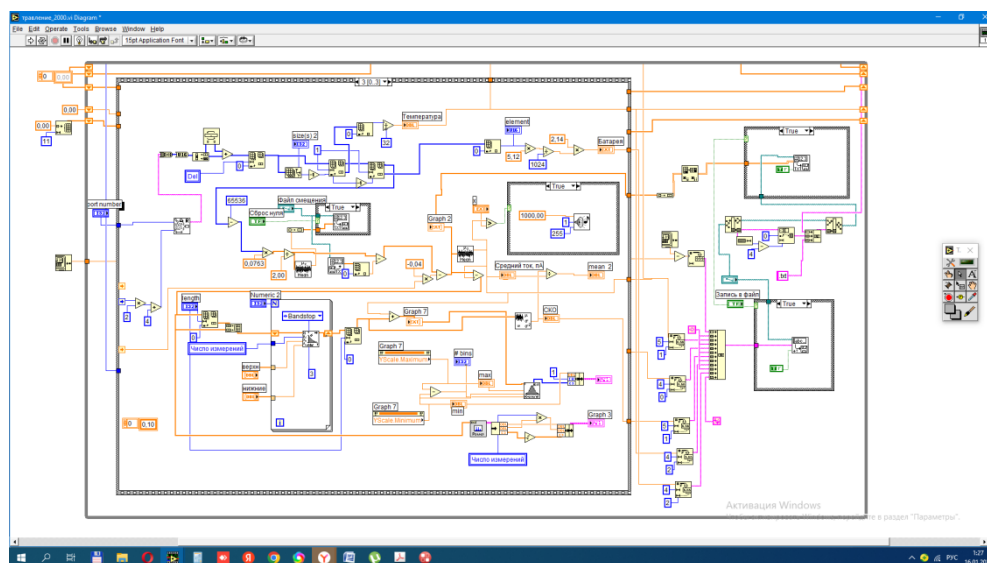


Рисунок 2.12 — Блочная диаграмма виртуального прибора

Блочная диаграмма реализует алгоритм обработки принятых сигналов и

управления параметрами работы измерительной системы. Программа реализует прием данных от измерительного устройства через интерфейс USB, передачу данных управления работой измерительного блока прибора, многокаскадную фильтрацию сигналов с помощью фильтра Баттерворта в режиме реального времени, нахождение частотного спектра, нахождение амплитудного распределения сигналов, вычисление статистических характеристик, нахождение среднего значения, дисперсии среднего и запись данных в файл. Таким образом, разработанное на отчетном этапе программное обеспечение позволяет проводить первичную фильтрацию и обработку статистических характеристик токовых сигналов нанопоры в режиме реального времени, а также позволит реализовать алгоритмы регистрации сигналов ферментативной активности.

2.6. Разработка методики встраивания белка в нанопору

Методика встраивания цитохрома P450 BM3 описана в статье, опубликованной по результатам работ на отчетном этапе [89]. В схеме, разработанной на отчетном этапе, нанопоровый детектор включал в себя ключевой элемент — измерительную ячейку с двумя камерами по 700 мкл (цис- и транс-), разделенными мембраной из неорганического материала Si_xN_y . По данным, приведенным в [104], характерный размер молекулы цитохрома P450 BM3 составляет $12,9 \times 7 \times 6$ нм. Соответственно, чтобы обеспечить ее захват в нанопоре и предотвратить ее прохождение через нанопору, размер нанопоры был выбран меньше размера молекулы фермента. Из этих соображений, в разработанной методике в мембране Si_xN_y толщиной 40 нм формировали нанопору размером ~5 нм методом EBD с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM 2100F (JEOL Ltd., Япония). Изображение такой нанопоры, полученное методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), представлено на рисунке 2.13.

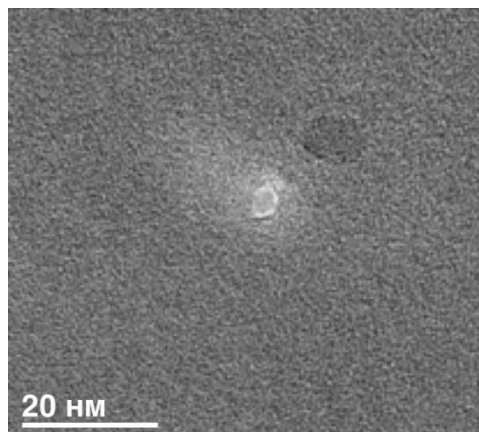


Рисунок 2.13 – ПЭМ-изображение нанопоры диаметром 5 нм, сформированной в неорганической мембране Si_xN_y толщиной 40 нм

Перед экспериментом обе камеры (и цис-, и транс-) заполняли сверхчистой деионизованной водой. Перед встраиванием молекулы фермента в нанопору воду заменяли на 2 мМ фосфатно-солевой буферный раствор в модификации Дульбекко (рабочий буфер ФСБ-Д, pH 7). Для встраивания молекулы фермента в нанопору в камеру ячейки нанопорового детектора, заполненную рабочим буфером, вносили 10^{-8} М раствор цитохрома Р450 BM3 в том же буфере. При этом на камеры ячейки подавали постоянную разность потенциалов 400 мВ с использованием хлоридсеребряных (Ag/AgCl) электродов. Ионный ток измеряли в полосе частот 1000 Гц с помощью усилителя с внутренним уровнем шума $\sim 0,3$ пА и регистрировали с помощью 16-битного аналого-цифрового преобразователя. Сигнал обрабатывали с помощью низкочастотного фильтра Баттерворта с частотой среза 1 кГц.

2.7. Заключение к Разделу 2

На отчетном этапе произведен расчет шумовых параметров электронно-измерительной части разработанной схемы нанопорового детектора. Определены оптимальные параметры схемы регистрации тока, обеспечивающие необходимые шумовые характеристики в полосе пропускания в соответствии с п. 5.2 ТЗ. Определены геометрические параметры измерительных ячеек нанопорового детектора. Технология 3D-печати выбрана в качестве метода изготовления измерительных ячеек нанопорового детектора. Разработанная электронная схема нанопорового детектора позволяет работать как с биологическими, так и с искусственными нанопорами. К ним относятся нанопоры протравленные в

полиэтиленовых пленках после облучения их тяжелыми ионами и нанопоры на основе S_xN_y , что соответствует п. 5.2 ТЗ.

При выполнении работ было использовано новое оборудование – тринокулярный микроскоп оптический, закупленный по договору №000140448 от 17.10.24. Микроскоп необходим для визуализации формирования отверстий в ячейке нанопорового детектора.

Работы по п 1.2 ПГ выполнены в полном объеме.

По результатам работы опубликована статья Ivanov, Y.D.; Vinogradova, A.V.; Nevedrova, E.D.; Ableev, A.N.; Kozlov, A.F.; Shumov, I.D.; Ziborov, V.S.; Afonin, O.N.; Vaulin, N.V.; Lebedev, D.V.; et al. Solid-State Nanopore-Based Nanosystem for Registration of Enzymatic Activity of a Single Molecule of Cytochrome P450 BM3. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, 25, 10864. <https://doi.org/10.3390/ijms251910864>. Публикация №6 в составе пакета отчетной документации.

3. СОЗДАНИЕ КОНСТРУКЦИИ ГИБРИДНОГО ЦИТОХРОМА P450 VM3 С ФДГ, УСТОЙЧИВОГО К ДЕЙСТВИЮ КОМПОНЕНТОВ КРОВИ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ КАНДИДАТНЫХ МОЛЕКУЛ ЭФФЕКТОРОВ

Работы по п.1.3 ПГ выполнялись Соисполнителем Федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», (химический факультет) по Договору № 13/К от 16 августа 2024, заключенному в рамках текущего проекта.

Целью работ по п.1.3 ПГ являлось создание модельных объектов – белков, методами генетической инженерии для разработки методологии оценки функциональной активности единичных объектов.

Ферменты первой и второй фазы ксенобиотиков оказывают значительное влияние на фармакокинетические параметры и процессы биотрансформации эндогенных соединений и продуктов метаболизма. Особый интерес представляют те ферменты, которые вовлечены в метаболизм как ксенобиотиков, так и эндогенных биоактивных соединений. Данные ферменты имеют значительную роль как в регуляции процессов старения (и онтогенеза в целом), липидного обмена, регуляции нервной и иммунной систем. Также данные ферменты являются ключевыми в определении параметров фармакокинетики лекарств, уровня активации пролекарств, а также в развитии фармакорезистентности.

Суперсемейство гидроксилаз типа цитохром P450 играет исключительно важную роль в утилизации ксенобиотиков в организме. Более 80% первичной модификации ксенобиотиков в печени осуществляется ферментами именно этого суперсемейства. Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют об изменении уровня активности цитохромов P450 с возрастом. Поиск соединений, оказывающих эффект (ингибирование, активация) на активность P450 позволит регулировать процессы старения, индуцированные внешним воздействием.

Ферментативные реакции играют значительную роль в организме, и получение новых сведений об этих системах способствует лучшему пониманию физиологических процессов, в том числе, сопровождающих возрастные изменения.

Согласно п 3.3. ТЗ в результате выполнения работ должен быть получен стабильный модельный цитохром как мишень для проверки действия эффекторов.

Работы выполнены в полном объеме, в результате проведенных экспериментов создана генетическая конструкция, кодирующая гибридный фермент NPseFDH-P450_{BM3}, который не подвергается деградации примесными протеазами в ходе культивирования и очистки.

3.1. Построение структуры полноразмерной rt-PseFDH

В соответствии с пунктом 1.3 ПГ и 5.3 ТЗ выполнены работы по созданию конструкции гибридного цитохрома P450_{BM3} с ФДГ, устойчивого к действию компонентов крови для тестирования кандидатных молекул эффекторов: создание модели полноразмерной структуры ФДГ из *Pseudomonas* sp. 101, проведение *in silico* анализа не менее 7 (семи) аминокислотных остатков на С-конце ФДГ и анализ структуры мутантов ФДГ с разными заменами, выбор двух вариантов с оптимальной пространственной структурой для повышения стабильности модельного объекта. Также выполнено моделирование полноразмерной структуры формиаатдегидрогеназы из *Pseudomonas* sp.101 длиной 400 аминокислотных остатков на основе полноразмерной холо-формы структуры ФДГ из *Moraxella* sp.C1

NAD⁺-зависимая формиаатдегидрогеназа метилотрофных бактерий (КФ 1.2.1.2, FDH) была выделена из оригинального штамма метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp.101 (nt-PseFDH) в 70-х годах 20-го столетия. Ген PseFDH был клонирован в 1990 году. На основе клеток *E.coli* был создан штамм-суперпродуцент рекомбинантной PseFDH (rt-PseFDH). Белковое секвенирование показало, что выделенная из природного штамма nt-PseFDH состоит из 393 аминокислот, в то время как аминокислотная последовательность rt-PseFDH, полученная трансляцией гена фермента, показала, что rt-PseFDH должна состоять из 400 аминокислот. Отсутствующие в аминокислотной последовательности nt-PseFDH 7 аминокислотных остатков были расположены на С-конце фермента и содержали 3 остатка лизина. Аминокислотная последовательность ФДГ rt-PseFDH приведена на рисунке 3.1.

AlaLysValLeuCysValLeuTyr**Asp**AspProValAspGlyTyrProLysThrTyrAlaArgAspAspLeuPro
 26 LysIleAspHisTyrProGlyGlyGlnThrLeuProThrProLysAlaIleAspPheThrProGlyGlnLeuLeu
 51 GlySerValSerGlyGluLeuGlyLeuArgLysTyrLeuGluSerAsnGlyHisThrLeuValValThr**Ser**Asp
 76 LysAspGlyProAspSerValPheGluArgGluLeuValAspAlaAspValValIleSerGlnProPheTrpPro
 101 AlaTyrLeuThrProGluArgIleAlaLysAlaLysAsnLeuLysLeuAlaLeuThrAlaGlyIleGlySerAsp
 125 HisValAspLeuGlnSerAlaIleAspArgAsnValThrValAlaGluValThrTyrCysAsnSerIleSerVal
 151 AlaGluHisValValMetMetIleLeuSerLeuValArgAsnTyrLeuProSerHisGluTrpAlaArgLysGly
 176 GlyTrpAsnIleAlaAspCysValSerHisAlaTyrAspLeuGluAlaMetHisValGlyThrValAlaAlaGly
 201 ArgIleGlyLeuAlaValLeuArgArgLeuAlaProPheAspValHisLeuHisTyrThrAspArgHisArgLeu
 226 ProGluSerValGluLysGluLeuAsnLeuThrTrpHisAlaThrArgGluAspMetTyrProValCysAspVal
 251 ValThrLeuAsnCysProLeuHisProGluThrGluHisMetIleAsnAspGluThrLeuLysLeuPheLysArg
 276 GlyAlaTyrIleValAsnThrAlaArgGlyLysLeuCysAspArgAspAlaValAlaArgAlaLeuGluSerGly
 301 ArgLeuAlaGlyTyrAlaGlyAspValTrpPheProGlnProAlaProLysAspHisProTrpArgThrMetPro
 326 TyrAsnGlyMetThrProHisIleSerGlyThrThrLeuThrAlaGlnAlaArgTyrAlaAlaGlyThrArgGlu
 351 IleLeuGluCysPhePheGluGlyArgProIleArgAspGluTyrLeuIleValGlnGlyGlyAlaLeuAlaGly
 376 ThrGlyAlaHisSerTyrSerLysGlyAsnAlaThrGlyGlySerGluGluAla**AlaLysPheLysLysAlaVal**

Рисунок 3.1 – Аминокислотная последовательность формиадегидрогеназы из бактерий *Pseudomonas sp. 101*, полученная трансляцией нуклеотидной последовательности гена фермента. **Полужирным шрифтом с подчеркиванием** выделены 7 (семь) аминокислотных остатков, которые отщепляются после трансляции в природном штамме

После клонирования гена PseFDH были проведены многочисленные эксперименты по белковой инженерии фермента с целью повышения температурной и химической стабильности и эксперименты по изменению и улучшению каталитических свойств. Одним из важнейших достижений стало изменение коферментной специфичности PseFDH от NAD^+ к NADP^+ , что позволило его использовать в системах регенерации NADPH в процессах хирального синтеза.

Другим направлением исследований с PseFDH стало получение гибридных «слитых» белков, когда в одной полипептидной цепи объединены последовательности двух и более ферментов. В 2021 году был получен гибридный белок мутантной NADP^+ -специфичной PseFDH (NPPseFDH) с полноразмерным цитохромом P450 (CYP102A1 BM3) из *Bacillus megaterium*. Слитый белок был получен в двух вариантах расположения ферментов в гене – (NPPseFDH-P450BM3) и (P450BM3-NPPseFDH). Было показано, что первый вариант NPPseFDH-P450BM3 намного более эффективен, чем второй. В зависимости от типа субстрата такой гибридный белок NPPseFDH-P450BM3 был в 20-60 раз более эффективен, чем смесь отдельных ферментов PseFDH и P450BM3.

В банке трехмерных структур PDB для PseFDH имеются две структуры, полученные кристаллизацией свободной нативной nt PseFDH (апо-форма, код PDB 2NAC) и нативной nt-PseFDH в тройном комплексе с NAD⁺ и азидом (холо-форма, код PDB 2NAD). Структура 2NAC является димером, в каждой из субъединиц разрешились только по 374 остатка. В случае структуры 2NAD в субъединице А присутствует 391 остаток, а во второй субъединице В – только 383 остатка. Таким образом, можно сделать вывод, что при выделении фермента из природного штамма *Pseudomonas* sp.101 происходит его посттрансляционная модификация, в результате которой с С-конца отщепляются 7 аминокислотных остатков. Отсутствие семи аминокислотных остатков на С-конце nt-PseFDH было подтверждено в экспериментах по кристаллизации рекомбинантного фермента, который получается полноразмерным длиной 400 остатков (wt PseFDH_400). Оказалось, что такой вариант не кристаллизуется в условиях, найденных для nt-PseFDH. Поэтому для получения кристаллов в гене PseFDH на 3'-конце была специально удалена последовательность из 21 нуклеотида, кодирующая последние 7 аминокислот.

Поскольку в гибридном ферменте NPPseFDH-P450BM3 PseFDH имеет 400 остатков, то совершенно очевидно, что для получения стабильного фермента, не гидролизующегося примесями протеаз, необходимо провести направленный мутагенез остатков в составе этой последовательности из 7 остатков. Для определения положения остатков, которые следует подвергнуть мутагенезу, необходима структура полноразмерной PseFDH, содержащая все 400 аминокислот. Однако, как уже было сказано, имеющаяся в настоящее время структура холо-формы фермента позволяет видеть только 391 остаток. Требуемая структура может быть получена достройкой недостающих 9 остатков с помощью моделирования. Простым подходом было бы добавление на С-конец в структуре PDB 2NAD недостающих 9 остатков и попытка оптимизировать структуру методами молекулярной механики и молекулярной динамики, однако более высокая точность моделирования может быть достигнута при построении исходной структуры с добавленными остатками путем выравнивания со структурой FDH, у которой С-конец разрешается в пространственной структуре, полученной методом рентгеновской дифракции. Из банка PDB нами были выбраны структуры холо-форм бактериальных форматдегидрогеназ. Оказалось, что во всех этих структурах холо-форм на С-конце

также не разрешены от 7 до 15 остатков, за исключением фермента из *Moraxella* sp.C1 (MorFDH). В случае MorFDH в депонированных в PDB структурах видно 398 или 399 остатка из 401. Кроме того, в нашем распоряжении имеется структура холо-формы MorFDH с разрешением 1,1 Å, которая была описана в литературе, но не была депонирована в PDB. В этой структуре «видно» 400 остатков. Именно она и была использована для построения структуры полноразмерной wt-PseFDH. Для начала было выполнено наложение структуры 2NAD на структуру холо-MorFDH, в которой разрешены 400 остатков. На рисунке 3.2 представлены результаты наложения структур. Из него очень хорошо видно, что структуры холо-форм PseFDH и MorFDH очень близки. Среднеквадратичное отклонение C α -атомов составляет менее 0,5 Å, в районе С-конца оно еще меньше.

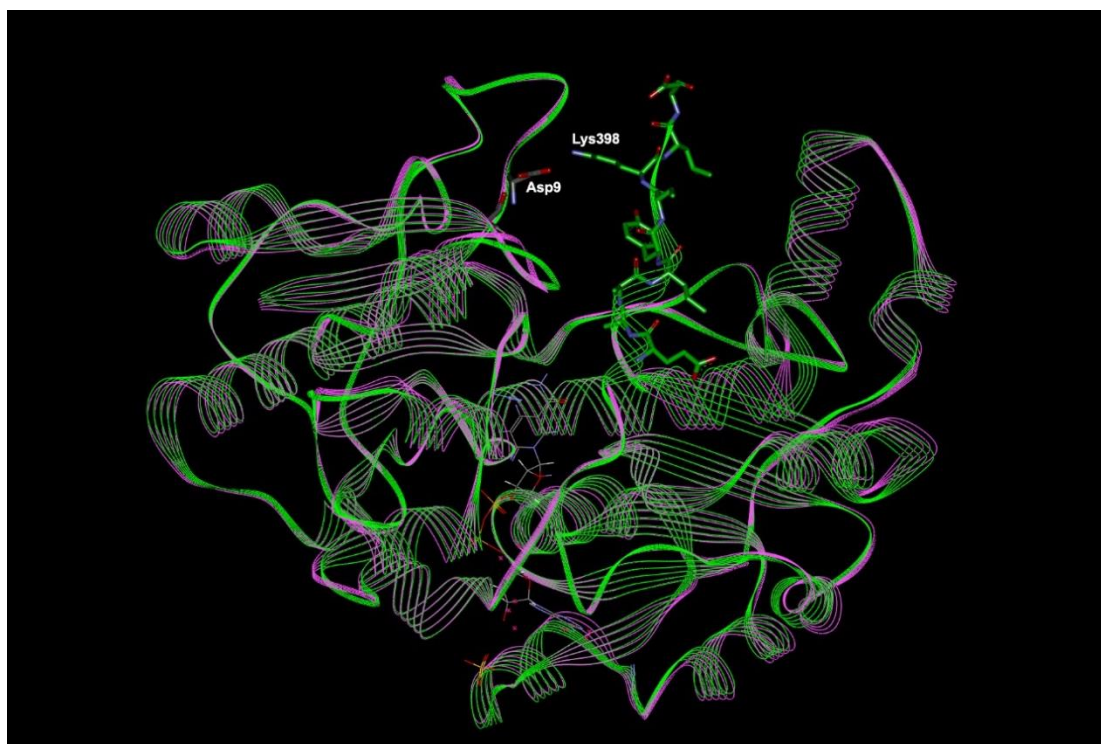


Рисунок 3.2 – Пространственное выравнивание структур холо-форм PseFDH (PDB 2NAD) и MorFDH (недепонированная структура с разрешением 1,1Å). Остатки с 1 по 391 показаны как лента (фиолетовым и зеленым цветом для PseFDH и MorFDH, соответственно). Дополнительные 9 аминокислотных остатков, присутствующие в структуре MorFDH, обозначены в виде палочек

Ниже приведено выравнивание 9 остатков на С-концах ферментов. Полужирным шрифтом выделены остатки лизина.

PseFDH	EAA KFK KAV
MorFDH	EAA KYEKL DA

На рисунке 3.2 представлено положение 9 остатков на С-конце MorFDH. Из рисунка хорошо видно, что остаток Lys398 образует водородную связь с остатком Asp9. Второй атом кислорода остатка Asp9 образует водородную связь оксигруппой остатка Ser74. Остаток Lys397 ни в каких взаимодействиях не участвует, а остаток Lys395 может образовать очень слабую водородную связь с остатком Glu392. В свою очередь, атомы кислорода карбоксильной группы остатка Glu392 способны образовывать водородную связь с гуанидо-группой остатка Arg290.

После наложения структур MorFDH и 2NAD с С-конца последовательности MorFDH были взяты 9 остатков и перенесены в структуру PseFDH (2NAD). Далее эти остатки были заменены на 9 остатков из последовательности PseFDH. Полученная структура была оптимизирована 1) по конформации и 2) по энергии методами молекулярной механики и молекулярной динамики. Полученная таким образом оптимизированная структура представлена на рисунке 3.3.

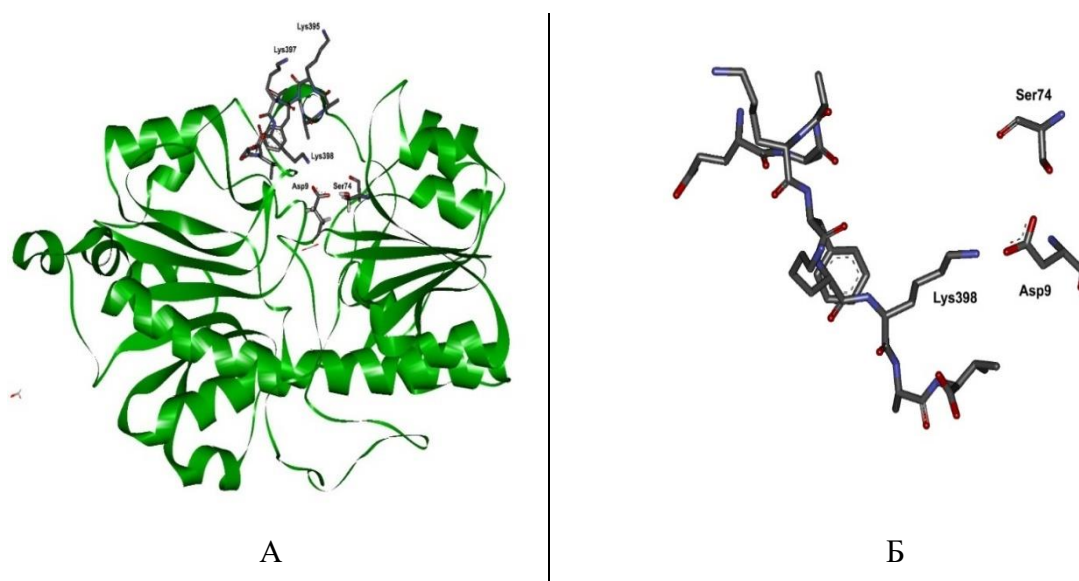


Рисунок 3.3 – А. Структура полноразмерной PseFDH, полученная добавлением в структуру 2NAD (представлена лентой) 9 аминокислотных остатков на С-конце (показаны палочками). Б. Укрупненное представление структуры 9 аминокислотных остатков на С-конце фермента

Из рисунка 3.3 следует, что из трех остатков лизина два - Lys395 и Lys397 ориентированы в раствор и не взаимодействуют с другими аминокислотными остатками белковой глобулы. Отметим, что в последовательности MorFDH в 397 положении находится остаток глутаминовой кислоты (см. выше). Аминогруппа в Lys398 в холо-форме PseFDH, как и в MorFDH образует ионную пару с боковой

карбоксильной группой остатка Asp9. Кроме того, один из кислородов карбоксильной группы Asp9 образует водородную связь с ОН-группой остатка Ser74. Таким образом, анализ положения девяти остатков на С-конце аминокислотной последовательности PseFDH свидетельствует, что из трех остатков - Lys385, Lys387 и Lys398, остаток Lys398 играет наиболее важную роль в поддержании структуры фермента.

3.2. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей формиаатдегидрогеназ из других источников.

Из анализа структуры полноразмерной PseFDH следует, что следует заменить остатки Lys395 и Lys397. Однако с учетом того, что аминокислот 20, выбор кандидатных остатков слишком велик. Для того чтобы сузить набор потенциальных остатков для замены, необходимо провести сравнение первичных структур гомологичных ферментов из разных источников. Нами был проведен поиск последовательностей формиаатдегидрогеназ в базе транслированных последовательностей GeneBank. Для этого использовали программу BLAST с модифицированными критериями. Для поиска использовали только последовательность с 301 по 393 аминокислоту. Такой выбор был обусловлен двумя причинами:

1) Семь последних аминокислот с С-конца были удалены, чтобы снизить вероятность получения при поиске последовательностей, которые имели такой же С-конец, как и PseFDH

2) В то же время выбор 93 аминокислот позволил найти последовательности с максимальной гомологией с PseFDH.

Максимальное число последовательностей в поиске было задано равным 500. После ручного анализа было отобрано 100 последовательностей. На рисунках 3.4 и 3.5 представлены результаты выравнивания для N- и С-концевых фрагментов первых 43 последовательностей.

PseFDH		AKVLCVLYDDPVDGYPKTYARDDLPKIDHYPGGQTLTPPKAIDFTPGQLLGSVSGELGLRKYLESNGHTLVVTS	76
WP_258737490.1	1	AKVLCVLYDDPIDGYPKSYARDDLPKLEHYPGGQTLTPPKGIDFTPGELLGSVSGELGLRKYLEANGHTLVVTS	76
WP_152303243.1	1	AKVLCVLYDDPIDGYPKTYARDDLPKIDHYPGGQTLTPPKAIDFVPGTMLGSVSGELGLRKYLESNGHTLVVTS	76
WP_013168047.1	1	AKILCVLYDDPVDGYPKTYARDDLPKIDHYPGGQTLTPPKAIDFTPGALLGSVSGELGLRKYLEANGHTFVVTS	76
WP_222875187.1	1	AKIVAVLYDDPKGGFPKPYARDSIPEIKTYADGQTAPTPKAIDFKPGEMLGSVSGELGLAKWLKSLGHEYVVTSS	76
WP_291633178.1	1	AKVVCVLYDDPVDGYPKSYARDDLPKIEHYPGGQTLSPSKAIDFKPGTLLGSVSGELGLRKYLESQGHEFIVTS	76
WP_145675573.1	1	AKVVCVLYDDPVTGYPTSYARDDLPKIDGYAGGQTLTPPKAIDFQPGTLLGSVSGELGLRRYLESLGHELIVTS	76
WP_315767550.1	1	AKIVCVLYDDPIDGYPRSYARDALPRIDHYPDGQTLTPPKAIDFKPGSLLGSVSGELGLRAYLESNGHTLIVTS	76
WP_238277077.1	1	AKIVLVLYDDPVDGYPKTYARDDLPRIDGYADGQTLTPPKAIDFKPGTLLGSVSGELGLRKYLESLGHTLVVTS	76
WP_073357971.1	1	AKILCVLYDDPIDGYPMTYARDELPTVEQYGDGQTLTPTAIDFLPGTLLGSVSGELGLRKYLEANGHTLVVTS	76
WP_187728563.1	1	AKVVCVLYDDPIDGYPTSYARDALPKIEKYPDGQTLTPPKAIDFTPGTLLGSVSGELGLRNYLESQGHSLVVTSS	76
OYW59285.1	1	AKVVCVLYDDPASGMPKSYARDDLPKIDHYPGGQTLTPKIGIDFVPGALLGSVSGELGLRNYLESNGHTLVVTS	76
WP_145396649.1	1	AKVVCVLYDDPVDGYPTTYARDDLPKIDKYPDGQTLTPPKAIDFQPGTLLGSVSGELGLRKYLESLGHEFIVTS	76
WP_027668786.1	1	AKVLCVLYDDPIDGYPKSYARDNLPRIDQYPGGQTLTPPKAVDFQPGTLLGSVSGELGLRKYLEANGHTLVVTS	76
WP_074967815.1	1	AKVVCVLYDDPVDGYPTSYARDSLPVIERYPDGQTLTPPKAIDFVPGSLLGSVSGELGLRNYLEAQGHSLVVTSS	76
WP_163989147.1	1	AKVVCVLYDDPINGYPTSYARDSLPVIERYPDGQTLTPPKAIDFVAGSLLGSVSGELGLRKYLEANGHSFVVTS	76
WP_319843788.1	1	AKIVAVLYDDPETGFPKPYARDSIPEIKVYSDGQTAPTPKAIDFTPGEMLGSVSGELGLRAYLESNGHTLIVTS	76
MDF7674541.1	1	AKVVCVLYDDPVDGYPTSYARDDLPTVKDYPDGQTLSPSKAIDFKPGTLLGSVSGELGLRKYLESLGHELIVTS	76
WP_200686863.1	1	AKVVLVLYDDPVDGYPSYARDDLPKIDKYPDGQTLTPPKAIDFTPGHLLGSVSGELGLRKYLESQGHSLIVTS	76
MBS1696068.1	1	AKVLCVLYDDPVDGMPSTYARDDLPIVIEGYGDGQTLTPPKAIDFVPGTLLGSVSGELGLRKYLESNGHTLVVTS	76
WP_119896710.1	1	GKVVVCVLYDDPIDGYPTSYARDDLPRIDRYPDGQSLTPPKAIDFTPGHLLGSVSGELGLRKYLESLGHEFIVTS	76
WP_133034904.1	1	AKVVCVLYDDPIDGYPTSYARESLPVIERYPDGQTLTPPKAIDFVPGSLLGSVSGELGLRNYLESNGHTFVVTS	76
WP_253713192.1	1	AKVVCVLYDDPIDGYPKSYARDGLPKIERYPGGQTLTPPKAIDFVPGALLGSVSGELGLRQYLESRGHTLVVTS	76
WP_013862859.1	1	AKVVCVLYDDPVDGQPTSYARDDLPTIERYPDGQTLTPPEAIDFVPGTLLGSVSGELGLRNYLESQGHSLIVTS	76
WOJ90892.1	1	AKIVCVLYDDPIDGYPKSYARDDLPKIDHYAGGQTLTPPKAIDFKPGALLGSVSGELGLRKLFESGGHTLVVTS	76
WP_027158758.1	1	AKIVCVLYDDPIDGHKPSYARDSIPEIKVYSDGQTLTPPKAIDFIPGQMLGSVSGELGLRSYLEGLGHTLVVTS	76
TPV98618.1	1	AKVVCVLYDNPIGGYPRSYPRNDLPKIDHYPDGQTLTPPKSIDFKPGALLGSVSGELGLRKYLESNGHTLVVTS	76
WP_144764999.1	1	AKIVLVLYDDPVEGYPKTYARDDLPKIERYPDGQTLTPPKAIDFQPGTLLGSVSGELGLRKYLEGLGHTLVVTS	76
MCIO600494.1	1	AKAVCVLYDDPVDGYPASYPREDLPKIDRYPDGQTLTPPKSIDFTPGTLLGSVSGELGLRKLFESNGHTLIVTS	76
WP_024276109.1	1	AKIVCVLYDDPVTGYPKSYARDDIPTITKYPDGQTLTPPHAIDFVPGHLLGSVSGELGLRKYLESNGHTLVVTS	76
MDB5775011.1	1	AKIICVLYDDPVTGYPTSYARDDLPOPERYPDGQTLTPPKSIDFQPGVLLGSVSGELGLRKYLESQGHQLIVTS	76
MDB5394308.1	1	AKIVCVLYDDPVDGYPKSYARDDLPOINRYPDGQTLTPPEAIDFQPGMLGSVSGELGLRKYLESQGHILIVTS	76
WP_091784840.1	1	AKIVLVLYDDPVDGMPQSYARDDLPKIERYSQGQTLTPPKAIDFQPGHLLGSVSGELGLRPLYLEGLGHTLVVTS	76
WP_092399408.1	1	AKIVCVLYDDPVTGYPKTYARDDLPOPERYPDGQSLTPPKGIDFKPGALLGSVSGELGLRKYLEAQGHQLVVTSS	76
WP_224512042.1	1	AKIICVLYDDPVDGYPKTYARDDLPKIDHYPGGQTFPSPKAIDFQPGTLLGSVSGELGLRKYLESLGHTLVVTS	76
WP_035991212.1	1	AKVLCVLYDDPVKGMKPYARDGVPEITRYHDGQTAPTPKGIDFTPGELLGSVSGELGLRKYLESLGHTLVVTS	76
WP_174511500.1	1	AKIVCVLYDDPVDGYPKSYARDDLPHIDHYPDGQTLTPPKAIDFQPGALLGSVSGELGLRKYLESLGHTFIVTS	76
WP_307274734.1	1	AKVVCVLYDDPVDGYPKTYARDDLPRIERYPDGQTLTPPRGLDFQPGALLGSVSGELGLRQYLEANGHTLVVTS	76
WP_274133960.1	1	AKIVCVLYDDPVNGQPQSYARDDLPHLERYPDGQTLTPPKAIDFQPGTLLGSVSGELGLRKYLESNGHQLVVTSS	76
CAG0955909.1	1	AKIVCVLYDDPVDGYPESYARDSIPTITAYPDGQTLTPSPKALDFKPGIMLGSVSGELGLRKLFESQGHSLVVTSS	76
WP_226757005.1	1	AKIVLVLYDDPMDGYPTSYARDDLPOPERYPDGQTLTPPKAIDFKPGVLLGSVSGELGLRQYLESNGHQLIVTS	76
MDD4914853.1	1	AKIVCVLYDDPIDGYPQSYARDGIPEIKAYPDGQTAPSPKAIDFRPGELLGSVSGELGLRQYLESQGHSLIVTS	76
WP_213231283.1	1	AKVLCVLYDDPVNGMPKPYARDGVPEITSYPGGQTAFTPDADFTPGELLGSVSGELGLRRFLESQGHSLIVTS	76
WP_165055968.1	1	AKVVLVLYDDPVDGYPKTYPRDDLPKILKYPDGQTVPNPKAIDFTPGALLGSVSGELGLREYLESQGYTVVVTSS	76

Рисунок 3.4 – Выравнивание N-концевых аминокислотных последовательностей форматдегидрогеназ из разных источников. Номера идентификаторов форматдегидрогеназы в геноме представлены вместо названий микроорганизмов. Полуужирным шрифтом выделены консервативные остатки Asp9 и Ser74, обеспечивающие стабильность глобулы фермента

Из рисунка 3.4 хорошо видно, что остатки Asp9 и Ser74, участвующие в образовании системы ион-водородных связей в PseFDH, абсолютно консервативны во всех найденных последовательностях. Анализ выравнивания на C-конце приводит к неожиданным результатам. В 395 положении расположен остаток с положительно заряженной боковой группой – Lys или Arg, причем их встречаемость одинакова – 44 и 48 из 100, соответственно. Встречаемость остатков Lys и Arg в 397 положении также выше, чем в 398. Кроме того, полуужирным шрифтом выделен остаток в 383 положении, поскольку именно столько остатков видно во второй субъединице структуры холо-формы PseFDH 2NAD. Из выравнивания следует, что

явным лидером по частоте встречаемости в положении 383 является остаток Ala – 65 случаев из 100, в то время как частота встречаемости в этом положении для остатка лизина – 25 из 100. Остаток Lys383 также может служить местом протеолитического расщепления PseFDH. Поэтому по результатам выравнивания замена Lys383Ala является наиболее предпочтительной.

PseFDH		KDHPWRTMPYNGMTPHISGTTTLTAQARYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGALAGTGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKKAV	
WP_258737490.1	318	KDHPWRTMPYNGMTPHISGTTTLTAQARYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGALAGTGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKKA	[1] 399
WP_152303243.1	318	ADHPWRTMAWNGMTPHMSGTSLTAQTRYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGSLAGVGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKKG	[1] 399
WP_013168047.1	318	KDHPWRTMKWEGMTPHISGTSLSAQARYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGALAGTGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKKA	[1] 399
WP_222875187.1	318	NDHPWRTMPNEGMPHMSGTSLTAQTRYAAGTREILECFENRPIRDEYLVQGGQLAGVGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKKK	[3] 399
OZA91627.1	175	QDHPWRSMPHHGMPHISGTSLSAQTRYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGKLAGVGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKKA	[1] 254
WP_291633178.1	318	QDHPWRTMPHHGMPHISGTSLSAQTRYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGSLAGTGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKKL	[1] 399
WP_145675573.1	318	QDHPWRTMPHHGMPHISGTSLSAQTRYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGKLAGVGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKAT	[3] 399
WP_315767550.1	318	QDHPWRTMPHHGMPHISGTSLSAQARYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGKLAGTGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKRR	[1] 399
WP_238277077.1	318	GNHPWRTMPHHGMPHISGTSLSAQSRYAAGTREILECFEDRPIRDEYLVQGGALAGVGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKTI	399
WP_073357971.1	318	KDHPWRTMPHHGMPHISGTSLSAQTRYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGTLAGVGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKKG	399
WP_187728563.1	318	KDHPWRTMPHNGMTPHISGTSLSAQARYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGKLAGTGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKSEP	[1] 399
OYW59285.1	318	QDHPWRSMPHHGMPHISGTSLSAQTRYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGKLAGVGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKKA	[1] 399
WP_145396649.1	318	NDHPWRTMPNNGMTPHISGTSLSAQTRYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGNLAGVGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKYEA	399
WP_027668786.1	318	ADHPWRTMPHHGMPHISGTSLSAQARYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGKLAGVGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKTA	399
WP_074967815.1	318	QDHPWRTMPHNGMTPHISGTSLSAQARYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGSLAGVGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKV	399
WP_163989147.1	318	KDHPWRTMPHNGMTPHISGTSLSAQTRYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGQLAGVGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKRG	399
WP_319843788.1	318	NDHPWRTMPNEGMPHMSGTSLTAQARYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGALAGVGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKK	[3] 399
MDF7674541.1	318	QDHPWRTMPYHGMTPHMSGTSLTAQARYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGALAGTGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKKI	[1] 399
WP_200686863.1	318	EDHPWRSMPHHGMPHISGTSLSAQARYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGGKLAGVGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKKV	[1] 399
MBS1696068.1	318	KDHPWRTAPHNAMTPHISGTSLSAQARYAAGTREILEAFDGTPIRDEYLVQGGALAGVGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKVG	399
WP_119896710.1	318	RDHPWRTMPHHGMPHISGTSLSAQARYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGNLAGVGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKV	[1] 399
WP_133034904.1	318	KDHPWRTAPHNAMTPHISGTSLSAQARYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGALAGVGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKKA	[1] 399
WP_253713192.1	318	QDHPWRTMPHHGMPHISGTSLSAQARYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGQLAGTGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKR	[1] 399
WP_013862859.1	318	KDHPWREMPHNGMTPHISGTSLSAQTRYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGRLAGVGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKV	399
WOJ90892.1	318	KDHPWRTMPHHGMPHISGTSLSAQARYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGKLAGTGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKAT	[2] 399
WP_027158758.1	318	QDHPWRTMPHHGMPHISGTSLSAQARYAAGVREVLECFEGRPIRDEYLVQGGHLAGVGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKKG	399
TFV98618.1	318	KEHPWRTMPHHGMPHISGTSLSAQARYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGKLAGVGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKKS	[1] 399
MC10600494.1	318	KDHPWRTMPHHGMPHISGTSLSAQARYAAGVREVLECFEGRPIRDEYLVQGGKLAGTGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKKS	[1] 399
WP_024276109.1	318	QDHPWRTMPHHGMPHISGTSLSAQARYAAGTREILECFENRPIRDEYLVQGGKLAGVGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKKA	399
MDB5775011.1	318	NDHPWRTMPHHGMPHISGTSLSAQTRYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGALAGAGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKG	[5] 399
MDB5394308.1	318	KDHPWRAMPHHGMPHISGTSLSAQARYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGKLAGTGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKTA	399
WP_092399408.1	318	NDHPWRTMPHHGMPHISGTSLSAQTRYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGKLAGVGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKKA	399
WP_224512042.1	318	KDHPWRTMPHHGMPHISGTSLSAQARYAAGTREILECFEGRSIRREYLVQGGKLAGAGAHYSYSTGDTAGSEEAERFKK-	399
WP_035991212.1	318	RDHPWRTMPHNGMTPHISGTTLSAQARYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGKLAGVGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKTA	399
WP_299717107.1	213	SDHPWRTMPHQGMTPHSTGTTLSAQARYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGRLAGVGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKKA	292
WP_174511500.1	318	KDHPWRSMPHHGMPHISGTSLSAQTRYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGKLAGAGAHYSYSGKNATAGSEEAERFKA	[1] 399
WP_307274734.1	318	ADHPWRSMPHHGMPHISGTSLSAQARYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGKLAGVGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKKA	[1] 399
WP_274133960.1	318	ADHPWRTMPHHGMPHISGTSLSAQARYAAGTREILECFENRPIRDEYLVQGGKLAGVGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKKR	399
CAG0955909.1	318	KDHPWRSMPYHGMTPHISGTSLSAQSRYAAGVREVLECFEGRPIRDEYLVQGGNLAGVGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKKG	399
WP_226757005.1	318	NDHPWRTMPYHGMTPHISGTSLSAQARYAAGVREVLECFEGRPIRDEYLVQGGQLAGVGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKK-	399
MDD4914853.1	318	GDHPWRSMPHHGMPHISGTSLSAQTRYAAGVREVLECFEGRPIRDEYLVQGGKLAGVGAHYSYSGKNATAGSEEAERFGKN	[1] 399
WP_213231283.1	318	GDHPWRTMPHQGMTPHSTGTTLSAQTRYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGKLAGTGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKVA	399
WP_165055968.1	318	KDHPWRAMPHHGMPHISGTSLSAQARYAAGVREVLECFEGRPIRDEYLVQGGKLAGVGAHYSYSGKNATAGSEEAERFORA	[1] 399
WP_096875912.1	318	QDHPWRSMPHNGMTPHISGTSLSAQTRYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGQLAGVGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKNK	399
WP_026871932.1	318	VDHPWRTMPHHGMPHISGTSLSAQARYAAGVREVLECFEGRPIRDEYLVQGGKLAGAGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKKS	[1] 399
OGA32168.1	318	QDHPWRTMPHHGMPHISGTSLSAQARYTAGVREVLECFEGRSIRREYLVHGGKLAGVGAHYSYSGKNATGGSEEAERFNT-	399
WP_020180403.1	318	NDHPWRTMPHHGMPHISGTSLSAQARYAAGTREILECFEGRPIRDEYLVQGGKLAGVGAHYSYSGKNATGGSEEAERFKKA	[1] 399

Рисунок 3.5 – Выравнивание С-концевых аминокислотных последовательностей форматдегидрогеназ из разных источников. Номера идентификаторов форматдегидрогеназы в геноме представлены вместо названий микроорганизмов. Полужирным шрифтом выделены остатки в 383, 395, 397 и 398 положениях. Цифры в квадратных скобках в конце последовательности указывают, сколько еще имеется остатков в дополнение к 399, представленным в выравнивании

3.3. Выбор замен для стабилизации С-конца PseFDH.

Данные структурного моделирования, свидетельствующие о наиболее важной роли остатка Lys398 в поддержании структуры PseFDH, не согласуются с данными

множественного выравнивания. Вероятно, именно взаимодействие Asp9-Lys398 вносит существенный вклад в высокую термостабильность PseFDH по сравнению с другими формиадегидрогеназами. Таким образом, представляется перспективным проведение следующих замен на С-конце PseFDH для предотвращения его расщепления:

1) Lys383. Данные множественного выравнивания указывают на кандидатную замену Lys383Ala

2) Lys395. Этот остаток является приоритетным на проведение замен, поскольку при выделении PseFDH из природного штамма получается фермент с С-концом, отщепленным по этому положению. Анализ модельной структуры свидетельствует, что этот остаток хорошо доступен растворителю – его боковая цепь экспонирована в раствор, что, по-видимому, и обуславливает его доступность действию протеаз. Данные многопараметрического выравнивания указывают, что кроме остатков Lys и Arg в этом положении также встречаются остатки Gln, Asn и очень редко Glu. С точки зрения подобия структур наиболее оптимальным является остаток Gln. Именно его и было решено ввести в новую PseFDH.

3) Lys397. В этом положении наблюдается достаточно широкая вариабельность – встречаются остатки Glu, Gln, Asp, Ser, Thr, Gly, однако наиболее часто и примерно с одинаковой частотой встречаются остатки Glu и Gln (в структуре MorFDH в этом положении как раз остаток Glu). Однако нами было решено сделать замену Lys397Gln, поскольку имеются данные, что наличие на С-конце FDH отрицательно заряженных остатков увеличивает константу Михаэлиса по формиаду, то есть ухудшает каталитические свойства мутантного фермента.

4) Lys398. Поскольку данные структурного анализа свидетельствуют о важной роли этого остатка в поддержании структуры активного центра и всей белковой глобулы PseFDH, было решено замены этого остатка не делать.

5) Phe396. Во многих формиадегидрогеназах в этом положении встречается остаток Tyr, поэтому была смоделирована замена Phe396Tyr.

3.4. Анализ структуры мутантных PseFDH.

В пространственную структуру полноразмерной PseFDH были внесены замены Lys383Ala, Lys395Gln, Phe396Tyr, Lys397Gln. Методами молекулярной механики и молекулярной динамики были оптимизированы структуры мутантных

ферментов. Данные оптимизации показали, что замены Lys383Ala, Lys395Gln, и Lys397Gln не влияют на структуру PseFDH, в то же время замена Phe396Tyr приводит к искажению структуры.

Таким образом, на основании выполненных исследований *in silico* было решено получить *in vitro* два типа мутантных PseFDH:

- а) с двойной заменой Lys395Gln, и Lys397Gln и
- б) с точечной заменой Lys383Ala

Генетические конструкции, кодирующие эти мутантные ферменты, были получены на втором этапе. Ферменты были экспрессированы в клетках *E.coli*, получены в высокоочищенном виде и изучены их свойства. На основании результатов будет сделан вывод о возможности объединения всех трех замен и введения их в ген гибридного фермента NPPseFDH-P450BM3.

Таким образом, в соответствии с пунктом 1.3 ПГ и 4.3 ТЗ выполнены работы по созданию конструкции гибридного цитохрома P450 BM3 с ФДГ, устойчивого к действию компонентов крови для тестирования кандидатных молекул эффекторов:

1. Создание генно-инженерных конструкций, кодирующих выбранные на первом этапе белки, тестирование получения препаратов ферментов и анализ их кинетических свойств с выбором лучшего мутанта;

2. Создание генно-инженерных конструкций, кодирующих гибридный цитохром P450, получение препарата фермента и анализ его протеазной стабильности.

3. Проведение направленного мутагенеза и получение генно-инженерных конструкций, кодирующих выбранные белки, анализ кинетических свойств и выбор лучшего мутанта;

- получение генно-инженерных конструкций, кодирующих гибридный цитохром P450; экспрессия и получение препаратов гибридного цитохрома P450;
- анализ протеазной стабильности исходного и полученного препарата гибридных цитохромов P450.

3.5. Конструирование праймеров для проведения направленного мутагенеза с помощью ПЦР

Стандартная методика проведения направленного мутагенеза с помощью ПЦР включает две стадии полимеразной реакции. Сначала проводят две реакции с прямым и обратным праймерами, содержащие требуемые замены. Затем полученные фрагменты объединяются и проводится третья «объединяющая» ПЦР, позволяющая получить фрагмент, в котором имеются заданные мутации, а на 5'- и 3'- концах финального фрагмента имеются сайты рестрикции, по которым данный фрагмент клонируется в полный ген фермента. В случае гена NPseFDH оказалось, что рядом с местами введения нуклеотидных замен уже есть сайты рестрикции, что позволило провести введение нуклеотидных замен и клонирование полученных фрагментов уже после одной ПЦР. В Таблице 3.1 приведены последовательности праймеров, использованных в данной работе.

Таблица 3.1. Последовательности праймеров, использованных для введения замен K383A, K395Q, K397Q в ген мутантной NPseFDH*

N	Название	Нуклеотидная последовательность
1	K383A_f	5' – CGGCGCGCATTCCTACTCG <u>GC</u> GGGCAATGCCACTGGCGGTTC G' – 3'
2	PseFDH_r	5' –TCGAATTCAGACCGCCTTCTTGAAC–3'
3	PseFDH_XhoI_f	5' –GACCTCGAGGCGATGCATGTCCG–3'
4	K395Q_r	5' TCGAATTCAGACCGCCTTCTTGAAC <u>T</u> GGCGGCCTCTTCCGA ACC–3'
5	K397Q_r	5' – TCGAATTCAGACCGCCTTCT <u>G</u> GAACTTGGCGGCCTCTTCC– 3'
6	K395Q_K397Q_r	5' – TCGAATTCAGACCGCCTTCT <u>G</u> GAACT <u>G</u> GGCGGCCTCTTC–3'

*Подчеркиванием указаны сайты рестрикции. Полужирным шрифтом с подчеркиванием указаны вводимые нуклеотидные замены, приводящие к целевым аминокислотным заменам.

Все шесть праймеров были сконструированы в соответствии с общими правилами создания праймеров (примерно равный G/C состав, одинаковая температура отжига). При выборе соответствующего триплета учитывали оптимальные для *E.coli* кодоны для Ala (GCG) и Gln (CAG). Кроме того, для эффективного расщепления продуктов ПЦР с помощью рестриктаз рядом с сайтом распознавания дополнительно добавляли по два нуклеотида. Для унификации всех манипуляций были использованы рестриктазы, работающие со 100% эффективностью в одном типе буфера. Температура отжига у всех праймеров составляла 62-64°C.

3.6. Получение генетических конструкций с мутантными NPseFDH

Замена Lys383Ala проводилась с помощью праймеров K393A_f и PseFDH_r. В случае замен в районе остатков Lys395 и Lys397 использовали специальные обратные праймеры K395Q_r, K397Q_r и K395Q_K397Q_r и один общий прямой праймер PseFDH_XhoI_f.

В качестве матрицы использовали ген NPseFDH в плазмиде pET23a. Полимеразная цепная реакция проводилась на амплификаторе «T100 Thermal Cycler» по следующей методике. К праймерам (20 пкмоль каждого) добавляли 2,5 мкл 10-кратного буфера для ПЦР, поставляемого фирмой производителем вместе с ферментом, 1 мкл раствора MgCl₂ (25 мМ), 2 мкл раствора dNTP (2,5 мМ каждого), 1 мкл раствора геномной ДНК (50 нг/мкл), 0,5 мкл Phusion ДНК полимеразы (5 ед./мкл) и 17 мкл деионизованной воды до общего объема 25 мкл. ПЦР проводили по следующей схеме: Прогрев при 97 °С в течение 5 мин, затем 30 циклов (10 с при 98°C, 10 с при 72°C, 1,5 мин при 72°C) и заключительная стадия элонгации 10 минут при 72°C. После окончания реакции продукты хранились при 4°C. Полученные продукт ПЦР очищали с помощью ДНК-электрофореза в агарозном геле, обрабатывали смесью эндонуклеаз рестрикции и повторно очищали электрофоретически. В случае замены Lys383Ala ПЦР фрагмент обрабатывали рестриктазам BssHII и EcoRI. В случае замен K395Q, K397Q и двойной замены K395Q/K397Q полученные фрагменты обрабатывали рестриктазами XhoI и EcoRI (ThermoFischer). Расщепление проводили в соответствии с инструкциями и в

буферном растворе фирмы производителя. По завершении реакции рестрикции ферменты инактивировали нагреванием в течение 10 мин при 62 °С.

Обработанные рестриктазами и очищенные фрагменты ДНК с заданными заменами лигировали с плазмидой pNPseFDH, расщепленной такой же парой рестриктаз и очищенной с помощью электрофореза в агарозном геле. После завершения реакции лигирования (как правило в течение ночи при 12 °С), лигазной смесью трансформировали клетки *E.coli* штамм DH5 α : *fhuA2* Δ (*argF-lacZ*)U169 *phoA glnV44* Φ 80 Δ (*lacZ*)M15 *gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*. Клетки высевали на агаризованной среде, содержащей 200 мкг/мл ампициллина. На следующий день с чашки брали по три колонии и культивировали в течение ночи в 4 мл среды 2YT (на л среды - 16 г бактотриптона, 10 г дрожжевого экстракта, 5 г хлорида натрия, pH 7,0), содержащей 250 мкг/мл ампициллина. Далее полученные клетки осаждали центрифугированием и плазмидную ДНК выделяли с помощью набора для выделения плазмидной ДНК (Qiagen, Австрия). Чистоту полученных плазмид контролировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Далее полученные плазмиды (в среднем 3 образца) отправляли на секвенирование в ЦПК «Геном». Все гены ферментов секвенировали по двум цепям с использованием секвенирующих праймеров. Данные секвенирования показали 100% эффективность мутагенеза и отсутствие в мутантных генах посторонних замен.

3.7. Экспрессия и очистка препаратов рекомбинантных ферментов

Для получения рекомбинантных препаратов мутантной NPseFDH с точечной, двойными и тройной заменами, полученными плазмидами трансформировали штамм *E.coli* BL21 (DE3) Codon Plus /pLysS: B⁻ F⁻ *ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm*⁺ Tet^r *gal* λ (DE3) *endA* Hte [pLysS *argU ileY leuW* Cam^r].

Единичную колонию с чашки Петри помещали в пробирку с 4 мл среды 2YT (16 г/л бактотриптона, 10 г/л дрожжевого экстракта (оба “Difco”, США), NaCl 5 г/л, pH 7,0), содержащую антибиотики хлорамфеникол (25 мкг/мл) и ампициллин (150 мкг/мл), и культивировали на качалке при 37 °С и 180 об/мин в течение 12 часов. Ночную культуру пересевали в колбу с отбойниками (общий объем 500 мл, объем среды 60 мл), разбавление в 1000 раз (60 мкл посевного материала, 60 мл среды 2YT, с хлорамфениколом (25 мкг/мл) и ампициллином 150 мкг/мл), и культивировали на

качалке при температуре 37°C, 120 об/мин. При достижении величины поглощения среды на 600 нм (A_{600}) значения 0,6-0,8 содержимое колбы делили на три равные части по 20 мл и переносили в три колбы на 1 л с отбойниками, содержащими 180 мл среды 2YT без добавления антибиотиков, и культивировали при 30 °C и 120 об/мин. Далее при достижении величины поглощения A_{600} 0,6-0,8, проводили индукцию, добавляя в среду для культивирования раствор лактозы (300 г/л) до конечной концентрации индуктора 20 г/л, снижали температуру до 20°C и продолжали культивирование до утра (20 °C, 120 об/мин). Утром клетки осаждали на центрифуге фирмы Beckman J-21 (“Beckman”, США) в течение 20 мин при 5000 об/мин, 4 °C (стаканы 250 мл, ротор J14).

Полученную биомассу ресуспендировали в 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 8,0 (концентрация клеток 10% по весу) и замораживали при 20 °C. После разморозки клетки разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе Branson Ultrasonic 250 (“Branson”, США). Полученную суспензию без центрифугирования подвергали термообработке в течение 20 минут при 55°C. Далее раствор оставляли при комнатной температуре на 30 мин и осаждали клеточный дебрис центрифугированием (30 мин, 18000 об/мин, 4 °C, ротор J-20). Супернатант отделяли от осадка, к нему при постоянном перемешивании добавляли твердый сульфат аммония до концентрации 35% от насыщения и оставляли при +4 °C на 4-4,5 часа. Для удаления образовавшегося осадка проводили центрифугирование (30 мин, 18000 об/мин, 4 °C, ротор J-20), отделяли супернатант, который наносили на колонку 2,5x12 см с высокозамещенной фенил-сефарозой Phenyl Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech, Швеция), уравновешенную 0,1 М фосфатным буфером, содержащем 1,4 М сульфата аммония, pH 7,9 (раствор А). После нанесения фермента колонку промывали раствором А до исчезновения поглощения на 280 нм. Фермент элюировали с колонки нисходящим линейным градиентом сульфата аммония (35-0% от насыщения) в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,0, общий объем градиента 500 мл. Во время проведения хроматографии собирали фракции по 5 мл и измеряли поглощение на 280 нм (A_{280}) и ферментативную активность. Отбирали фракции с постоянным отношением (Активность/ A_{280}). Обессоливание и перевод фермента в требуемый буфер проводили с помощью гель-фильтрации через Sephadex G25 (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция).

Активность рекомбинантной NPseFDH определяли спектрофотометрически по накоплению NADPH на длине волны 340 нм ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) на спектрофотометре «Schimadzu UV 1800» при 30°C в 0,1 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,0. Концентрация формиата натрия и NADP^+ в кювете составляла 0,6 М и 2 мг/мл соответственно.

3.8. Анализ чистоты полученных препаратов рекомбинантных ферментов

Чистоту полученных препаратов рекомбинантных ферментов определяли с помощью аналитического электрофореза в 12% полиакриламидном геле в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия на приборе Mini Protean II фирмы “Bio-Rad” (США) по протоколам фирмы производителя.

Концентрацию NPseFDH определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм на спектрофотометре “Schimadzu UV 1800” («Schimadzu», Германия), используя коэффициент поглощения $\epsilon_{280} 1\% 1 \text{ cm}^{-1}$. Для расчета молярной концентрации использовали значение молекулярной массы 88000 кДа.

Активность свободных мутантных NPseFDH определяли спектрофотометрически по образованию NADPH на 340 нм на спектрофотометре фирмы Shimadzu модель 1800, оборудованной термостатируемым блоком на 6 кювет с контролем температуры на элементах Пелтье. Условия определения активности: температура 30 °C, кювета с рабочим объемом 1 мл и длиной оптического пути 1 см. Концентрации субстратов – 2 мг/мл NADP^+ и 0,3 М формиата в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7.0.

Кинетические параметры исходной и мутантных NPseFDH определяли, варьируя концентрацию одного из субстратов в диапазоне 0,5 – 5 Км при насыщающей концентрации второго субстрата (2,5 мМ кофермента и 0,6 М формиата). Значения V_m и K_m рассчитывали из зависимости скорости от концентрации субстрата с помощью метода нелинейной регрессии (пакет Origin 8.5). Полученные значения представляют собой среднее из трех независимых экспериментов.

Как уже было сказано выше, на первом этапе была получена мутантная NPseFDH_K383A.

На рисунке 3.6 представлены результаты анализа препаратов клеток на разных стадиях культивирования

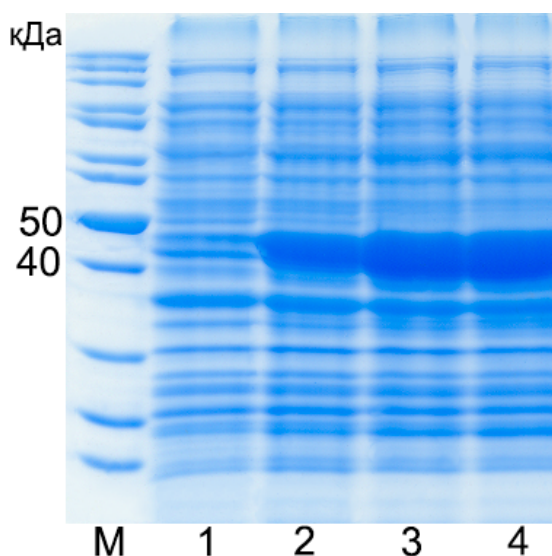


Рисунок 3.6 – Результаты аналитического электрофореза проб биомассы клеток с мутантной *NPseFDH_K383A* на разных временах экспрессии. *M* – маркер молекулярных масс, *1* – 0 часов после индукции, *2* – 2 часа после индукции, *3* – 4 часа после индукции, *4* – 6 часов после индукции

Как видно из этого рисунка, содержание целевого фермента составляет не менее 40% от общего количества растворимых белков в клетке. Аналогичные результаты были получены и при экспрессии других мутантных форм *NPseFDH*. Такой результат не является неожиданным, поскольку все вводимые замены находят на С-конце фермента и не должны влиять на уровень экспрессии фермента при условии правильного выбора оптимальных для *E.coli* кодонов.

На рисунке 3.7 представлены результаты анализа чистоты финальных препаратов фермента с помощью аналитического электрофореза.

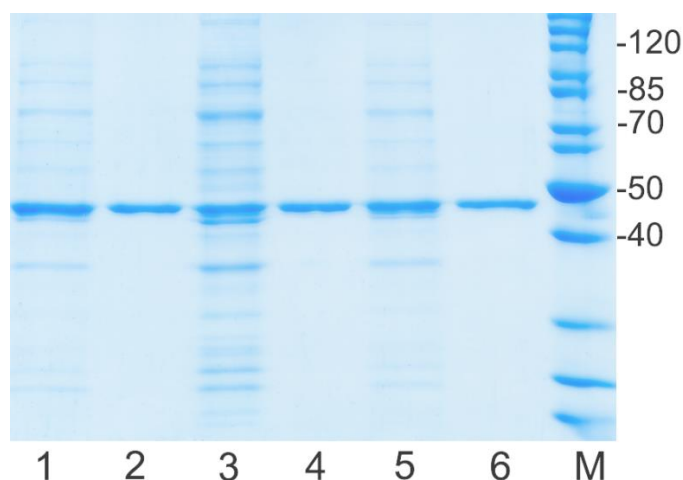


Рисунок 3.7 – Аналитический электрофорез различных вариантов NPseFDH в денатурирующих условиях. 1 — Исходная NPseFDH, NPseFDH_K383A, 2 и 3 — NPseFDH_K383A после и до очистки, 4 — NPseFDH_K383A/K395Q после очистки, 5 — NPseFDH_K383A/K395Q после очистки, 6 — NPseFDH_K383A/K395Q/K397Q очистки, M — маркер молекулярных масс

В таблице 3.2 представлены результаты определения кинетических параметров полученных препаратов мутантных NPseFDH.

Таблица 3.2. Кинетические параметры исходной NPseFDH и новых мутантных форм*

Фермент	$K_M^{\text{NAD(P)}^+}$, мкМ	$K_M^{\text{HCOO}^-}$, мМ	k_{cat} , с ⁻¹
NPseFDH	52±2	89±7	5,3±0,2
NPseFDH_K383A	59±2	92±7	5,2±0,2
NPseFDH_K383A/K395Q	63±20	94±9	5,3±0,3
NPseFDH_K383A/K397Q	66±20	88±8	5,1±0,3
NPseFDH_K383A/K395Q /K397Q	65±10	93±10	5,2±0,3

*Данные являются средним из трех независимых экспериментов. Каталитические константы рассчитывали как результат деления величины максимальной скорости на концентрацию активных центров фермента.

Поскольку предполагалось объединение всех потенциально полезных замен, то сначала были определены каталитические свойства мутанта NPseFDH K383A. Практически идентичные каталитические параметры этого мутанта по сравнению с исходной NPseFDH позволили использовать его в качестве матрицы для получения мутантов по положениям 395 и 397. Как следует из таблицы 3.2, введение в мутант NPseFDH K383A замен K395Q и K397Q также не привело к изменению

кинетических параметров по сравнению с исходным ферментом. Поэтому все три замены были объединены в одном мутанте NPseFDH_K383A/K395Q /K397Q. Это объединение также не изменило кинетические параметры. Такой результат является очень важным, поскольку в гибридном белке необходимо удалить максимально возможное количество остатков лизина, по которым может проходить расщепление фермента и в то же время вводимые замены не должны были привести к ухудшению каталитических свойств.

Здесь мы также хотели бы остановиться на важности работ по моделированию замен, выполненных на первом этапе выполнения работ. На основе такого анализа нами и были предложены наиболее оптимальные с нашей точки зрения замены остатков лизина в 395 и 397 положениях именно на остатки глутамина.

3.9. Получение и очистка гибридного фермента NPseFDH-P450_ВМЗ с новой мутантной NPseFDH_K383A/K395Q /K397Q

Для создания конструкции использовали плазмиду с геном гибридного фермента на основе коммерческой плазмиды рЕТ28а. Плазмиду обработали рестриктазами XhoI и EcoRI, и вырезанный фрагмент очищали с помощью электрофореза в агарозном геле. Аналогично теми же рестриктазами была обработана плазида с геном NPseFDH_K383A/K395Q /K395Q и в этом случае наоборот выделяли фрагмент ДНК XhoI – EcoRI, содержащий фрагмент гена NPseFDH с требуемыми заменами, который также очищали с помощью электрофореза в агарозном геле. Полученные фрагменты смешивали, добавляли лигазу и оставляли лигироваться на 4 часа. Лигазной смесью трансформировали клетки *E.coli* штамм DH5α(*fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17* и высевали на агаризованную среду 2YT, содержащую канамицин в концентрации 30 мкг/мл. На следующие день отобрали три колонии для выделения плазмид. Плазмиды были секвенированы как описано выше для подтверждения последовательности гена гибридного белка.

Для получения штамма-продуцента нового гибридного белка полученными плазмидами трансформировали клетки *E.coli* штамм BL21 (DE3) Codon Plus /pLysS: *B F– ompT hsdS(rB- mB-) dcm+ Tetr gal λ(DE3) endA Hte [pLysS argU ileY leuW Camr*. С чашек брали единичную колонию и переносили в среду 2YT содержащую

канамицин в концентрации 30 мкг/мл. Клетки из ночной культуры пересевали в колбы объемом 1л, содержащие 200 мл среды с аналогичной концентрацией канамицина до поглощения $A_{600} = 0,08-0,1$. Клетки растили при 37°C и 120 об/мин, периодически отбирая пробы для измерения поглощения. По достижении поглощения $A_{600} = 1,0$ из колб отбирали пробы объемом 1 мл и к клеточной суспензии добавляли индуктор экспрессии (IPTG) до концентрации 200 мкМ. Экспрессию фермента проводили при 120 об/мин и различных температурах (20°C, 25°C и 30°C). Каждые два часа отбирали пробы для измерения поглощения клеточной суспензии, белкового электрофореза и измерения активности фермента. Индикатором окончания экспрессии служило появление синей окраски в колбах с клетками. Далее клетки охлаждали во льду и осаждали центрифугированием (6000 об/мин, 4°C, 30 минут). После удаления супернатанта осадок ресуспендировали в буфере Tris-HCl 50 mM pH 7,5 и замораживали при -20°C.

Далее осуществлялась очистка гибридного фермента. Экстракция ферментов из клеток штамма-продуцента проводилась с использованием ультразвукового дезинтегратора Branson Ultrasonic (США) итерациями по 1 минуте с перерывами на охлаждение во льду. За разрушением клеток следили по измерению активности. Полученную суспензию центрифугировали при 1000 об/мин и +4°C. Для дальнейшей работы использовался полученный супернатант.

Для предотвращения гидролиза бактериальными сериновыми протеазами добавляли ингибитор сериновых протеаз PMSF к суспензии клеток до финальной концентрации 100 мкМ.

Для проведения очистки использовался метод металл-хелатной хроматографии. К бесклеточному экстракту добавляли буферный раствор 0,25M Tris-HCl pH 7,5, содержащий 0,15M NaCl. Полученный раствор фильтровали и наносили на колонку HisTrap HP 1 ml (GE Healthcare, США). Для нанесения фермента использовался буфер В (0,05 M Tris-HCl pH 7,5, содержащий 0,15M NaCl). После нанесения фермента колонку промывали буфером В до падения поглощения на 280 нм. Элюирование проводили с помощью градиента растворов В и С (В + 300 mM имидазола). После элюции целевого белка, колонку промывали раствором D (В + 500 mM имидазола).

Для удаления имидазола из пробы очищенного белка проводили обессоливание на колонке 1x10 см с Sephadex G25 (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция), уравновешенной требуемым буфером. На колонку наносили фракции объемом около 1 мл. Для каждой собранной фракции определяли ферментативную активность и поглощение на 280 нм.

На рисунке 3.8 представлены результаты аналитического электрофореза в денатурирующих условиях препарата гибридного фермента с исходной NPseFDH (дорожка 2) и препарата гибридного фермента с NPseFDH, содержащим три дополнительные замены.

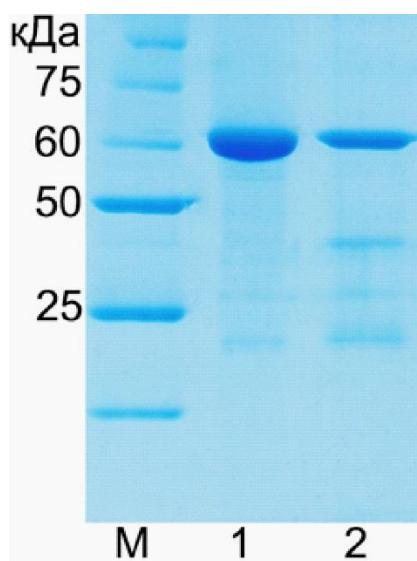


Рисунок 3.8 – Аналитический электрофорез в денатурирующих условиях полученных образцов гибридных ферментов. М – маркеры молекулярной массы белков. 1 – препарата гибридного фермента NPseFDH_P450_BM3 с новой мутантной NPseFDH_K383A/K395Q/K395Q. 2 – препарат исходного гибридного фермента

Данные, представленные на рисунке 3.8, однозначно свидетельствуют, что в случае исходного гибридного фермента (дорожка 2) происходит его деградация даже в процессе выделения. Хорошо видна полоса с молекулярной массой около 45 кДа, соответствующей молекулярной массе субъединицы NPseFDH. Кроме того, имеется полоса с еще более низкой молекулярной массой (менее 20 кДа). Эта полоса может быть результатом деградации самого цитохрома P450_BM3. В случае препарата гибридного фермента с новой мутантной NPseFDH такая полоса также присутствует, но в гораздо меньших количествах. Из литературы известно, что такая деградация возможна, и именно деградация является причиной того, что до сих пор не удалось получить кристаллы полноразмерного P450_BM3.

В то же время, в случае гибридного фермента, содержащего ген NPseFDH_K383A/K395Q/K397Q (дорожка 1), отсутствует полоса, соответствующая белку с молекулярной массой формиаатдегидрогеназы. Более того, более высокая интенсивность полосы гибридного фермента указывает на то, что он лучше противостоит деградации протеазами в ходе культивирования.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов нами создана генетическая конструкция, кодирующая гибридный фермент NPseFDH-P450_BM3, который не подвергается деградации примесными протеазами в ходе культивирования и очистки. Нами также поставлены эксперименты по длительному хранению нового гибридного фермента для проверки его стабильности против деградации протеазами в ходе хранения.

Полученный препарат гибридного фермента, стабильного при выделении, можно использовать для анализа реакционной способности отобранных кандидатных молекул в реакции гидроксирования цитохромом P450, которые будут выполняться на следующих стадиях работ проекта.

3.10. Заключение к Разделу 3

Моноксигеназа цитохром P450 использует NADPH, поэтому для катализа необходима система регенерации NADPH. Ранее была получена PseFDH с измененной коферментной специфичностью от NAD⁺ к NADP⁺, что позволяет использовать PseFDH в системах регенерации NADPH, но необходимо усилить устойчивость С-конца фермента к протеолизу. Для этого в рамках работ на отчетном этапе создана 3D модель полноразмерной структуры PseFDH на основе структур гомологичных ферментов, структура оптимизирована методами молекулярной механики и молекулярной динамики. Проведен анализ 7 аминокислотных остатков на С -конце PseFDH и структуры мутантов PseFDH с разными заменами, сделан вывод, что протеолиз PseFDH_400 на С конце возможен по остаткам Lys383, Lys395, Lys397. В связи с этим выбраны следующие варианты с оптимальной пространственной структурой: с точечными заменами Lys383Ala, Lys395Gln, Lys397Gln, и с тройной заменой Lys383Ala/Lys395Gln/Lys397Gln для повышения стабильности. В качестве первичной матрицы использовалась мутантная NADP⁺-зависимая PseFDH2 (NPseFDH), которая входит в состав гибридного фермента

NPseFDH-P450_BM3. Исследование свойств мутантной NPseFDH K383A показало, что такая замена не влияет на каталитические свойства фермента. Поэтому две остальные замены проведена с использованием в качестве исходной этой мутантной формы фермента. Получены два двойных мутанта: NPseFDH K383A/K395Q5 и NPseFDH K383A/K397Q и финальный тройной мутант NPseFDH K383A/K395Q/K397Q. Нуклеотидные последовательности, кодирующие мутантные NPseFDH, были подтверждены секвенированием. После получения генетических конструкций была проведена экспрессия мутантных ферментов, затем они были получены в очищенном виде, и определены их кинетические параметры (удельная активность и константы Михаэлиса по NADP⁺ и формиату). Оказалось, что все три мутанта обладают близкими каталитическими параметрами не только между собой, но и по сравнению с исходной мутантной NPseFDH. Ген NPseFDH K383A/K395Q/K397Q был переклонирован в плазмиду, кодирующую гибридный фермент NPseFDH-P450BM3. Было проведено тестовое культивирование штаммов *E.coli* – продуцентов исходного гибридного фермента и слитого белка с новой мутантной NPseFDH K383A/K395Q/K397Q. После культивирования рекомбинантные белки были частично очищены с помощью металл-хелатной хроматографии. Анализ полученных образцов с помощью денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДСН показал, что в полученном препарате гибридного фермента с мутантной PseFDH отсутствует свободная NPseFDH, которая присутствует в исходном препарате гибридного белка. Полученные данные свидетельствуют, что введение в исходную NPseFDH трех замен K383A/K395Q/K397Q предотвращает гидролиз нового гибридного фермента под действием примесных протеаз.

Ниже коротко приведены сведения о составе работ Соисполнителя и отчетных материалах с описанием работ согласно п 4.3. ТЗ:

Работы «Моделирование полноразмерной структуры формиатдегидрогеназы из *Pseudomonas* sp.101 длиной 400 аминокислотных остатков на основе полноразмерной холо-формы структуры ФДГ из *Moraxella* sp.C1» описаны в подразделе 3.1.

Работы «Анализ 7 остатков на С-конце с помощью множественного выравнивания с известными последовательностями ФДГ в Genbank» описаны в подразделе 3.1.

Работы «Выбор 6-9 наиболее перспективных замен и анализ структуры этих мутантов описаны в подразделе 3.1.

Работы «Выбор двух вариантов с оптимальной пространственной структурой описаны в подразделах 3.2-3.3.

Работы «Проведение направленного мутагенеза и получение генно-инженерных конструкций, кодирующих выбранные белки, анализ кинетических свойств и выбор лучшего мутанта» описаны в подразделах 3.3-3.4, 3.8.

Работы «Получение генно-инженерных конструкций, кодирующих гибридный цитохром P450; экспрессия и получение препаратов гибридного цитохрома P450» описаны в подразделе 3.5-3.8.

Работы «Анализ протеазной стабильности исходного и полученного препарата гибридных цитохромов P450» описаны в подразделе 3.9.

Согласно п 5.3. ТЗ:

«Работы должны выполняться с использованием биоинформатических компьютерных методов для анализа первичной и четвертичной структуры фермента» Требование выполнено, см подраздел 3.2. Поиск последовательностей формиаатдегидрогеназ в базе транслированных последовательностей GeneBank проведен с использованием программы BLAST с модифицированными критериями.

«Нуклеотидные последовательности полученных конструкций должны подтверждаться секвенированием на наличие только требуемых замен». Требование выполнено, раздел 3.5.

«Анализ протеазной стабильности должен быть проведен как с помощью аналитического электрофореза в денатурирующих условиях, так и с помощью гельпроникающей хроматографии.» Требование выполнено, подраздел 3.9.

4. ВЫБОР МОДЕЛЬНОГО ОБЪЕКТА ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ГЕРОПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ СОЕДИНЕНИЙ

Существует несколько теорий, пытающихся объяснить процесс старения, но все они являются дискуссионными [12,13].

Известно, что на протяжении старения наблюдается хронический окислительный стресс, вызванный дисбалансом между выработкой свободных радикалов и антиоксидантной защитой, что способствует функциональному ухудшению организма [14].

Одним из фактов, связанных со старением, является ухудшение функционирования иммунной системы, которая претерпевает ряд изменений, известных как иммуностарение, что приводит к повышенной уязвимости к инфекциям и опухолям [15]. Иммунная функция является важным маркером здоровья. Было показано, что по изменениям в иммунных функциях можно судить о процессе старения каждого человека и прогнозировать долголетие у мышей [16]. Высказано предположение, что функциональное состояние иммунных клеток участвует в провоспалительных реакциях и, следовательно, в скорости старения каждого человека [17].

На сегодняшний день клеточные и молекулярные механизмы, лежащие в основе старения, изучены лишь поверхностно, что является препятствием в разработке эффективных профилактических мер и новых методов лечения, которые могли бы предотвратить старение в целом и ухудшение функций мозга в частности. Старение является проявлением многочисленных изменений внутренних и внешних компонентов клеток. Особенно уязвимы к старению нейроны центральной нервной системы (ЦНС), поскольку накопление поврежденных белков, липидов и нуклеиновых кислот значительно ухудшает их жизнеспособность [18]. Более того, изменения в клеточной среде, например, астроцитов и олигодендроцитов, могут существенно влиять на нейроны [19]. Для старения ЦНС характерны такие процессы, как снижение синаптической эффективности и потеря нейронов [20]. Это неизбежно влияет на сенсорные, двигательные и когнитивные функции организма и тесно связано с развитием возрастных патологий [21]. Именно поэтому усилия исследователей сосредоточены на поиске механизмов, вовлеченных в процессы старения и связанных с ним нейродегенеративных заболеваний, что может привести

к значительному улучшению медицинской помощи стареющему населению.

В рамках работы по пункту 1.4 ПГ и 4.4 ТЗ модельные организмы рассмотрены с точки зрения оценки способности реагировать на фармакодинамические эффекты, также рассмотрены фармакодинамические профиль, виды животных, пол, возраст.

Процесс старения носит плеiotропный характер, и его механизмы сильно различаются у разных видов животных [22]. Тем не менее, при соответствующем анализе, разнообразие путей, связанных со старением, должно оказаться скорее помощью, чем помехой, поскольку каждая из различных животных моделей вносит свой вклад в понимание различных частей механизма старения – будь то роль конкретных генов, молекулярных механизмов или сложных межклеточных взаимодействий, участвующих в старении. Точечные генетические или фармакологические воздействия в различных системах моделей животных позволяют идентифицировать маркеры старения в различных физиологических системах и/или функциях, поэтому совокупность данных, собранных в различных моделях, поможет расшифровать основные факторы, лежащие в основе старения.

Модельные организмы являются незаменимыми инструментами для изучения генов, ассоциированных со старением, поскольку позволяют исследовать механизмы старения, схожие с таковыми у человека, в более управляемых условиях и в течение короткого времени [23]. Такие организмы, как мышь (*Mus musculus*), нематода (*Caenorhabditis elegans*), плодовая мушка (*Drosophila melanogaster*) и дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*), играют ключевую роль в изучении генетики старения. Эти простые модельные системы могут независимо воспроизводить все фенотипы старения, что делает их наиболее популярными модельными организмами в исследованиях старения, о чем свидетельствуют многочисленные исследования [24,25]. Поиск по терминам «мышь» и «старение» в базе данных PubMed дает примерно 74 000 результатов, что является самым высоким показателем среди всех других видов. Эти организмы демонстрируют консервативные механизмы, регулирующие продолжительность жизни, например, инсулиноподобный сигнальный путь и пути аутофагии [26]. Однако остаётся вопрос: какие из модельных организмов наиболее близки к человеку по числу ортологов генов, связанных со старением, и какие из них обладают наибольшим разнообразием

протеоформ?

С развитием технологий, таких как высокопроизводительное секвенирование и масс-спектрометрия, стало возможным проводить систематический анализ протеомов модельных организмов, включая альтернативный сплайсинг, посттрансляционные модификации и одноаминокислотные полиморфизмы [27,28]. Эти данные создают основу для детальной оценки функциональных возможностей организмов, а также позволяют рассмотреть широту спектра протеоформ, то есть разнообразие вариантов белков, которые один ген может кодировать. Информационные ресурсы, такие как UniProtKB, играют ключевую роль в аннотировании этих данных и являются важным инструментом для изучения генетического разнообразия на уровне протеома [29].

Часть работы по данному разделу была направлена на оценку пересечения генов старения у человека с геномами 30 модельных организмов, с использованием данных о консервативных ортологах. В отличие от предыдущих исследований [24], которые были сосредоточены на ограниченном числе видов, наше исследование охватывает широкий спектр организмов, включая не только мышей, дрозофил и нематод, но и более редкие виды для определения потенциальной возможности их применения в исследованиях. Информация для поиска ортологичных генов была получена из ранее опубликованной работы [30], которая представляет собой систематический обзор исследований по теме старения человека. Мы провели сравнительный анализ по двум выборкам: полный набор из 2227 отобранных генов старения человека и подвыборка из 272 генов, ассоциированных с модельными организмами. Этот подход позволяет нам не только идентифицировать основные модели, которые могут быть использованы для исследования старения человека, но и оценить степень изученности организмов с точки зрения их протеомных характеристик, таких как частота сплайсинга и посттрансляционные модификации, что также связано с эволюционными различиями между видами. Информация, касающаяся аннотации генома, необходима для точного моделирования молекулярных процессов, происходящих в организме человека как в норме, так и при патологии.

4.1. Модельные организмы в исследованиях старения: эволюция аннотаций баз данных и открытие ортологов

Информация для проведения анализа была взята из двух крупных биологических баз данных: UniProt (release 2024_04) [29] и Ensembl (release 2024_05) [105]. Эти ресурсы предоставляют наиболее полные и актуальные данные о белках, их функциях и связанных геномах, что позволяет нам провести сравнительный анализ с учетом двух разных омикс-наук: геномики и протеомики, и получить в итоге комплексное представление о степени изученности организмов. Информация из Uniprot использовалась в анализе только для белков со статусом «reviewed», то есть прошедших экспертную проверку. В число генов Ensembl помимо экспериментально подтвержденных записей, входят и автоматически сгенерированные записи с помощью биоинформатических алгоритмов предсказания. Для анализа использовались таксономические идентификаторы организмов из базы данных NCBI Taxonomy Database.

Расчет количества протеоформ проводили для человека и ряда модельных объектов, наиболее популярных в работах по изучению старения. Перечень отобранных для анализа видов приведен в Таблице 4.1. В список модельных организмов были включены 29 видов, для которых есть данные полногеномного секвенирования. Выбирали организмы, названия которых наиболее часто встречаются в текстах научных публикаций согласно данным биомедицинской библиотеки PubMed/MEDLINE (NCBI Resource Coordinators, 2014) путем анализа ассоциированных с публикациями терминов MeSH с помощью системы Scanbious [106] по запросу “proteomics in aging”. Среди отобранных организмов были представители царства бактерий, грибов, растений и животных.

Используемый в работе подход основан на предположении о том, что количество протеоформ (Np) может быть рассчитано как

$$Np(H) = f(p; H),$$

где p – набор параметров, загружаемых из молекулярно-биологических информационных ресурсов, а H – информационная модель, отражающая взаимосвязи между параметрами p .

Предположительно, значения параметров p не являются постоянными во времени, что следует из наблюдения: базы данных постоянно пополняются.

Перечень параметров p , используемых для оценки количества протеоформ:

- N – Количество белок-кодирующих генов в геноме;
- ASg – Количество генов, подвергающихся альтернативному сплайсингу;
- ASd – Доля генов в геноме, подвергающаяся альтернативному сплайсингу (ASg/N);
- AS – Количество аминокислотных последовательностей, образованных в результате альтернативного сплайсинга;
- $ASav$ – Среднее количество сплайс-вариантов на один ген (AS/ASg);
- $SAPg$ – Количество генов, содержащих однонуклеотидные замены, реализуемые в одноаминокислотные полиморфизмы (ОАП);
- $SAPd$ – Доля генов в геноме, содержащих однонуклеотидные замены, реализуемые в одноаминокислотные полиморфизмы (ОАП) ($SAPg/N$);
- SAP – Количество аминокислотных последовательностей, содержащих ОАП;
- $SAPav$ – Среднее количество вариантов последовательностей, содержащих ОАП, на один ген ($SAP/SAPg$);
- $PTMg$ – Количество генов, соответствующих белкам с посттрансляционными модификациями (ПТМ);
- $PTMd$ – Доля генов в геноме, кодирующих ПТМ-содержащие белки ($PTMg$ к N);
- PTM – Количество аминокислотных последовательностей, содержащих ПТМ;
- $PTMav$ – Среднее количество вариантов последовательностей, содержащих ПТМ, на один ген ($PTM/PTMg$);
- Np (H) – Количество протеоформ (ширина протеома), H - информационная модель.

Рассмотрены несколько расчетных информационных моделей из ранее опубликованных нами работ Пономаренко и др. [107] и Сарыгиной и др. [108], отражающих гипотетические варианты комбинации молекулярных событий, приводящих к возникновению протеоформ (формулы 1-3):

$$Nps_1 = N \times (1 + ASd \times ASav + SAPd \times SAPav + PTMd \times PTMav) \quad (1)$$

$$Nps_2 = Nps_1 + AS \times (SAPav + PTMav) \quad (2)$$

$$Nps_3 = Nps_2 + N \times SAPav \times PTMav + AS \times SAPav \times PTMav \quad (3)$$

Отличие модели 1 в том, что она основывается на предположении о том, что изменения первичной структуры белка (ОАП, либо ПТМ) возникают только в условно канонических вариантах последовательностей аминокислотных остатков, в отличие от модели 2, в которой ОАП и ПТМ возникают также и на сплайс-вариантах. Модель 3 учитывает совместное возникновение ПТМ и ОАП в любых аминокислотных последовательностях.

Все полученные расчетные параметры для человека и модельных организмов представлены в Приложении Б. Значения многообразия протеоформ, полученные с использованием предложенных трех различных моделей показаны в Таблице 4.2. На основе полученных данных определяли вклад различных молекулярных событий в разнообразие спектра протеоформ и делали вывод об изученности организма.

Для нахождения степени пересечения генов старения человека с геномами других модельных видов производили поиск генов-ортологов воспользовавшись инструментом OrthoFinder (v2.5.5) [109]. Канонические белковые последовательности гена в формате fasta были выгружены для каждого ID таксона с базы UniProtKB (Swiss-Prot). Перечень генов, ассоциированных со старением (n=2227), получен в результате нашего мета-анализа протеомных исследований плазмы крови человека [30]. Для составления итогового списка были взяты результаты 17 публикаций, выполненных с использованием технологии Olink [110–112], SOMAscan [113–117], масс-спектрометрии [118–123] и других различных протеомных методов [124,125]. Итоговый список генов, связанных со старением человека, включал в себя все идентификаторы, показавшие связь со старением по результатам представленных выше исследований. Список из 272 генов был получен при интеграции общего списка с данными публикации Lehallier et al. [117], для которых показана связь представленных генов старения с модельными организмами. Перечни генов старения доступны на сайте ИБМХ на странице <https://www.ibmc.msk.ru/articles/article-178>, таблица «Идентифицированные ортогруппы генов, связанные со старением у человека и модельных организмов».

Чтобы понять, какие модельные организмы чаще всего используются в экспериментах, посвященных протеомике старения, был проведен анализ MeSH-терминов публикаций с PubMed, результаты которого можно увидеть на Рисунке 4.1. По понятным причинам, связанным со значимостью этих исследований для

продления человеческой жизни, на первый план выходит MeSH-термин “Humans”. Исследования с участием людей позволяют напрямую изучать возрастные изменения в протеоме и связывать их с прогрессирующими во времени заболеваниями, такими как рак, сердечно-сосудистые патологии, нейродегенеративные нарушения. MeSH-термин “Mice”, как отдельная модель, фигурируют в 2220 публикациях, что делает их основным организмом для экспериментальных исследований старения. Особенно выделяется линия инбредных мышей C5BL - одна из самых широко используемых линий благодаря генетически однородному фону.

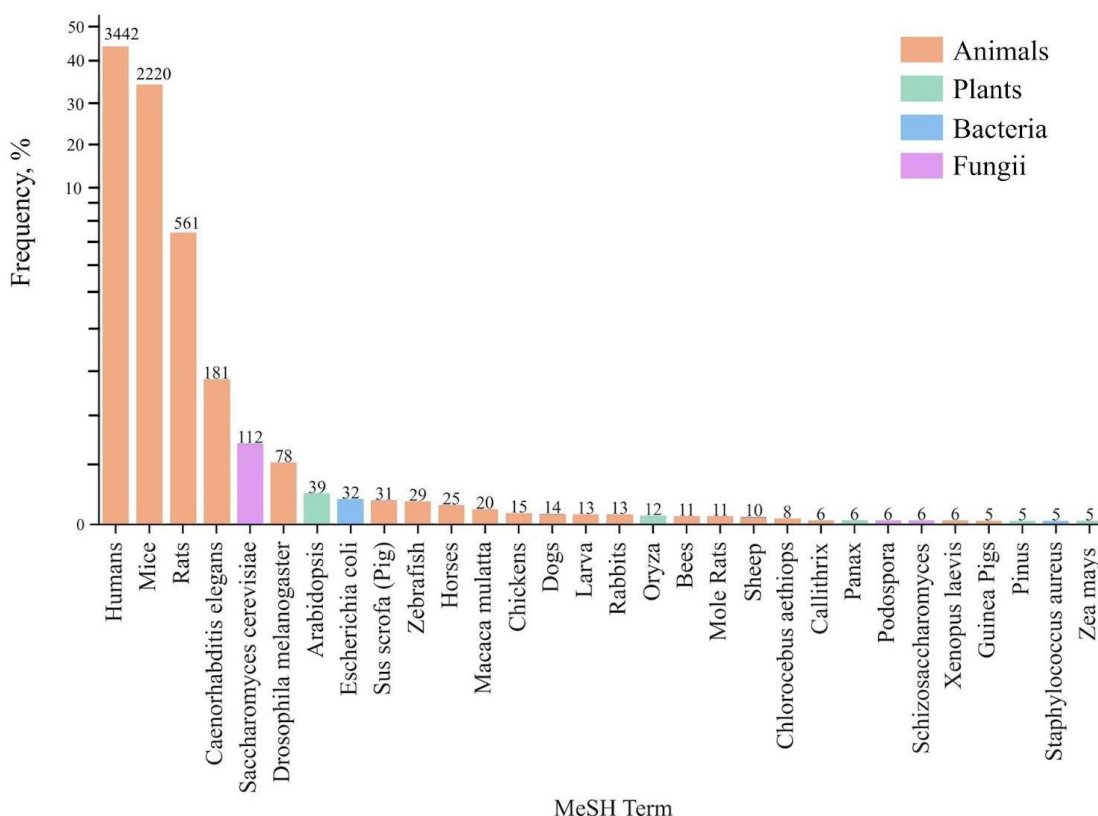


Рисунок 4.1 – Топ-30 MeSH-терминов, ассоциированных с организмами, которые аккумулировались по запросу "proteomics in aging". По оси X - MeSH-термины, по y - частота встречаемости, а числа над столбцами - количество публикаций

Стоит обратить внимание на популярность моделей нематоды *Caenorhabditis elegans* (181 публикация) и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (101 публикация) и их важную роль в изучении фундаментальных механизмов старения. Эти простые организмы позволяют исследовать базовые клеточные процессы на молекулярном

уровне. Их использование дополняет исследования на более сложных организмах, таких как мыши и крысы. Как видно из Рисунка 4.2, большинство отобранных MeSH-терминов имеют более общее или родовое название модельного организма. Далее в исследовании, мы выбрали для каждого термина самый популярный вид, основываясь список самых репрезентативных видов, представленных Uniprot (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/statistics>).

В дальнейшем мы провели характеристику, основанную на степени изученности, для выбранного набора из 30 организмов. Степень изученности геномов модельных объектов оценивали пропорционально количеству генов в геноме, для которых есть проверенные экспертом аннотации в разделе UniProtKB/SwissProt (версия 2024_04). Чем большее количество генов имеет экспертные аннотации (описания) в UniProtKB/SwissProt, тем более изученным является организм. Доля аннотированных генов представляет собой отношение экспериментально подтвержденных генов UniProtKB ко всем генам Ensembl (автоматически сгенерированным аннотациям генов).

Более чем для 90% организмов доля аннотированных экспертом генов (записей в разделе UniProtKB/SwissProt) составляет 10–20 %. Только 7 видов (сюда входит человек и мышь) имеют долю аннотированных генов в геноме более 75 %. Мы сопоставили данные о количестве проверенных экспертом аннотаций для генов наиболее популярных модельных объектов (см. Таблицу 4.1).

Таблица 4.1 – Количество аннотированных экспертами базы UniProt генов (представленных в разделе UniProtKB/SwissProt) для наиболее популярных модельных объектов

№	Вид	Идентификатор таксона	Количество генов (Ensembl)	БКГ (UniProtKB/SwissProt)	Доля аннотированных генов, %	Царство
1	Staphylococcus aureus	1280	6220	10245	164*	Бактерии
2	Escherichia coli (strain K12)	83333	5079	6066	119*	Бактерии
3	Homo Sapiens	9606	19846	20429	103*	Животные

Продолжение таблицы 4.1

№	Вид	Идентификатор таксона	Количество генов (Ensembl)	БКГ (UniProtKB/SwissProt)	Доля аннотированных генов, %	Царство
4	Saccharomyces cerevisiae	559292	6600	6727	101*	Грибы
5	Schizosaccharomyces pombe	284812	5145	5201	101*	Грибы
6	Pinus koraiensis (Korean pine)	88728	71	71	100	Растения
7	Mus musculus (Mouse)	10090	21700	17228	82	Животные
8	Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)	3702	27655	16389	59	Растения
9	Rattus norvegicus (Rat)	10116	24964	8205	32	Животные
10	Drosophila melanogaster (Fruit fly)	7227	13986	3796	27	Животные
11	Caenorhabditis elegans	6239	19985	4487	22	Животные
12	Gallus gallus (Chicken)	9031	17077	2309	13	Животные
13	Oryza sativa subsp. japonica (Rice)	39947	35804	4190	11	Растения
14	Danio rerio (Zebrafish) (Brachydanio rerio)	7955	30153	3343	11	Животные
15	Sus scrofa (Pig)	9823	22040	1459	6,6	Животные
16	Oryctolagus cuniculus (Rabbit)	9986	20599	978	4,7	Животные
17	Canis lupus familiaris (Dog)	9615	20974	854	4	Животные
18	Xenopus laevis (African clawed frog)	8355	108155	3507	3,2	Животные

Продолжение таблицы 4.1

№	Вид	Идентификатор таксона	Количество генов (Ensembl)	БКГ (UniProtKB/SwissProt)	Доля аннотированных генов, %	Царство
19	<i>Panax ginseng</i> (Korean ginseng)	4054	6050	135	2,2	Растения
20	<i>Zea mays</i> (Maize)	4577	39756	853	2,1	Растения
21	<i>Ovis aries</i> (Sheep)	9940	21890	467	2,1	Животные
22	<i>Cavia porcellus</i> (Guinea pig)	10141	18095	306	1,6	Животные
23	<i>Macaca mulatta</i> (Rhesus macaque)	9544	21591	365	1,6	Животные
24	<i>Equus caballus</i> (Horse)	9796	21426	292	1,3	Животные
25	<i>Apis mellifera</i> (Honeybee)	7460	9935	99	1	Животные
26	<i>Podospora anserina</i>	515849	10544	100	0,9	Грибы
27	<i>Chlorocebus aethiops</i> (Green monkey)	9534	19165	128	0,6	Животные
28	<i>Callithrix jacchus</i> (White-tufted-ear marmoset)	9483	21965	110	0,5	Животные
29	<i>Triticum aestivum</i> (Wheat)	4565	145065	381	0,2	Растения
30	<i>Heterocephalus glaber</i> (Naked mole rat)	10181	23320	6	0,03	Животные

* Виды, аннотированные избыточно в сравнении с Ensembl

Данные Таблицы 4.1 свидетельствуют о том, что геномы более примитивных видов (например, бактерий или грибов) охарактеризованы полнее, чем геномы других организмов. Если не рассматривать простые организмы, то единственный вид, для которого аннотирован полный геном (около 100 % генов аннотированы

экспертами и присутствуют в разделе UniProtKB/SwissProt), – это человек. Исследование других видов организмов так или иначе направлено на получение информации о человеке, о его молекулярном функционировании, развитии патологических состояний.

От 10 до 90 % генома аннотировано для видов, представленных в пп. 7–14 Таблицы 4.1. Наиболее полно описаны продукты экспрессии генома мыши (для 82% генов присутствуют экспертные аннотации в UniProtKB/SwissProt). Среди растений наиболее полно охарактеризован геном *Arabidopsis thaliana* – для него аннотировано более половины генов. Также, среди них такие известные модельные объекты, как *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* и *Danio rerio*. Доля аннотированных генов для них составляет 27, 22 и 11 %, соответственно. Проект «Геном Зебрафиш» (Zebrafish Genome Project) был начат 22 года назад [126]. Из 30 тыс. белок-кодирующих генов, предсказанных в геноме *Danio rerio*, экспертная аннотация в UniProtKB/SwissProt есть для 3,3 тыс. генов; несмотря на то, что около 70 % генов человека имеют ортологи в геноме Zebrafish [126]. Наиболее часто этот объект используют для моделирования генетических заболеваний человека, описывая взаимосвязи между мутацией и фенотипическими проявлениями. Интерес к исследованию молекулярной микрогетерогенности на белковом уровне только в самом начале, о чем свидетельствует сравнительно небольшое количество записей о белках Zebrafish в протеомных базах.

Среди организмов, для которых аннотировано менее 10 % генов, большинство относится к царству Животные. В этот список вошли такие известные модельные организмы, как свинья (*Sus scrofa*), собака (*Canis lupus familiaris*), лошадь (*Equus caballus*) и другие. Эти наиболее информативные модели с точки зрения исследования заболеваний человека, тем не менее, остаются невостребованными.

Данные о многообразии протеоформ (ширине протеомов) выбранных модельных объектов суммированы в Таблице 4.2. Разнообразие бактериального протеома обусловлено в основном наличием одноаминокислотных полиморфизмов и посттрансляционных модификаций. Среди грибов наиболее изучены виды *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*. *Saccharomyces cerevisiae* по количеству протеоформ, кодируемых одним геном, наиболее близок к животным: предполагается, что один ген *Saccharomyces cerevisiae* может кодировать от 2 до 15

вариантов белков, что сопоставимо с показателями для *Mus musculus* (см. Таблицу 4.2).

Таблица 4.2 – Количество протеоформ (ширина протеома) некоторых видов модельных организмов согласно трем расчетным информационным моделям (формулы 1-3, раздела Материалы и Методы). Приведено как общее количество протеоформ для модельного объекта, так и среднее количество протеоформ, кодируемых одним белок-кодирующим геном (БКГ)

№	Царство	Обозначение *	БКГ	Количество протеоформ всего (на 1 БКГ)		
				Nps ₁	Nps ₂	Nps ₃
1	Бактерии	ECOLI	6066	7238 (1,2)	7368 (1,2)	37528 (6,2)
2	Бактерии	STAAU	10245	11254 (1,1)	11254 (1,1)	59712 (5,8)
3	Грибы	PODAN	100	102 (1)	102 (1)	202 (2)
4	Грибы	YEAST	6727	14794 (2,2)	16572 (2,5)	100972 (15)
5	Грибы	SCHPO	5201	7934 (1,5)	8188 (1,6)	37196 (7,2)
6	Животные	APIME	99	172 (1,7)	193 (1,9)	842 (8,5)
7	Животные	CAEEL	4484	7914 (1,8)	22490 (5)	69332 (15,5)
8	Животные	CALJA	110	494 (4,5)	625 (5,7)	2072 (18,8)
9	Животные	CANLF	848	3510 (4,1)	4276 (5)	12307 (14,5)
10	Животные	CAVPO	306	931 (3)	1185 (3,9)	3272 (10,7)
11	Животные	CHLAE	128	558 (4,4)	709 (5,5)	2578 (20,1)
12	Животные	DANRE	3338	4483 (1,3)	7067 (2,1)	32953 (9,9)
13	Животные	DROME	3796	12844 (3,4)	35464 (9,3)	151871 (40)
14	Животные	HORSE	292	1159 (4)	1302 (4,5)	5962 (20,4)
15	Животные	CHICK	2309	4229 (1,8)	7058 (3,1)	33259 (14,4)
16	Животные	HETGA	6	13 (2,2)	13 (2,2)	13 (2,2)
17	Животные	MACMU	365	1374 (3,8)	1851 (5,1)	9108 (25)
18	Животные	HUMAN	20429	228613 (11,2)	722907 (35,4)	3245524 (158,9)
19	Животные	MOUSE	17775	82775 (4,7)	202478 (11,4)	749909 (42,2)
20	Животные	RABIT	978	4381 (4,5)	5598 (5,7)	19569 (20)
21	Животные	SHEEP	467	1620 (3,5)	1927 (4,1)	8340 (17,9)
22	Животные	RAT	8202	38059 (4,6)	60773 (7,4)	217124 (26,5)
23	Животные	PIG	1459	6486 (4,4)	7600 (5,2)	27664 (19)
24	Животные	XENLA	3507	4814 (1,4)	6734 (1,9)	47145 (13,4)
25	Растения	ARATH	16431	29015 (1,8)	76736 (4,7)	395227 (24,1)

Продолжение таблицы 4.2

№	Царство	Обозначение *	БКГ	Количество протеоформ всего (на 1 БКГ)		
				Nps ₁	Nps ₂	Nps ₃
26	Растения	ORYSJ	4190	5256 (1,3)	7902 (1,9)	28387 (6,8)
27	Растения	PANGI	135	150 (1,1)	159 (1,2)	159 (1,2)
28	Растения	PINKO	71	82 (1,2)	82 (1,2)	82 (1,2)
39	Растения	WHEAT	381	505 (1,3)	505 (1,3)	3267 (8,6)
30	Растения	MAIZE	853	1152 (1,4)	1560 (1,8)	12859 (15,1)

* **APIME** - *Apis mellifera*, **ARATH** - *Arabidopsis thaliana*, **CAEEL** - *Caenorhabditis elegans*, **CALJA** - *Callithrix jacchus*, **CANLF** - *Canis lupus familiaris*, **CAVPO** - *Cavia porcellus*, **CHLAE** - *Chlorocebus aethiops*, **DANRE** - *Danio rerio*, **DROME** - *Drosophila melanogaster*, **HORSE** - *Equus caballus*, **ECOLI** - *Escherichia coli*, **CHICK** - *Gallus gallus*, **HETGA** - *Heterocephalus glaber*, **MACMU** - *Macaca mulatta*, **HUMAN** - *Homo sapiens*, **MOUSE** - *Mus musculus*, **RABIT** - *Oryctolagus cuniculus*, **ORYSJ** - *Oryza sativa* subsp. *japonica*, **SHEEP** - *Ovis aries*, **PANGI** - *Panax ginseng*, **PINKO** - *Pinus koraiensis*, **PODAN** - *Podospora anserina*, **RAT** - *Rattus norvegicus*, **YEAST** - *Saccharomyces cerevisiae*, **SCHPO** - *Schizosaccharomyces pombe*, **STAAU** - *Staphylococcus aureus*, **PIG** - *Sus scrofa*, **WHEAT** - *Triticum aestivum*, **XENLA** - *Xenopus laevis*, **MAIZE** - *Zea mays*.

Наибольшее расчетное количество протеоформ получено для млекопитающих. У человека эта величина составляет от 228 тыс. до 3,2 млн различных форм в зависимости от принимаемой информационной модели (Таблица 4.2). Геном мыши, содержащий около 18 тыс. генов, потенциально кодирует 750 тыс. различных белков. Немного меньше – около 400 тыс. протеоформ – у растений (на примере *A. thaliana*, геном которого содержит 16 тыс. кодирующих генов). Наименьшее разнообразие кодируемых белков у организмов с небольшим количеством белок-кодирующих генов – дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) и бактерий – около 95 и 27 тыс., соответственно. Для голого землекопа (*Heterocephalus glaber*) (у этого организма минимальный геном) расчетное количество протеоформ равно 16. Согласно данным UniProtKB/SwissProt, для этого организма показано только наличие ПТМ для белков, кодируемых 4 генами из 6. Расчетные параметры для всех организмов можно найти в Приложении Б.

В контексте изучения старения человека мы предлагаем использовать гибкий подход к выбору критериев для подбора модельных организмов в зависимости от конкретной задачи исследования. Исследователи могут руководствоваться несколькими критериями: во-первых, это простота организма, во-вторых, степень изученности организма, о которой можно судить по охвату имеющихся геномных и

постгеномных данных; в-третьих, число генов, ортологичных человеческим, что важно для перекрестного анализа генов, участвующих в общих биологических процессах.

Эволюционно родственные гены (гомологи) у разных видов часто делятся на пары генов, возникшие в результате событий видообразования (ортологи), и пары генов, возникшие в результате событий дупликации (паралоги) [127]. Ортологи имеют тенденцию быть функционально более похожими, чем паралоги, что показано в работах [128–130]. Группа генов, произошедших от общего предка и сохранивших свою функцию в разных видах называется ортогруппами [109] (Рисунок 4.2).

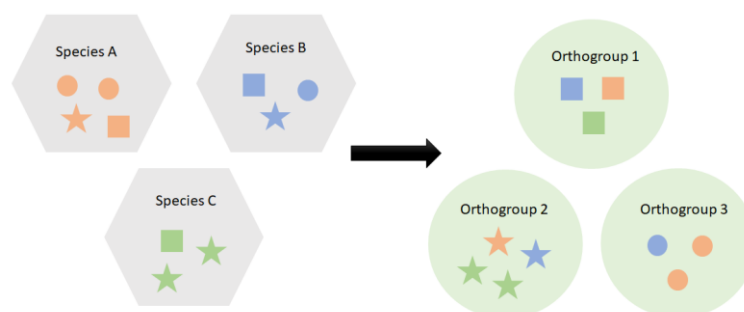


Рисунок 4.2 – Схематичное изображение процесса формирования ортогрупп. Белки из протеомов разных видов в формате сравниваются между собой и на основе меры схожести объединяются в ортогруппы. По их количеству можно косвенно судить о близости сравниваемых видов

Поиск ортологов (ортогрупп) проводили с помощью инструмента OrthoFinder [109], что позволило оценить степень пересечения генов старения человека с геномами других модельных видов (Таблица 4.3)

Таблица 4.3 – Сравнение группы генов старения по модельным организмам

Организм	Количество ортогрупп, в которых присутствуют гены старения человека	
	Белки плазмы крови человека, ассоциированные со старением (n=2227)	Соответствующая связь со старением или здоровьем модельных организмов [176] (n=272)
Mus musculus	1827	253

Продолжение таблицы 4.3

Организм	Количество ортогрупп, в которых присутствуют гены старения человека	
	Белки плазмы крови человека, ассоциированные со старением (n=2227)	Соответствующая связь со старением или здоровьем модельных организмов [176] (n=272)
<i>Rattus norvegicus</i>	1295	213
<i>Gallus gallus</i>	552	116
<i>Caenorhabditis elegans</i>	496	102
<i>Sus scrofa</i>	494	114
<i>Drosophila melanogaster</i>	452	95
<i>Xenopus laevis</i>	446	91
<i>Danio rerio</i>	438	103
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	381	62
<i>Arabidopsis thaliana</i>	377	68
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	354	56
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	346	78
<i>Canis lupus familiaris</i>	310	79
<i>Oryza sativa subsp</i>	185	36
<i>Ovis aries</i>	165	48
<i>Equus caballus</i>	148	44
<i>Macaca mulatta</i>	144	38
<i>Cavia porcellus</i>	121	38
<i>Escherichia coli</i>	115	19
<i>Zea mays</i>	85	16
<i>Callithrix jacchus</i>	61	20
<i>Chlorocebus aethiops</i>	58	24
<i>Staphylococcus aureus</i>	58	12
<i>Triticum aestivum</i>	44	13
<i>Apis mellifera</i>	17	8
<i>Podospira anserin</i>	16	3
<i>Heterocephalus glaber</i>	5	0
<i>Panax ginseng</i>	5	0
<i>Pinus koraiensis</i>	4	0

Таблица 4.3 представляет результаты поиска ортологов для группы человеческих генов, ассоциированных со старением, с использованием 30 модельных организмов. Исследование было проведено на двух наборах данных: полный список из 2227 генов и подвыборка из 272 генов.

Для каждого модельного организма представлено количество ортогрупп, в которых удалось идентифицировать ортологи для человеческих генов старения. Например, у мыши (*Mus musculus*) и крысы (*Rattus norvegicus*) найдены ортологи для 1827 и 1295 человеческих генов старения, соответственно, что делает их ведущими видами для исследований в данной области.

В первую очередь, высокое количество ортологов для генов старения описанных выше грузынов связано с обширными исследованиями их геномов. Геномы этих видов аннотированы на уровне, близком к человеческому, что позволяет достоверно идентифицировать ортологи и изучать их функцию. Это подчеркивает их роль как центральных модельных видов для исследований возрастных заболеваний и процессов.

Менее изученные и более удаленные эволюционные группы, такие как насекомые и бактерии, показывают меньшую степень ортологического сходства с человеческими генами старения, что ограничивает их применение в определенных исследованиях. Для таких беспозвоночных, как *Caenorhabditis elegans* и *Drosophila melanogaster*, число ортологов меньше, чем для млекопитающих, несмотря на то, что они также широко используются в исследованиях старения. Это можно объяснить как эволюционными различиями, так и менее полным пониманием механизмов старения в этих группах. Растения (*Arabidopsis thaliana* и *Oryza sativa*) и грибы (*Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*) демонстрируют ограниченное количество ортологов для генов старения человека, что обусловлено не только эволюционной дистанцией, но и особенностями их геномов. Хотя геномы этих организмов относительно хорошо изучены, генетическая консервативность с точки зрения старения низкая. Тем не менее, они остаются ценными для исследований отдельных клеточных механизмов, таких как стрессовые ответы и клеточный цикл, которые также имеют отношение к старению.

Организмы с менее изученными геномами, такие как медоносная пчела (*Apis mellifera*), а также представители растений и беспозвоночных, демонстрируют

ограниченное количество ортологов. Это свидетельствует о том, что недостаточная аннотация геномов и ограниченное понимание их белкового состава затрудняют полное выявление ортологов для более сложных процессов, таких как старение. Более глубокая аннотация этих геномов могла бы внести значительный вклад в исследование старения, особенно если эти виды окажутся полезными для конкретных аспектов старения.

Проведенный анализ трендов упоминания модельных организмов в научной литературе позволил выявить наиболее активно исследуемые виды в контексте изучения старения, что свидетельствует о значительном исследовательском интересе к таким организмам (Рисунок 4.1). В топ-3, как и предполагалось, вошел человек, а также мышь и крыса. Эти общепринятые модели удобны и пригодны для изучения старения. Способность вводить интересующие последовательности ДНК (например, гены) в геном зародышевой линии сделала мышь мощной и незаменимой экспериментальной моделью в фундаментальных и медицинских исследованиях [131]. Введение человеческих генов в геном мышей для создания животных моделей, позволяющих изучать специфичные для человека гены и заболевания, может использоваться в контексте изучения сигнальных путей, регулирующих процесс старения или тестирования терапии [132].

Интересно, что в топ-30 модельных организмов вошли также и более филогенетически далекие от человека организмы, например бактерии и грибы, и некоторые растения. В последнее время для изучения механизмов старения все чаще стал использоваться вид грызунов *Heterocephalus glaber*, демонстрируя фенотип замедленного старения и устойчивость к возрастным функциональным заболеваниям [133]. У этого грызуна были найдены молекулярные механизмы устойчивости к химической индукции канцерогенеза вследствие ослабленной воспалительной реакции: потеря функции в генах RIPK3 и MLKL, которые необходимы для некроптоза, снижает воспаление [134]. Также группой Csaba Kerepesi и др. [135] были разработаны эпигенетические часы старения *Heterocephalus glaber*, показавшие значительные различия с мышью и человеком.

Технологический прогресс и появление омиксных технологий приводит к накоплению огромных объемов данных. Понимание того, какие организмы были изучены наиболее глубоко, помогает определить пробелы в знаниях и,

следовательно, выделить приоритеты для будущих исследований. Мы сконцентрировались на выбранном перечне животных моделей, и показали, как богатство данных о геноме напрямую влияет на возможный размер протеома.

Вследствие динамичной природы, отличающей протеом от генома, протеом биологических объектов характеризуется многообразием протеоформ (различных видов белков) и количеством копий каждой протеоформы. Возможности современных аналитических методов не позволяют экспериментально оценить размеры протеома. Для оценки многообразия протеоформ в работе предложена информационная модель и расчетные формулы, учитывающие частоты возникновения сплайс-вариантов мРНК, одноаминокислотных полиморфизмов и посттрансляционных модификаций, а также степень изученности объекта. Предложенный подход позволяет теоретически оценить многообразие белков протеома исследуемого объекта. Результаты анализа аннотаций UniprotKB показали, что роль в усложнении организмов играет не количество белок-кодирующих генов, а количество вариантов интерпретации, т. е. протеоформ. Так, наиболее изученные бактерии и грибы, показанные в Таблице 4.1, вследствие относительно небольшого количества постгеномных событий, обладают меньшим разнообразием протеоформ, чем животные (Таблица 4.2). Можно высказать предположение о значимости социальной составляющей, отражающей степень исследовательского интереса и, как следствие, количества опубликованных результатов исследования и доли аннотированных генов в геноме. Ранее этот феномен был замечен при работе с большими массивами научно-технической информации [136].

Подбор модельных организмов строго зависит от конкретной задачи исследования. Показав многообразие и экспериментальную изученность протеомов популярных моделей старения, мы охарактеризовали виды с точки зрения их генетической схожести с человеческим протеомом, а именно с белок-кодирующими генами, ассоциированными со старением. Анализ ортологии основан на алгоритмах выравнивания последовательностей белков модельного объекта с белками старения человека. Предположительно, гены ортологи, происходящие от одного общего предка, играют схожую функциональную роль в разных организмах. Абсолютными лидерами, у которых более 75% генов вошли в ортологические группы человеческих

генов старения, стали мышь и крыса, что делает их наиболее пригодными моделями для изучения молекулярных процессов. Эти модели имеют сопоставимое с человеком число белок-кодирующих генов, и в отличие от более простых моделей, таких, как например, дрозофила или нематода, имеют системы органов, схожих с человеческими как по функциям, так и по архитектуре. Фундаментальным инструментом для изучения генетики старения у млекопитающих является идентификация мутаций одного гена, которые увеличивают продолжительность жизни. В ряде работ [137,138] были продемонстрированы связи отдельных генов (точечная мутация в гене *Prop1*, транскрипционные факторы *POU*) с процессами продолжительности жизни особей. Генетически модифицированные мыши также использовались для подтверждения ранее найденных метаболических путях, участвующих в старении дрозофилы и *C. elegans* [139]. Результаты поиска ортологов показали также гомологию человека с такими животными, как *Gallus gallus*, *Sus scrofa*, *Xenopus laevis* и *Danio rerio*, а также грибами *Schizosaccharomyces pombe* и *Saccharomyces cerevisiae*. Дрожжи сыграли решающую роль в раскрытии молекулярной генетики многих основных клеточных процессов, таких как клеточный цикл [140], сворачивание белка [141], внутриклеточный трафик [142] и многие другие. Сходство генома (генов ортологов) между этим очень простым организмом и млекопитающими или даже человеком удивительно велико, что позволяет предположить, что этот организм может быть эффективной моделью заболеваний человека, в том числе и старения. Так, на дрожжах были открыты две парадигмы старения – репликативная продолжительность жизни (RLS) и хронологическая продолжительность жизни (CLS) [143].

4.1.1. *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster стала ключевой моделью в развитии современного понимания молекулярных механизмов старения. Используя ее многочисленные преимущества для экспериментов, недавние исследования показали, как точные пищевые и генетические вмешательства могут улучшить продолжительность жизни мух *Drosophila melanogaster* без очевидных побочных эффектов. Эти открытия подчеркивают, как расширение понимания метаболических и сигнальных взаимосвязей даст большее представление о том, как эти преимущества могут быть использованы для антивозрастных вмешательств.

Drosophila melanogaster используется в качестве модельного организма для исследований старения более 100 лет. Первый отчет о продолжительности жизни мух *Drosophila* в лабораторных условиях был опубликован в 1913 году [144]. Более систематическая работа по исследованию старения мух *Drosophila* была инициирована в 1921 году.

Характеристики выживания популяции *Drosophila* могут раскрыть информацию о прогрессировании старения, а также о любых дополнительных, сокращающих жизнь эффектах от смертей, не связанных со старением [145,146]. Типичная здоровая и хорошо поддерживаемая аутбридинговая популяция мух *Drosophila* имеет медианную продолжительность жизни приблизительно 70 дней и максимальную приблизительно 90 дней при 25 °C [147,148].

На более детальном уровне физиологического старения у мух *Drosophila* можно наблюдать многочисленные маркеры, связанные со старением. К ним относятся изменения метаболизма (снижение скорости метаболизма в состоянии покоя, снижение синтеза белков и жиров), поведения (снижение питания, уходаживания и исследования, а также увеличение фрагментации сна), снижение устойчивости к стрессу, снижение репродуктивной способности (снижение успешности откладывания яиц и вылупления, снижение выработки спермы и вспомогательной жидкости и конкурентной успешности спермы), изменение нейронной функции (нарушение обучения и памяти), изменение физической активности (нарушение отрицательного геотаксиса, снижение произвольного полета и ходьбы), снижение иммунной способности, прогрессирующая дисплазия и снижение барьерной функции в кишечнике, а также нарушение сердечной функции [149,150]. Эти особенности важно изучать по двум причинам: во-первых, чтобы понять, как любое вмешательство, изменяющее продолжительность жизни, может повлиять на прогрессирование этих показателей с течением времени, и, во-вторых, чтобы выяснить, играют ли какие-либо из этих изменений причинную роль в старении мухи и, таким образом, могут ли вмешательства быть направлены на замедление старения.

Муhy *Drosophila* имеют ряд преимуществ для использования в исследованиях процессов старения, а при использовании в сочетании с нематодой *Caenorhabditis elegans* и другими короткоживущими беспозвоночными, являются эффективным

инструментом для изучения эволюционно консервативных аспектов старения [151]. Как правило, нематоды живут около 3 недель, а мухи около 3 месяцев. Такие особенности дрософилы, как низкая стоимость выращивания и содержания, отсутствие надзора за ее использованием в экспериментах, простота создания больших популяций, четко определенные диетические потребности, легко поддающаяся количественной оценке репродуктивная способность мух, ее отдельные ткани, которые можно препарировать и генетически манипулировать, и большой набор легкодоступных генетических инструментов, включая реагенты для редактирования генома, делают ее эффективной моделью для исследований старения. Ткани мух эквивалентны многим из тех, которые встречаются у млекопитающих, включая сердце и почки, которые отсутствуют у *C. elegans*. Высокая доля (77%) генов, связанных со старческими заболеваниями у людей, экспрессируется в эквивалентных тканях мух [151]. Важно, что относительно короткая продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* означает, что их можно использовать в повторных сериях экспериментов для уточнения условий, которые продлевают жизнь.

Однако, некоторые из перечисленных преимуществ являются также недостатками. В частности, тот факт, что *Drosophila melanogaster* крайне мала, создает сложности для оценки ее здоровья при старении [152].

Таким образом, исследования на мухах *Drosophila* сыграли решающую роль в развитии нынешнего понимания молекулярной основы старения. В частности, сочетание четко определенных потребностей мухи в питании, ее генетически доступных систем тканей и короткой продолжительности жизни делает ее идеальной моделью для разработки точных вмешательств с целью продления здоровой продолжительности жизни.

4.1.2. Нематоды *Caenorhabditis elegans*

В последние годы широко распространенным модельным организмом для изучения процессов старения стала почвенная нематода *Caenorhabditis elegans*. Первоначально исследования в области старения *C. elegans* были сосредоточены на генетике старения и мутациях отдельных генов, которые значительно увеличили продолжительность жизни *C. elegans*. Существование таких мутаций является одной из главных причин популярности *C. elegans* как модельной системы для изучения

старения. Однако сегодня в области старения *C. elegans* используется множество различных подходов в дополнение к генетическим манипуляциям, которые влияют на продолжительность жизни. Например, такие экологические исследования, как ограничение калорийности, эволюционные исследования, популяционные исследования, модели возрастных заболеваний и скрининг лекарств для соединений, которые увеличивают продолжительность жизни, в настоящее время изучаются с использованием нематоды *C. elegans*.

C. elegans обладает множеством особенностей, которые делают ее подходящим в качестве экспериментальной системы для основных биомедицинских исследований, в частности, для исследований старения. Наиболее примечательным является их сравнительно короткая продолжительность жизни, около 3 недель [153,154]. Важно, что в течение своей жизни *C. elegans* демонстрирует множество легко наблюдаемых и количественно определяемых изменений, которые обычно связаны со старением, таких как дегенерация тканей, снижение подвижности и прекращение воспроизводства [155–157].

C. elegans развивается из яйца в полностью фертильную взрослую особь за 3 дня при 20 °C. 959 соматических клеток гермафродитов *C. elegans* (1031 для самцов) образуют несколько отдельных тканей, которые можно легко наблюдать с помощью световой и флуоресцентной микроскопии живых животных из-за их прозрачности. Баланс между достаточной сложностью и управляемым размером нервной системы глубоко повлиял на выбор *C. elegans* в качестве экспериментальной модельной нервной системы [158]. Связи между нейронами гермафродита, а также дополнительные специальные цепи между 385 мужскими нейронами были полностью картированы, что делает *C. elegans* организмом с наиболее изученным геномом на сегодняшний день [159–162].

C. elegans имеет несколько отдельных тканей (мышцы, нервная система, репродуктивная система, кишечник и эпидермис [также называемый гиподермисом]), которые участвуют как в старении червей, так и млекопитающих. Кишечник *C. elegans* примечателен тем, что он выполняет функции, сопоставимые не только с желудком и кишечником млекопитающих, но и с печенью, поджелудочной железой и жировой тканью [163]. Более того, кишечник *C. elegans* имеет некоторое функциональное сходство с системой кровообращения [164]. Черви

используют врожденную иммунную систему для борьбы с патогенами, которая активна в кишечнике и эпидермисе [165–167]. Мышцы *C. elegans* демонстрируют возрастную дисфункцию, которая напоминает человеческую саркопению [168], а нейродегенерация вызывает потерю когнитивных и поведенческих способностей у стареющего червя [169–172]. Противоположные сигналы от компонентов репродуктивной системы могут способствовать или замедлять старение [173], в то время как воспроизводство прекращается с возрастом. Методы для выделения отдельных клеток и тканей позволили провести полный транскриптомный анализ нейронов взрослых, кишечника, мышц и эпидермиса [173–177], благодаря чему было показано, что гиподерма является метаболической тканью. Наконец, благодаря наличию специфичных для тканей трансгенных методов экспрессии и нокдауна, у *C. elegans* возможно изучение межтканевой коммуникации.

4.1.2.1. Генетические и геномные особенности *C. elegans*

C. elegans был первым многоклеточным организмом, чей геном был полностью расшифрован с помощью дробового секвенирования (Shotgun sequencing) по Сэнгеру в 1998 году [176], при этом по мере развития технологий секвенирования в него постоянно вносятся уточнения [177,178]. Хотя геном *C. elegans* составляет примерно 1/30 размера человеческого генома, количество генов, кодирующих белки, схожи с человеком на 40-80% в зависимости от критериев сходства [179,180].

Кариотип *C. elegans* состоит из пяти пар аутосом (I–V), плюс пара X-хромосом у гермафродитов (XX). У самцов есть одна X-хромосома (XO), а пол определяется соотношением X:аутосома. Гермафродитное самооплодотворение производит в основном гермафродитное потомство, хотя самцы могут возникать посредством спонтанного нерасхождения X-хромосомы во время мейоза (0,2%) [181], и эта частота увеличивается с возрастом матери [182]. Гермафродиты и самцы каждый имеет свои особые экспериментальные преимущества: в то время как гермафродиты дают начало изогенной популяции при самооплодотворении, спаривание гермафродитов с самцами позволяет создавать новые комбинации аллелей [158]. Как и многие другие типы исследований *C. elegans*, исследования старения обычно проводятся с использованием популяций гермафродитов.

4.1.2.2. Продолжительность жизни у *C. elegans*

Основной целью исследований проблем старения является увеличение продолжительности здорового долголетия. Таким образом, важной задачей становится вопрос о том, связано ли увеличение продолжительности жизни у *C. elegans* с увеличением здорового долголетия. Переход от здорового к болезненному состоянию у *C. elegans* может быть проанализирован по нескольким параметрам, таким как движение тела и глоточно-насосная функция [156]. Кроме того, целостность тканей *C. elegans* снижается с возрастом [168], что сопровождается уменьшением тела червя и накоплением флуоресцентного липофусцина [183]. Было описано несколько новых метрик и аналитических инструментов для мониторинга активного, здорового периода жизни *C. elegans* [184,185], что отражает интерес к изучению здорового долголетия у долгоживущих особей *C. elegans*.

C. elegans используется в поисках кандидатов и высокопроизводительному препаратам, замедляющих старение [186,187]. Более того, все чаще микробиом признается важным фактором здорового старения у людей, и недавние исследования показывают, что продолжительность жизни *C. elegans* также модулируется бактериями и их метаболитами [188,189]. Помимо замедления старения, у *C. elegans* наблюдались явления, напоминающие омоложение, требующие дальнейшего исследования [190–192].

Подводя итог, можно сказать, что *C. elegans* является важнейшей экспериментальной системой для фундаментальных и трансляционных исследований старения.

4.1.3. *Danio rerio*

Несколько модельных организмов, от микроскопически малых беспозвоночных до приматов, были в центре внимания исследований механизмов старения [193]. Скорость физиологического старения среди этих видов варьируется, и процесс старения в целом можно классифицировать от быстрого до постепенного и незначительного. Беспозвоночные обычно демонстрируют быстрое развитие, короткую продолжительность жизни и быстрое старение. Хотя они по-прежнему дают большое понимание основных клеточных и молекулярных механизмов, они не обладают медленным ухудшением состояния, которое характеризует старение млекопитающих: черви и насекомые не умирают от типичных хронических

возрастных патологий человека, таких как онкология и инсульт [194]. В то же время, большинство позвоночных демонстрируют постепенное старение, часто связанное с большей максимальной продолжительностью жизни. Подробные геронтологические исследования на моделях бабуинов (30 лет) и птиц (семь лет и дольше) [195] зачастую сложны и изнурительны, поэтому в основном предпочтительной моделью старения являются мыши, живущие в течение двух-трех лет. Однако, в геронтологических исследованиях в значительной степени были упущены из виду рыбы, которые лишь частично использовались для прояснения фундаментального биологического процесса старения.

Некоторые виды костистых рыб имеют относительно короткую среднюю продолжительность жизни – три с половиной года, но при этом позволяют изучать механизмы старения по мере их постепенного развития, например, зебрафиш данио рерио (*Danio rerio*) [194]. Хотя они живут немного дольше грызунов, они разделяют возможность крупномасштабного мутационного анализа с моделями беспозвоночных [196].

В этом контексте *Danio rerio*, учитывая большое количество исследований развития и генетики, которые уже привели к обширной характеристике базовой биологии *Danio rerio* и соответствующих экспериментальных методов, имеет высокий потенциал в исследованиях геронтологии. Они обладают несколькими уникальными особенностями, которые дают много преимуществ. Одна самка *Danio rerio* производит несколько сотен прозрачных икринок каждую неделю, которые развиваются *ex utero* в полностью свободно плавающих личинок всего за 4-7 дней [196]. Особь достигает репродуктивной активности в возрасте от трех до пяти месяцев [197]. Таким образом, можно быстро приобрести и легко содержать тысячи рыб при очень низких затратах. Более того, большая часть генома *Danio rerio* секвенирована и, как было доказано, демонстрирует высокое сходство со многими генами человека [198].

Сложная программа развития генов *Danio rerio*, подобная млекопитающим, дает начало интегрированной нервной системе, для которой были картированы все основные области мозга и которая наделяет этих рыб передовыми когнитивными функциями и сложным социальным поведением [199]. Кроме того, широкая доступность экспериментальных процедур, специфичных для *Danio rerio* (подходы

к приобретению и потере функции, методы визуализации *in vivo*) и ресурсов (клоны, антитела, клеточные линии, линии репортерных рыб) будет способствовать дальнейшему увеличению усилий по исследованию старения этого вида [196].

Долгое время считалось, что старение *Danio rerio* незначительно, поскольку они испытывают неопределенный рост и обладают очень надежной регенеративной способностью. Однако скорость их роста значительно снижается с возрастом, и сообщается, что они демонстрируют стареющую морфологию и подвержены возрастной заболеваемости и смертности [196]. Было установлено, что *Danio rerio*, как и большинство позвоночных, подвержены постепенному старению, и поэтому они могут успешно использоваться как модель в геронтологии [196]. Непрерывные усилия последних десятилетий начали прояснять пути старения *Danio rerio*, иллюстрируя множество параллелей с другими видами позвоночных. Они демонстрируют те же типичные маркеры (например, повышенное повреждение ДНК [200] и повышенную экспрессию β -галактозидазы [201]) и возрастные фенотипы, которые часто схожи с возрастными патологиями у людей (например, снижение когнитивных способностей и остеоартрит [202]).

Благодаря своей прозрачности, неприхотливости, устойчивости к генетическому вмешательству и быстрой скорости роста и развития личинки *Danio rerio* используются в качестве моделей *in vivo* для различных заболеваний, включая воспалительные расстройства онкологические заболевания, неалкогольный стеатогепатит, неалкогольную жировую болезнь печени (НАЖБП) и сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ). Сходство липидных профилей и липогенной регуляции *Danio rerio* и людей является основным обоснованием их использования в исследованиях гиперлипидемии. Использование флуоресцентных и колориметрических методов, таких как маркировка липидных молекул, окрашивание кровеносных сосудов и макрофагов в личинках *Danio rerio*, позволяет визуализировать и оценивать транспорт липидов в живых личинках. Оценка некоторых липидов, таких как эфиры холестерина и уровни свободных жирных кислот в личинках с использованием биохимических анализов и ВЭЖХ может выявить мельчайшие различия в накоплении липидов у *Danio rerio*.

Несмотря на сложности с наблюдением разницы в весе у *Danio rerio* на личиночных стадиях, в том числе с помощью высокопроизводительных методов при

введении высокожировой диеты, измерение длины и ширины тела личинок может помочь понять изменение фенотипа моделей личинок с ожирением. Аналогично, оценка экспрессии генов с помощью ПЦР и вестерн-блоттинга может помочь сделать выводы относительно регуляции липидов и метаболизма личинок *Danio rerio*, находящихся на высокожировой диете. В статье [203] представлены подробные и систематические протоколы исследования параметров липидного профиля у личинок *Danio rerio* (рисунок 4.3).

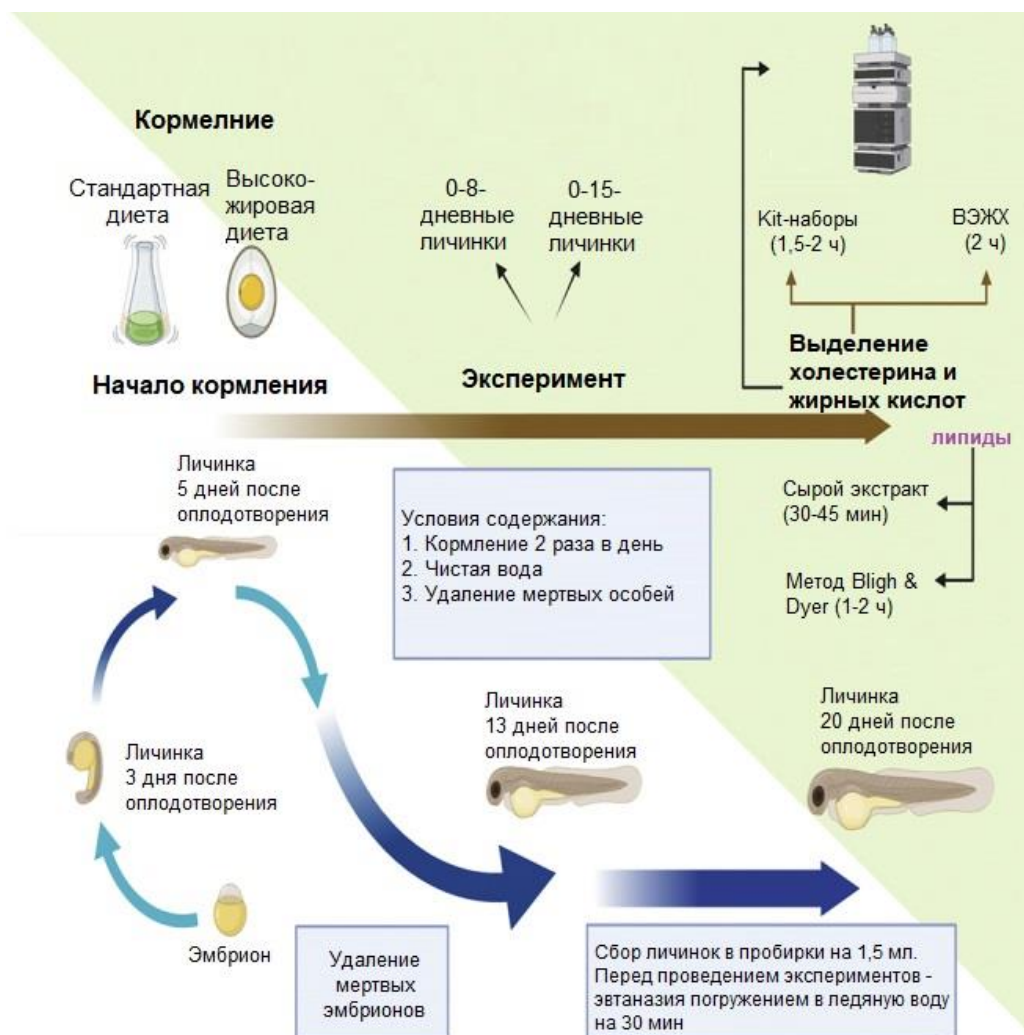


Рисунок 4.3 – Протоколы исследования липидного профиля у личинок *Danio rerio* (адаптировано из [167])

4.1.3.1. Возрастное изменение метаболизма *Danio rerio*

Установлено, что в возрасте от 12 до 24 месяцев у *Danio rerio* наблюдается снижение уровня активности фермента аконитазы, который участвует в общей митохондриальной дисфункции, влияя на эффективность цикла трикарбоновых кислот [204]. Было показано, что также меняется с возрастом липидный состав

митохондриальной мембраны *Danio rerio* [204]. В возрасте от 7 до 24 месяцев у *Danio rerio* снижаются уровни фосфатидилинозитола и кардиолипина [204]. Считается, что снижение кардиолипина связано с дисфункцией митохондрий в нескольких тканях других видов рыб и млекопитающих [205]. Накопление уровней сфингомиелина было описано в мозге стареющей форели и тканях млекопитающих, а также проявляется в анализах 24-месячных *Danio rerio* [206]. Таким образом, эти изменения в составе митохондриальных липидов у *Danio rerio* с возрастом согласуются с теми, которые наблюдаются в тканях млекопитающих.

Соматотрофная ось, включающая гормон роста (ГР) и его вторичный медиатор, инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР-1), является наиболее консервативным путем контроля старения в эволюции [207,208]. Хотя снижение уровней ГР и ИФР-1 характерно для физиологического старения, их искусственная индукция увеличивает продолжительность жизни [209]. Увеличение продолжительности жизни за счет ослабления сигнализации ИФР-1 и/или его целей, а также за счет ограничения калорийности было продемонстрировано на многих модельных организмах. В частности, было установлено, что повышенная экспрессия ГР как у молодых, так и у старых *Danio rerio* сопровождается повышенной выработкой активных форм кислорода, снижением экспрессии генов антиоксидантной системы защиты и ускоренным старением [210]. Описано, что продление жизни за счет ограничения калорийности замедляет процессы старения у нескольких видов рыб, которые демонстрируют постепенное старение, но еще не исследовалось у *Danio rerio* [211]. Было показано, что лишение пищи у *Danio rerio* сопровождается снижением регуляции нескольких митохондриальных генов, влияющих на биоэнергетику, что также было продемонстрировано у нескольких видов млекопитающих [196]. Кроме того, ограничение калорийности у *Danio rerio* вызывает двухфазную реакцию физической активности, сопоставимую с лишением пищи у млекопитающих: после повышенной активности в течение первых двух дней, *Danio rerio* затем становятся все более неактивными при длительном лишении пищи [212]. Хроническое ограничение калорийности вызывает значительное увеличение экспрессии орексина мозга – нейромедиатора, регулирующего возбуждение, бодрствование и аппетит [212]. Более того, были проведены изменения диеты для исследования усвоения питательных веществ и их

распределения, что выделяет *Danio rerio* как подходящую и ценную модель для метаболических нарушений, таких как ожирение и диабет II типа [213].

4.1.3.2. Старение организма *Danio rerio*

Дисрегуляция межклеточной коммуникации *Danio rerio* имеет важные последствия на функциональном уровне, влияя на общее состояние организма. Было показано, что подобно млекопитающим, у *Danio rerio* с возрастом ухудшаются репродуктивные способности [214]. Еще одним важным фенотипом, связанным со старением *Danio rerio*, является дисфункция сухожилий: их позвонки могут демонстрировать дегенерацию, напоминающую остеоартрит. У старых *Danio rerio* обычно наблюдается искривление позвоночника, снижение базальной локомоторной активности и способности к плаванию [210].

Ограниченное количество сообщений также демонстрирует нейродегенерацию в ЦНС стареющих *Danio rerio*. Постепенное прогрессирование атрофии сетчатки с возрастом можно наблюдать у *Danio rerio* в возрасте от 20 до 58 месяцев [201]. Хотя это не подтверждено на уровне тканей, когнитивные нарушения также указывают на потерю нейронов и/или нейронных синапсов в других областях нервной системы [210]. Молодые *Danio rerio* могут легко адаптироваться к новому режиму времени приема пищи или новому пространственному сигналу, в то время как ассоциативное обучение *Danio rerio* снижается с возрастом [202,215]. Вероятно, что обучение с отрицательным подкреплением с возрастом деградирует у *Danio rerio* [202]. Помимо снижения скорости обучения, рыбы *Danio rerio* в возрасте от 24 до 36 месяцев не способны развивать выученное обобщение условных стимулов, и угасание обучения таким реакциям также происходит значительно быстрее у более старых рыб [202].

Когнитивные нарушения *Danio rerio* отражаются в постепенном снижении функций пространственной памяти, которое проявляется с 18 месячного возраста. У 24-месячных *Danio rerio* ухудшается способность к ингибирующему избеганию по сравнению с молодыми особями [216]. С возрастом у *Danio rerio* обнаруживается значительное снижение экспрессии генов, связанных с пластичностью и обучением, а также нейроэндокринной системы [216]. Подводя итог, можно сказать, что клеточные и внеклеточные изменения, которые накапливаются на протяжении всей жизни у *Danio rerio*, вызывают возрастное снижение многих функций организма. В

ЦНС возрастные патологические проявления, как предполагается, приводят к снижению активности мозга и снижению нейронной пластичности.

4.1.3.3. Исследование нарушений липидного обмена у *Danio rerio*

Прозрачность личинок *Danio rerio* примерно до 30 дней после оплодотворения позволяет наблюдать за развитием сосудов *in vivo* в режиме реального времени [217–219]. *Danio rerio* особенно плодовиты, самки откладывают 200-300 яиц в день [220], однако, чрезмерный инбридинг приводит к бесплодию [221], что препятствует развитию более чистых инбридинговых линий. Хотя сосудистая система *Danio rerio* отличается от таковой у млекопитающих, ее развитие и анатомия схожи [222].

На эмбриональной и первой личиночной стадиях *Danio rerio* имеют собственную врожденную иммунную систему, пока их адаптивная иммунная система еще не созрела. Как адаптивная, так и врожденная иммунная система у *Danio rerio* и млекопитающих в высокой степени консервативны. Доминирующим лейкоцитом у *Danio rerio* является нейтрофил, который реагирует на градиенты H_2O_2 в поврежденных тканях; эозинофилы обеспечивают защиту хозяина от паразитов. Ключевыми фагоцитарными клетками являются макрофаги, которые осуществляют цитокин-опосредованный иммунитет [223]. Кроме того, у *Danio rerio*, вероятно, есть и другие антигенпрезентирующие клетки [224].

Danio rerio являются идеальными моделями для крупномасштабных скринингов; ранние личиночные стадии имеют длину всего 2-3 мм, они быстро развиваются, и их результаты являются репрезентативными для млекопитающих. Различные генетические инструменты, РНК-клетки, трансгенные репортерные линии, экспрессирующие флуоресцентные маркерные белки, мутагенез ENU, система CRISPR/Cas9 и эффекторная нуклеаза облегчают оценку функций генов у *Danio rerio* [201,202]. Как и млекопитающие, *Danio rerio* перерабатывают липиды по всему кишечнику и гепатобилиарной системе [225]. Таким образом, их часто используют для изучения накопления липидов в сосудах и окисления липопротеинов.

В отличие от млекопитающих, *Danio rerio* не могут синтезировать собственный витамин С и должны получать его из своего рациона; следовательно, изменяя уровни витамина С, можно индуцировать окислительный стресс у *Danio*

rerio.

Личинки *Danio rerio* моложе 5 дней после оплодотворения не считаются животными, пока не начнут самостоятельно питаться, и в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента не являются животными, поэтому они представляют ценную модель для исследования биологически активных веществ [226]. Изучать влияние вводимых соединений на жизненно важные процессы развития, такие как васкулогенез и органогенез *Danio rerio*, можно быстро и экономически эффективно.

Модели животных *Danio rerio* имеют ряд ограничений. Сбор образцов крови у молодых особей от 40 до 45 дней после оплодотворения возможен, но приводит к летальности, а личинки настолько малы, что для анализа требуются гомогенаты нескольких особей.

Еще одним недостатком *Danio rerio* является то, что пойкилотермные позвоночные предпочитают липиды в качестве источника энергии, тогда как гомойотермные млекопитающие предпочитают углеводы. Кроме того, млекопитающие и рыбы различаются не только по предпочтительному источнику энергии, но и по профилю липопротеинов и составу ЛПНП. У *Danio rerio* в профиле липопротеинов доминируют ЛПВП, а ЛПНП содержат больше триглицеридов и меньше эфиров холестерина по сравнению с человеческими ЛПНП. Это связано с тем, что ЛПВП *Danio rerio* функционируют как переносчик холестерина, в то время как у млекопитающих он переносит избыток холестерина из периферических клеток обратно в печень, где он перерабатывается и выводится [227]. Кормление *Danio rerio* высокожировым кормом приводит к тому, что их профили липопротеинов становятся более похожими на профили людей и приводит, среди прочих симптомов, к гиперхолестеринемии, накоплению липидов в сосудах и рекрутированию миелоидных клеток [228]. Как у *Danio rerio*, так и у человека белки-переносчики эфиров холестерина участвуют в переносе холестерина из ЛПВП в другие липопротеины, что может объяснить, почему высокожировая диета приводит к гиперхолестеринемии у *Danio rerio*.

У *Danio rerio* экспрессируются все основные классы аполипопротеинов (ApoA, ApoB, ApoC и ApoE), и в этом отношении они очень похожи на человека. Как упоминалось выше, гипертриглицеридемия является независимым фактором

риска сердечно-сосудистых заболеваний, вызванным единичными мутациями в генах, кодирующих липопротеинлипазу (ЛПЛ) или в генах, кодирующих кофакторы ЛПЛ, такие как ApoC2.

Luo H et al. показали, что *Danio rerio* *apoc2*^{-/-} проявляет свойства человека, включая дислипидемию, в частности, гипертриглицеридемию, уже на 14 день после оплодотворения, что приводит к атеросклерозу II стадии. Другие исследования продемонстрировали значительное увеличение концентрации ЛПНП в сосудистых отложениях *in vivo* у личинок как в краткосрочной перспективе (10 дней), так и долгосрочной (<10 недель) [229].

Недавно Liu et al. сообщили о первом мутанте *ldlr*^{-/-} *Danio rerio*, созданном с использованием системы CRISPR/Cas9, тем самым представив новую модель атеросклероза и гиперхолестеринемии, которая напоминает соответствующую модель у мышей. Этот мутант проявляет повышенную восприимчивость к высокохолестериновой диете и накоплению сосудистых липидов на 9 день после оплодотворения после 5 дней кормления диетой [230].

В целом, исследования, проведенные на личинках *Danio rerio*, могут только дополнять исследования на млекопитающих [231]. Тем не менее, восемь соединений, обнаруженных в скрининговых исследованиях на *Danio rerio*, в настоящее время проходят клинические испытания, и этот подход показал, что постоянная экспрессия человеческого моноклонального антитела IK17 предотвращает накопление сосудистых липидов и уменьшает существующие липидные отложения у *Danio rerio*. Предполагается, что IK17 накапливается в сосудистых поражениях и нейтрализует специфичные для окисления эпитопы. Кроме того, предполагается, что снижение уровней окисленных ЛПНП, опосредованное IK17, приведет к снижению образования пенистых клеток.

Таким образом, *Danio rerio* являются перспективной моделью для исследования атеросклероза, поскольку они восприимчивы к диете и обладают дополнительным преимуществом в виде удобства воспроизведения для высокопроизводительных скринингов. Адаптивная и врожденная иммунные системы у *Danio rerio* и млекопитающих в высокой степени консервативны. Использование трансгенных линий *Danio rerio*, которые могут отслеживать изменения в макрофагах и нейтрофилах *in vivo*, недавно дало новые сведения о

раннем развитии атеросклероза. Хронологическая визуализация *in vivo* в течение 10-дневного периода показала, что нейтрофилы могут накапливаться в субэндотелиальном пространстве до поляризации концентрации ЛПНП [229]. Эти результаты иллюстрируют важность соответствующих моделей *in vivo* для изучения патофизиологии сложных заболеваний, таких как атеросклероз.

Сходство с людьми в липидном метаболизме и экспрессии белков-переносчиков холестерина, наряду с развитием мутанта *ldlr*^{-/-} и *apoc2*^{-/-}, демонстрирует другие преимущества *Danio rerio*. Кроме того, данные по мутанту *apoc2*^{-/-}, представленные Liu et al., показывают, что *Danio rerio* с высокой степенью точности моделируют дислипидемию человека, основной фактор риска атеросклероза [232].

Недавнее создание мутанта *Danio rerio ldlr*^{-/-} повысило их значимость как животной модели атеросклероза. Мутанты *ldlr*^{-/-} на обычной диете развивают умеренную гиперхолестеринемию, тогда как даже кратковременное потребление высокожировой диеты приводит к гиперхолестеринемии и усугубленному накоплению липидов в стенке сосудов. Таким образом, *Danio rerio ldlr*^{-/-}, а также *apoc2*^{-/-} могли бы обеспечить скрининги для новых терапевтических средств и создания лекарственных средств для лечения атеросклероза.

Исследования атеросклероза у *Danio rerio* в значительной степени опираются на липидный обмен, поскольку из-за размера моделей их поражения очень малы, а прогрессирование заболевания ограничено. С одной стороны, это может быть недостатком модели в зависимости от гипотезы, но с другой стороны, простота генетической манипуляции открывают возможность изучать ранние патогенетические механизмы атеросклероза.

Затраты, связанные с моделью *Danio rerio*, которую можно использовать уже на 9 день после оплодотворения, невысоки. Разработка *Danio rerio ApoE*^{-/-} создала новый инструмент для исследования атеросклероза, который сопоставим с моделями мышей. На сегодняшний день не существует мышинной модели с постоянной нестабильностью бляшек, в то время как мутант мыши *ApoE*^{-/-}, по-видимому, является ключом к разработке трансгенной модели, которая полностью отражает атеросклероз человека. Кормление мышей *ApoE*^{-/-} высокожировой диетой достаточно для того, чтобы у них проявились сложные и многослойные

поражения, но потеря ApoE делает эту модель намного более сложной, так как это неотъемлемая часть иммунного ответа и липидного метаболизма [233].

Таким образом, исследования, проводимые на *Danio rerio*, привели к огромному пониманию развития позвоночных и генетического программирования. *Danio rerio* оказались подходящим видом для моделирования заболеваний и сравнительного исследования регенерации. Поскольку было обнаружено, что *Danio rerio* стареют постепенно, их полезность в качестве универсального модельного объекта становится все более очевидной. Они не только способствуют изучению во время развития и созревания, но и во время старения в исследованиях геронтологии. Как и у млекопитающих, у *Danio rerio* можно обнаружить типичные признаки постепенного старения позвоночных, которые приводят к фенотипу функционального ухудшения с высоким сходством патологий человека. Эти проявления старения устанавливаются

В течение относительно короткой продолжительности жизни и могут быть легко изучены с помощью ряда охарактеризованных экспериментальных методов и поведенческих анализов. *Danio rerio* используется для воспроизведения атеросклероза, а создание мутантных особей позволяет моделировать атеросклероз, приближенный по патогенезу к таковому у человека. Таким образом, *Danio rerio* представляется перспективным объектом исследования, в котором можно изучать биологию старения и механизмы возрастных заболеваний во взрослом возрасте, для которых необходимы новые терапевтические стратегии.

4.1.4. Мыши

Грызуны являются наиболее широко используемой животной моделью для исследований старения. Относительно простые модели организмов, такие как дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*), нематоды (*Caenorhabditis elegans*) и мухи (*Drosophila melanogaster*) используются для определения молекулярной основы старения. Хотя эти модели полезны для общих исследований старения, их значимость для моделирования изменений мозга во время старения ограничена очевидными анатомическими различиями. Напротив, грызуны, и в частности, мыши, являются млекопитающими, которые сочетают в себе небольшой размер, высокую плодовитость и короткую продолжительность жизни.

Старение мозга человека связано с ухудшением памяти, снижением внимания

и двигательных функций, что приводит к депрессии и тревожности. Поскольку возраст является самым высоким фактором риска нейродегенеративных заболеваний, стареющее население имеет более высокую заболеваемость такими патологиями, как болезнь Альцгеймера, которая является наиболее распространенной причиной деменции [234].

Животные модели старения, такие как грызуны, собаки и нечеловекообразные приматы, демонстрируют снижение когнитивной функции, аналогичное наблюдаемому у людей по мере старения. Это снижение особенно заметно в таких областях, как гиппокамп, где наблюдается связанное с возрастом ухудшение памяти [235]. Интересно, что снижение памяти у животных не сопровождается значительной потерей нейронов, как у людей. Вместо этого оно в первую очередь связано с синаптическими изменениями, включая потерю синапсов и изменения в синаптической эффективности [236]. Пример этого можно увидеть в долговременной потенциации гиппокампа, процессе, который отражает синаптическое обучение, которое становится сложнее вызвать и которое быстрее затухает у старых животных [237]. Эти изменения в животных моделях во время нормального старения отражают переносимость нарушений когнитивных функций, наблюдаемые у людей.

В процессе старения значительно претерпевает ряд изменений нервная система [238]. Эти изменения отражаются в таких процессах, таких как ухудшение двигательных и когнитивных функций, а также в развитии таких расстройств, как тревожность и депрессия у крыс. Долголетие связано с функционированием нервной системы, измеряемой в поведенческих реакциях на моделях грызунов [239]. В этом контексте продолжительность жизни грызунов, по-видимому, обратно пропорциональна интенсивности их поведенческой и нейроэндокринной реакции на стрессовый стимул. В частности, животные, которые демонстрируют «замирающее поведение» при помещении в новую среду, как правило, показывают ослабленный иммунитет с более короткой продолжительностью жизни. Таким образом, было высказано предположение, что гиперреактивность к стрессорам у грызунов может быть связана с более короткой продолжительностью жизни и ускоренной нейродегенерацией, зависящей от старения [240].

Сравнение стадий старения у мышей и людей в целом сопоставимо [241].

Многочисленные исследования развития в настоящее время установили, что мыши в возрасте до 1 месяца являются ювенильными [242]; мыши в возрасте от 3 до 6 месяцев обычно классифицируются как молодые взрослые особи, в то время как животные в возрасте от 14 до 24+ месяцев часто объединяются в одну категорию «старые» [241]. Большинство исследований старения были сосредоточены на сравнении «молодых» и «старых» возрастных групп, при этом гораздо меньше внимания уделялось более тонким временным интервалам, в которых изменения возникают на протяжении всей жизни. Эта тема является крайне важной, поскольку понимание самых ранних стадий старения может позволить разработать целевые подходы, которые могут замедлить негативное влияние старения или даже омолодить функции у человека [243,244].

В обзоре [245] возрастных изменений в типичных инбредных линиях лабораторных мышей *Mus musculus* предлагается следующая возрастная классификация мышей: ювенильный (до 1 месяца); молодой взрослый (1–4 месяца); зрелый взрослый (4–10 месяцев); поздний взрослый (10–14 месяцев); старый (14–24 месяца); стареющий (старше 24 месяцев).

4.1.4.1. Когнитивные и поведенческие нарушения у стареющих мышей. Их связь с нарушениями у человека

Прогрессирование поведенческих и когнитивных нарушений являются одними из наиболее важных показателей старения у пожилых людей. Возрастные дефициты подвижности являются общей чертой как у людей, так и у грызунов [246]. Было показано, что старые мыши (старше 18 месяцев) различных линий (C57Bl/6J, DBA/2J, A/J и 129/SvJ) демонстрируют существенно более низкие уровни локомоторной активности в открытом поле, чем молодые или зрелые взрослые особи (младше 6 месяцев) [247]. Несколько исследований выявили возникновение локомоторных дефицитов в возрасте от 6 до 12 месяцев [248]. Напротив, другие исследования сообщают о колоколообразной зависимости между локомоторной активностью и возрастом. Было показано, что поздние/старые взрослые особи (10–17 месяцев) преодолевают более длинные расстояния в открытом поле по сравнению как с молодыми (3–5 месяцев), так и со старыми/стареющими (18–25 месяцев) животными. Установлено, что старые мыши проходят более короткие расстояния, чем молодые, в течение первых 5 минут теста, при этом возрастные различия

становятся менее выраженными в течение более длительных периодов тестирования (120 мин) [249]. Это говорит о более высоком уровне тревожности у пожилых животных, когда они изначально подвергаются воздействию новой среды, а не дефициту моторики [249].

Анализ походки и тесты с вращающимся стержнем выявили более надежные возрастные изменения, чем поведенческие измерения в открытом поле. Было показано, что у мышей проявляются трансляционные изменения походки и осанки к позднему взрослению (10 месяцев) [250]. К ним относятся снижение скорости походки, каденции, длины шага и скорости замаха в пожилом возрасте [250]. Баланс и моторное обучение традиционно измеряются с помощью теста с вращающимся стержнем, где мыши помещаются на вращающуюся балку и должны делать скоординированные шаги, чтобы избежать падения. Таким образом, тест с вращающимся стержнем может выявить возрастные дефициты координации, затрудненное моторное обучение или измененное долгосрочное сохранение моторных навыков. У старых мышей наблюдаются дефициты координации, такие как более короткий латентный период падения и более медленные темпы обучения [240]. Некоторые возрастные дефициты моторного обучения проявляются в возрасте 11-13 месяцев [250] или даже раньше, в возрасте 4-8 месяцев [251]. В целом эти исследования показывают, что тонкие возрастные изменения походки, равновесия и моторного обучения могут быть выявлены в зрелом и позднем взрослом возрасте.

Несколько тестов, разработанных для оценки когнитивных способностей у грызунов, были успешно использованы для оценки эффектов, связанных с возрастом. Два анализа когнитивных способностей, разработанных в 1980-х годах, использовались в многочисленных исследованиях для изучения сохранения памяти, а также пространственного обучения и памяти. Тест пассивного избегания используется в качестве меры ассоциативной контекстной памяти гиппокампа и эмоциональной памяти, зависящей от миндалевидного тела [252]. Ранние исследования установили, что возраст отрицательно влияет на сохранение пассивного избегания, что указывает на потерю памяти о неблагоприятном опыте. Дефициты были выявлены у нескольких штаммов (гибриды C57Bl/6J, C57Bl/6J×C3H/J, мыши NMRI и Swiss), начиная с позднего взрослого возраста (12-13 месяцев), продолжаясь в старости (23 месяца) и вплоть до старения (31 месяц)

[253]. Однако более поздние данные свидетельствуют о том, что, в то время как у старых самок мышей наблюдалось снижение этого типа памяти сохранения, у старых самцов мышей подобного дефицита не наблюдалось. В частности, было показано, что молодые мыши (до 1 месяца) демонстрируют худшее сохранение, чем молодые взрослые особи (3,5 месяца), что может быть связано с недостаточной зрелостью нейронов. Эти результаты свидетельствуют о том, что память избегания развивается в юности, достигая пика в молодом возрасте, после чего она претерпевает возрастное снижение, скорость которого может зависеть от пола.

У мышей развивается ряд возрастных сенсорных дефицитов в течение взрослой жизни. Точные сроки возникновения этих дефицитов и их тяжесть различаются в зависимости от сенсорной модальности. Понимание возникновения дефицитов в отдельных чувствах, а также взаимодействия между сенсорными модальностями, дает возможность разрабатывать новые вмешательства для омоложения сенсорных систем в более позднем возрасте.

Взрослый мозг может динамически адаптироваться к ряду внешних моделей активности в течение жизни. Различия естественных возрастных адаптивных реакций и повышенной уязвимости становится все более важным в стареющей популяции [254]. Считается, что поведенческое, когнитивное и сенсорное снижение, связанное со старением, связано с потерей нейронов [255], а также с изменением в пластичности синаптических контактов между нейронами и взаимодействии с глиальными клетками. Синапсы очень динамичны и могут менять свой молекулярный состав и структурную конфигурацию на протяжении всей своей жизни. Синапсы могут быть устранены или встроены заново, тем самым изменяя связность нейронных цепей и потенциально влияя на формирование памяти, кодирование или консолидацию [256]. Функциональная сила синапсов может быть смодулирована посредством изменений в пре- и/или постсинаптических отсеках [256]. Множество доказательств указывают на то, что выражение синаптической пластичности меняется с возрастом, и это часто исследуется посредством индукции долговременной потенциации или депрессии.

Старение грызунов связано с изменениями как краткосрочной, так и долгосрочной синаптической пластичности, при этом изменения возникают в гиппокампе у зрелых и поздних взрослых (6-12 месяцев) животных [257].

Трисинаптическая зубчатая извилина гиппокампа и ее связи с энторинальной корой играют ключевую роль в пространственной навигации и эпизодической памяти [258]. Долгосрочная пластичность может демонстрировать специфическую для пути уязвимость к старению, причем самые ранние изменения были выявлены у поздних взрослых (9-12 м) в контурах гиппокампа [259]. У людей неинвазивные методы позволили в некоторой степени перенести результаты пластичности с грызунов [260]. Хотя ряд из этих исследований согласуется с результатами экспериментов на грызунах, характер доступных экспериментальных методов ограничивает доступ к глубоким областям мозга, которые тесно связаны с ранним ухудшением во время здорового и патологического старения. Будущие исследования могут попытаться использовать неинвазивную глубокую стимуляцию мозга для исследования пластичности более глубоких структур у человека [261].

Несколько возрастных изменений в синаптической пластичности и структуре были выявлены в мозге взрослых мышей. Хотя механизмы, лежащие в основе этих изменений, неясны, были выявлены несколько важных факторов, таких как изменения в экспрессии или проводимости глутаматергических рецепторов или нарушения гомеостаза ионов кальция. Нейрональная гиперактивность и гипервозбудимые сети были продемонстрированы в коре головного мозга и гиппокампе взрослых мышей несколькими группами, в то время как возрастные выводы, связанные с нарушениями в ГАМК-ергических нейронах и ингибирующей синаптической схеме, только начинают появляться.

4.1.5. Исследование метаболизма у мышей

Грызуны дикого типа в основном устойчивы к атеросклерозу при нахождении на высокожировой диете, однако, разработка инбредных линий, таких как C57BL/6J, C57L/J и DBA/2J, позволила исследовать атеросклероз на мышах [131,262].

Нокауты, ноккины, нокдауны и трансгенные модификации могут быть получены различными методами, включая систему CRISPR/Cas9, систему Cre-loxP, Vivo-Morpholinos (MOs), лентивирусную инфекцию и мутагенез этилнитрозомочевины. Генетическая манипуляция привела к двум наиболее часто используемым мышинным моделям атеросклероза, а именно *Ldlr*^{-/-} и *ApoE*^{-/-}.

Основной аполипопротеин в хиломикронах, аполипопротеин E (ApoE), может служить лигандом для рецептора ЛПНП. Синтез ApoE происходит в мозге, печени и

других тканях как у людей, так и у мышей, однако, у людей есть подмножества ЛПВП и изоформы ApoE, которых нет у мышей. Помимо своего влияния на метаболизм липопротеинов, ApoE играет роль в биологии макрофагов, иммунной функции и биологии жировой ткани. Мутации в мышинном ApoE приводят к фенотипам, подобным человеческим, таким как гиперлиппротеинемия типа III, ксантоматоз или дисбеталипопротеинемия. В возрасте 3 месяцев при нормальной диете у мышей с дефицитом ApoE проявляются признаки липидных полос II стадии атеросклероза.

Диффузные интимальные отложения пенистых клеток III стадии в синусе аорты можно наблюдать у мышей в возрасте 5 месяцев. Наконец, в возрасте 8 месяцев атеросклеротические бляшки у мышей ApoE^{-/-} почти полностью окклюдзируют артерию. Относительно раннее развитие поражений и антропоморфный липидный метаболизм являются основными преимуществами мышей как животной модели атеросклероза [263].

Наряду с ЛПНП, ApoE является структурным компонентом всех липопротеинов и критическим лигандом для печеночного клиренса липопротеинов плазмы, и он опосредован ЛПНП [264]. Преобладание ЛПНП в качестве переносчика холестерина ведет к развитию семейной гиперхолестеринемии, что, в свою очередь, увеличивает риск сердечно-сосудистых заболеваний. Похожий на человеческий липидный метаболизм мышей Ldlr^{-/-} позволяет изучать макрофаги, загруженные холестерином, создающие ксантомы в коже и подкожной клетчатке, а также атеросклеротические поражения артерий. Был показан разрыв бляшки у 20-недельных мышей ApoE^{-/-}Fbn1C1039G^{+/-} и Il1r1^{-/-}ApoE^{-/-}, что имитировало атеросклероз VI стадии у человека. Фрагментация эластичных волокон в стенке сосуда увеличивает артериальную жесткость и, таким образом, приводит к разрыву бляшек в 50% брахиоцефальных артерий [265]. Инактивация сигнализации интерлейкина-1 в атеросклеротических бляшках снизила уровень коллагена бляшек у мышей Il1r1^{-/-}ApoE^{-/-}, впоследствии дестабилизируя поражение.

Chen et al. продемонстрировали, что лечение аторвастатином увеличивает содержание коллагена, увеличивая при этом стабильность бляшек, хотя они не наблюдали различий в общей площади бляшек. Более ранние исследования показали, что статины в сочетании с эзетимибом могут уменьшить размер

поражения на 17% и оказывают противовоспалительное действие у мышей [266].

В качестве альтернативного подхода Roche-Molina et al. [267] и Bjørklund et al. [268] создали модель AAV-PCSK9DY с векторами аденоассоциированного вируса (AAV) серотипа 8 или 9, несущими мутацию Asp374Tyr человеческого белка-конвертазы субтилизина/кексина типа 9 (PCSK9DY), которая привела к развитию атеросклероза и гиперлипидемии в течение 84 дней. Инъекция PCSK9DY 30-дневным мышам привела к стабильной экспрессии мРНК PCSK9DY и постоянной гиперлипидемии липопротеинов промежуточной плотности/ЛПНП до 1 года [267]. Bjørklund et al. сообщили о прогрессировании поражения до атеросклероза V стадии [268]. Трансэкспрессия генов, вызывающих человеческие заболевания, у мышей является усовершенствованной концепцией, которая сокращает время и количество животных, необходимых для генерации мутантов и может обеспечить новый эффективный и устойчивый подход к изучению атеросклероза всех стадий и гиперлипидемии [267], а также для проведения экспериментов с высоким содержанием жиров [263].

Одним из недостатков генетически модифицированных моделей мышей является то, что транспорт холестерина у мышей опосредован ЛПВП, а не ЛПНП [263]. Недавние публикации сообщают об использовании липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) в качестве основного носителя холестерина плазмы у мутантов ApoE^{-/-}, а также об их атеропротективных свойствах [264].

Далеко не все исследования на животных моделях приводят к открытию новых методов лечения и лекарственных средств, поскольку мыши и люди различаются не только по размеру, взрослению, старению и метаболизму, но и по длине теломер и микробиому [269]. Например, у мышей с заболеваниями, связанными с системными воспалительными реакциями у человека, такими как волчанка, псориаз и ревматоидный артрит, развивается больше атеросклеротических поражений, чем у пациентов с этими заболеваниями. Таким образом, стимулирование сосудистого воспаления атеросклерозом, скорее всего, является результатом общего воспаления, чем общих генов риска его развития [270].

Разработка моноклональных антител PCSK9 (алирокумаб и эволокумаб) у мышей способствует терапии высокого уровня холестерина ЛПНП и атеросклероза у людей [263]. Хотя эти препараты являются одобренными, их короткий период

полувыведения *in vivo* делает их неудобным в связи с необходимостью частого введения. У мышей ApoE*3-Leiden иммунизация с использованием этой вакцины на основе пептида вызывает появление антител против PCSK9, что уменьшает размер атеросклеротического поражения, особенно уменьшает образование некротического ядра и воспаление макрофагов, а также снижает уровень липидов в плазме посредством гуморального ответа [271]. Такой подход обещает быть более эффективным и может обеспечить долгосрочное снижение Хс-ЛПНП [271].

Таким образом, в настоящее время наиболее часто используемой моделью атеросклероза являются мыши, поскольку мутантные линии восприимчивы к диетическим вмешательствам, а атеросклеротические бляшки прогрессируют до поражений V стадии в аорте и сонных артериях. Тем не менее, развитие поражений на поздней стадии занимает месяцы, даже когда мыши находятся на высокожировой диете. Поскольку иммунные реакции и пути у мышей аналогичны человеческим, они являются хорошей моделью для изучения воспалительных реакций, связанных с атеросклерозом, в то время как липидный метаболизм на основе ЛПВП у мышей характеризуется рядом недостатков, которые устраняются только у линии ApoE*3-Leiden.

Более широкое использование относительно новой мышинной модели PCSK9DY исключает необходимость создания инбредных линий. Одним из недавних примеров является использование инъекций PCSK9DY мышам, экспрессирующим GPR124 под контролем промотора Tie-2. Gong et al. обнаружили, что GPR124, рецептор, известный тем, что усиливает ангиогенез в мозге, влияет на патогенез атеросклероза, активируя нитрозативное окисление и сигнализацию инфламмосомы NLRP3 [272].

4.1.6. Кролики

В качестве модельных объектов для исследований процессов старения и возрастного изменения метаболизма могут использоваться кролики. Поскольку кролики обладают уникальной особенностью метаболизма липопротеинов, в значительно большей степени, чем у грызунов, похожий на таковой у людей, и чувствительны к холестериневой диете, модели кроликов не только дали много информации о патогенезе и развитии атеросклероза человека, но и внесли большой вклад в трансляционные исследования. Кролик был первой моделью животного,

использованной для изучения атеросклероза человека, более века назад. В настоящее время используются три типа моделей кроликов для исследований нарушения липидного обмена: (1) кролики, получающие высокожировую диету, обогащенную холестерином, (2) кролики с наследственной гиперлипидемией Ватанабе, аналогичные семейной гиперхолестеринемии человека из-за генетического дефицита рецепторов ЛПНП, и (3) генетически модифицированные (трансгенные и нокаутированные) кролики. Однако, использование моделей кроликов по-прежнему ограничено.

Первые эксперименты с использованием кроликов для исследований атеросклероза проведены более ста лет назад. В 1908 году российский исследователь А.С. Игнатовский кормил кроликов диетой, обогащенной животными белками (молоко, мясо и яйца), и наблюдал поражения интимы с большим скоплением прозрачных клеток (теперь называемых пенистыми клетками) в аорте. Позже Н.Н. Аничков использовал диету с холестерином, растворенным в растительном масле, для создания атеросклероза аорты у кроликов, аналогичного наблюдаемому у людей, и предположил причинную роль холестерина в атеросклерозе. Эти пионерские исследования предоставили первые экспериментальные доказательства и основу для установления «липидной гипотезы» атеросклероза. С тех пор модель кролика широко использовалась для выяснения многих аспектов патофизиологии атеросклероза у человека наряду с разработкой терапевтических средств.

Хотя модель кролика, несомненно, принесла много прорывов в историю изучения атеросклероза, с 2000 года наблюдается тенденция к сокращению использования этой модели, что связано, вероятно, с разработкой генетически модифицированных мышей с нокаутированным геном рецептора apoE и ЛПНП. Многие исследователи неохотно используют кроликов, поскольку они менее удобны в экспериментах, в сравнении с мышами – модель мыши стала мощным инструментом для многих исследований во многом благодаря относительной простоте генетических манипуляций и относительно короткому времени развития атеросклероза в условиях дефицита рецептора apoE или ЛПНП, но как альтернативная модель кролик по-прежнему необходим в трансляционных исследованиях сердечно-сосудистых заболеваний. Одним из лучших исторических примеров необходимости использования кроликов является открытие статинов,

которые не были терапевтически эффективны в снижении уровня холестерина в плазме у крыс и мышей даже в высоких дозах (>500 мг/кг), несмотря на выраженное ингибирование синтеза холестерина в печени, в отличие от кроликов [273]. Позже было установлено, что грызуны (мыши, крысы и хомяки) отличаются от человека во многих аспектах метаболизма липопротеинов (таблица 4.4).

Таблица 4.4 – Сравнение особенностей метаболизма липидов

	Человек	Кролик	Мышь
Основные липопротеины плазмы	ЛПНП	ЛПНП	ЛПВП
Белок-переносчик эфира холестерина	+	+	-
apoB-48 и	Хиломикроны	Хиломикроны	ЛПОНП/ЛПНП и хиломикроны
apoB-100	Может быть связан с апо(a)	Может быть связан с апо(a)	Не может быть связан с апо(a)
ЛПВП	Гетерогенный	Гетерогенный	Гомогенный
Рецепторы ЛПОНП в макрофагах	+	+	-
Липаза печени	Активная, связана с печенью	Слабоактивная, связана с печенью	Активная, 70% в кровотоке
Выделение желчных кислот	Низкое	Низкое	Высокое

Кролики чувствительны к диетам, обогащенным холестерином, и быстро развивают тяжелую гиперхолестеринемию, что приводит к выраженному атеросклерозу аорты. При содержании на диете, содержащей до 2% холестерина, у них наблюдается быстрое повышение уровня холестерина в плазме до 2000 мг/дл. Эту реакцию можно еще усилить, добавив в рацион дополнительный жир, причем насыщенные жиры увеличивают как уровень холестерина в плазме, так и степень поражения аорты. Кормление холестериновой диетой приводит к повышению уровня в плазме богатых эфирами холестерина, ЛПОНП, полученных из печени и кишечника из-за относительно эффективного всасывания холестерина, ограниченного печеночного преобразования холестерина в желчные кислоты и подавления липопротеиновых рецепторов печени.

Кролики с наследственной гиперлипидемией Ватанабе (WHHL) являются превосходной животной моделью человеческой семейной гиперхолестеринемии были созданы Йошио Ватанабе в Университете Кобе, Япония, в 1980 году. Кролики WHHL генетически дефицитны по функциям рецептора ЛПНП из-за спонтанно

возникшей делеции в экзоне 4 гена рецептора ЛПНП, который кодирует делецию 4 аминокислот в богатом цистеином лиганд-связывающем домене. Гомозиготные кролики WHHL на диете с кормом демонстрируют выраженное повышение уровня холестерина и триглицеридов в плазме с рождения и страдают от атеросклероза и сухожильной ксантомы, оба из которых демонстрируют замечательное патологическое сходство с наблюдаемыми при семейной гиперхолестеринемии человека. Однако, гетерозиготные кролики WHHL на диете с кормом не демонстрируют явной гиперлипидемии. У зрелых кроликов WHHL развивается разнообразный атеросклероз аорты, начиная от ранних жировых полос до запущенных поражений. Важно, что у кроликов WHHL также развивается коронарный атеросклероз и спонтанный инфаркт миокарда, что редко наблюдается в других моделях животных. Преимущества использования кроликов WHHL по сравнению с кроликами, питающимися холестерином, следующие: (1) профили липопротеинов кроликов WHHL характеризуются высоким уровнем ЛПНП и крайне низким уровнем ЛПВП, тогда как основные липопротеины у кроликов, питающихся холестерином, являются липопротеинами β -ЛПОНП, но уровни триглицеридов и ЛПВП обычно не изменяются; (2) гиперхолестеринемия постоянно присутствует у всех гомозиготных кроликов WHHL на диете с кормом, поэтому колебания уровня холестерина в плазме меньше, чем у кроликов, питающихся холестерином; (3) у кроликов WHHL в возрасте > 9 месяцев развиваются более выраженные атеросклеротические поражения аорты, такие как кальцификация и образование липидного ядра, которые больше похожи на те, которые наблюдаются у людей. Прогрессирующие поражения состоят из типичного липидного или некротического ядра, покрытого фиброзной крышкой (гладкомышечные клетки и внеклеточный матрикс), типичной атеросклеротической бляшки, похожей на атеросклероз человека; (4) можно наблюдать коронарный атеросклероз и инфаркт миокарда, что может быть более актуально для ситуаций у людей. Кролики WHHL особенно полезны для разработки препаратов, снижающих уровень липидов, и инструментов визуальной диагностики.

Хотя кролики являются ценной экспериментальной моделью в геронтологических и сердечно-сосудистых исследованиях, они не могут являться полноценной заменой грызунам. Кроликов следует использовать только для тех

экспериментов, которые направлены на получение ответов на вопросы или выяснение механизмов, которые не могут быть должным образом рассмотрены в других моделях животных. Использование кроликов может быть менее выгодным, чем использование грызунов, которые имеют более короткую продолжительность жизни, более короткие периоды беременности, более низкую межиндивидуальную изменчивость, более низкую стоимость и широкую доступность реагентов в качестве преимуществ по сравнению с кроликом. Поэтому кроликов следует использовать для преодоления разрывов между моделями мелких животных (мыши и крысы), которые, возможно, являются лучшими для выяснения экспрессии и функций генов, и моделями более крупных животных (свиньи и обезьяны), которые часто требуются для доклинических трансляционных исследований. По сравнению с более крупными животными, кролики (среднего размера) относительно недороги в приобретении, содержании и могут содержаться в условиях лабораторий. Их легко разводить и содержать, и они являются хорошо зарекомендовавшей себя моделью с точки зрения признания научными и регулирующими сообществами. Кроме того, кролики филогенетически ближе к приматам, чем к грызунам, и предлагают более разнообразный генетический фон, чем инбредные и аутбредные линии грызунов, что делает модель более общей аппроксимацией к человеку [274].

4.2. Роль фосфолипидов в продлении активного долголетия

Известно, что с течением времени накапливаются многочисленные метаболические изменения, при этом благодаря межвидовым сравнениям была найдена взаимосвязь долголетия с метаболическими параметрами разных органов [274]. Предполагается, что важную роль в долголетию играют липидный обмен и размер частиц липопротеинов, поэтому методы оценки геропротективных свойств соединений должны проводиться по методикам, характеризующим, в том числе «метаболомику возраста» (metabolomic aging). В частности, была выявлена положительная корреляция между долголетием и уровнями сфингомиелина. Напротив, уровни триглицеридов и продукты воспалительных процессов отрицательно коррелируют с долголетием. Было показано, что активное долголетие может быть связано с высоким уровнем сфингомиелина плазмы и низким уровнем триглицеридов [275].

В другом исследовании было установлено, что изменение специфических глицерофосфолипидов и сфинголипидов также связано с фенотипом долголетия у пожилых. Vaarhorst et al. в исследовании липидного профиля у 421 потомков долгожителей (старше 90 лет) сообщают, что более крупные частицы ЛПНП и более низкие уровни ТГ достоверно связаны с более высокой продолжительностью жизни. Анализ обратной регрессии по полу показал, что размеры частиц ЛПНП были связаны с мужским долголетием, в то время как у женщин решающим фактором был уровень триглицеридов [276].

Анализ профилирования липидома плазмы 128 липидов у пожилых людей показал, что 19 видов липидов с более высокими уровнями фосфатидилхолина и сфингомиелина и более низкими уровнями фосфоэтаноламина и длинноцепочечных триглицеридов связаны с долголетием у женщин. Профиль липидов, связанный с долголетием, также характеризовался более высоким соотношением мононенасыщенных и полиненасыщенных жирных кислот [275].

Ниже представлен перечень метаболитов в биологических жидкостях человека, связанных с долголетием (таблица 4.5) [277].

Исследование роли фосфолипидов в процессах старения является перспективным научным направлением, в рамках которого возможно открытие новых способов воздействия на увеличение активного долголетия. В этой связи особый интерес представляет разработанная в Институте биомедицинской химии водорастворимая лекарственная форма фосфатидилхолина – препарат Витафосфолип®, порошок для приготовления раствора для применения внутрь в форме саше (Арчаков А.И. и др. Фосфолипидная лекарственная композиция с наноразмером частиц для лечения нарушений липидного обмена и коматозных состояний и способ ее получения / Патент РФ № 2448715 от 30.12.2010). Имеющийся задел ИБМХ целесообразно использовать для выполнения задачи проекта 2 – «Выбор, создание и характеристика соединений и композиций, способствующих значимому увеличению продолжительности функциональной активности биологических систем». Работы по пункту 1.4. ПГ и 4.4 ТЗ в части оценки возможности использования соединений в исследованиях *in vitro* и *in vivo* проведенная с учетом имеющегося задела ИБМХ в области создания фосфолипидных соединений и описаны ниже.

Таблица 4.5 – Метаболиты человека, связанные со старением

Метаболиты	Среда	Старение (↑↓)
Аргинин	Сыворотка	↓
Орнитин, серин	Сыворотка	↑
Креатинин, лейцин, изолейцин, мочева кислота, саркозин, фосфат, глицин, сфингомиелин (C18:1), фосфатидилхолины	Плазма	↑
Фосфосерин (40:5), моноацилглицерид (22:1), диацилглицерид (33:2), резолвин	Плазма	↓
25-гидроксигексакозановая кислота, эйкозапентаеновая кислота, фосфохолин (42:9), фосфосерин (42:3), 15-кетопростагландин F2α	Плазма	↓
l-γ-глутамил-l-лейцин	Плазма	↑
1,5-ангидроглюцитол, глазная кислота, карнозин, ацетил-карнозин, UDP-ацетил-глюкозамин, НАД+, НАДФ+, лейцин, изолейцин	Кровь	↓
N6-ацетил-лизин, цитруллин, пантотенат, диметил-гуанозин, N-ацетил-аргинин	Кровь	↑
Липопротеины	Сыворотка	↑
Триптофан	Сыворотка	↓
Креатин, β-гидрокси-β-метилбутират	Моча	↓
Ацикарнитины	Сыворотка	↑
Аминокислоты	Сыворотка	↓
Промежуточные продукты трикарбоновых кислот	Плазма	↑
Креатин, мочевины, орнитин, полиамины	Плазма	↑
Незаменимые и заменимые аминокислоты	Плазма	↑
Оксопролин, гиппурат	Плазма	↑
Жирные кислоты, карнитин	Плазма	↑
Холестерин, β-гидроксибутират	Плазма, сыворотка	↑
Дегидроэпиандростерон-сульфат	Плазма	↓
Повышение триглицеридов	Сыворотка	↑

В таблице 4.6 представлены метаболиты человека, связанные с долголетием [269].

Таблица 4.6 – Метаболиты человека, связанные с долголетием

Метаболиты	Среда	Долголетие (↑↓)
Изоцитрат, таурофосфат	Плазма	↓
Эфиры фосфатидилхолина, соотношение мононенасыщенных/полиненасыщенных жирных кислот	Плазма	↓
Увеличение размера ЛПНП	Сыворотка	↑
Повышение сфингомиелина	Сыворотка	↑
Повышение глицерофосфолипидов	Сыворотка	↑
Повышение фосфоэтаноламина	Плазма	↓
Повышение триглицеридов	Сыворотка	↓

4.3. Разработка протоколов оценки количественного содержания компонентов липидных наночастиц (и композиций на их основе) во фракциях крови человека

Для исследования распределения фосфолипидных соединений и композиций по компонентам крови будет использоваться комплекс следующих методов и подходов:

- 1) анализ липидов и липопротеинов с помощью стандартных наборов биохимического ферментативного анализа в сыворотке крови и лизате эритроцитарных мембран;
- 2) выделение отдельных фракций липопротеинов сыворотки крови методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности и их использование в качестве модельных объектов;
- 3) фракционирование сыворотки крови с помощью высокоэффективной гель-хроматографии с последующим комплексным профилированием белков, липидов и жирных кислот методами белковой и липидной масс-спектрометрии, биосенсорного анализа (поверхностный плазмонный резонанс), ИФА и биохимический ферментативный анализ.

Для выполнения работ по анализу взаимодействия липидных наночастиц с компонентами крови человека *in vitro*, были закуплены следующие образцы цельной крови и сыворотки крови человека в рамках Договора возмездного оказания услуг № 21К/223 от 05.11.2024 с ООО «АРСБИОМЕДИКА»: 1) цельная кровь в пробирках с антикоагулянтом К-ЭДТА – 6 образцов по 9 мл от двух доноров 22 и 45 лет; 2) замороженная сыворотка крови – 93 образца (7 образцов по 2 мл и 86 образцов по 1 мл от доноров в возрасте от 20 до 74 лет).

На текущем этапе выполнения работ выполнены следующие задачи:

- 1) Адаптация протоколов стандартных наборов ферментативного анализа белков и липидов в сыворотке крови для биохимического анализа в компонентах крови (сыворотка, плазма, фракции липопротеинов, лизат мембран эритроцитов).
- 2) Постановка препаративных методов получения фракций липопротеинов крови (ультрацентрифугирование, высокоэффективная гель-хроматография).
- 3) Разработка протокола получения лизата мембран эритроцитов и оценка возможности его использования для комплексного анализа белков и липидов

(получение теней эритроцитов, получение лизата мембран эритроцитов, биохимический ферментативный анализ липидов в лизате мембран эритроцитов, оценка возможности применения SPR анализа компонентов лизата).

4.3.1. Обоснование методологии, применяемой для решения научной задачи

4.3.1.1. Биохимический анализ основных характеристик крови

Тесты для биохимического анализа крови, использованные в работе, являются стандартными для биохимических лабораторий, выполняющих рутинный анализ крови пациентов для клиник и больниц. Оцениваемые характеристики (общий белок, общий холестерин и триглицериды) являются наиболее значимыми с точки зрения геронтологии и характеризуют «метабомику возраста» (metabolomic aging). Анализ общего белка, общего холестерина и триглицеридов дает критически важную информацию о физиологических изменениях, связанных со старением. Эти биомаркеры важны не только для оценки риска возрастных заболеваний, таких как сердечно-сосудистые заболевания, диабет и дисфункция печени, но и открывают окно в более широкие аспекты метаболического здоровья, состояния питания и иммунной функции у стареющих людей. Регулярный мониторинг и управление этими маркерами могут помочь смягчить влияние старения на здоровье, улучшить качество жизни и снизить риск хронических заболеваний, что делает их важными инструментами персонализированного здравоохранения для пожилых людей.

4.3.1.2. Фракционирование плазмы/сыворотки крови с помощью высокоэффективной гель-хроматографии и ультрацентрифугирования

Фракционирование плазмы или сыворотки с использованием таких методов, как хроматография и ультрацентрифугирование, является перспективным подходом для анализа белкового и липидного состава крови в контексте старения. Эти методы позволяют исследователям разделять и изолировать различные компоненты плазмы или сыворотки, предлагая понимание того, как старение влияет на их концентрацию, взаимодействие и функции.

Гель-хроматография (SEC) является биохимическим методом разделения, который может применяться для анализа белков и липидов в образцах плазмы или сыворотки. Этот метод разделяет белки и липиды по размеру, помогая идентифицировать, крупные белковые комплексы или агрегаты, которые могут

образовываться в результате старения, которые участвуют в возрастных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера или сердечно-сосудистые заболевания. Также использование SEC для анализа содержания липопротеинов в плазме или сыворотке дает ценную информацию об изменениях липидного обмена, связанных со старением. Метод позволяет точно разделять и идентифицировать липопротеины, выявляя изменения в размере частиц, составе и функции, которые происходят с возрастом. Поскольку старение связано с изменениями в профилях липопротеинов, включая увеличение количества ЛПНП и снижение ЛПВП, SEC может помочь лучше понять молекулярные основы сердечно-сосудистого риска и метаболических заболеваний у пожилых людей. Выявляя эти изменения, исследователи могут обнаружить потенциальные биомаркеры для ранней диагностики и лучшего управления возрастными заболеваниями, в конечном итоге способствуя более здоровому старению и более персонализированным стратегиям лечения.

Ультрацентрифугирование является еще одним методом, используемым для разделения плазмы или сыворотки на различные субфракции на основе плотности и размера частиц. Этот метод особенно полезен для анализа липопротеинов и крупных белковых комплексов. Плазма подвергается воздействию больших центробежных сил, что приводит к разделению компонентов на отдельные фракции.

Фракционирование плазмы или сыворотки с использованием хроматографии и ультрацентрифугирования является универсальным подходом для изучения возрастных изменений в белковом и липидном составе крови. Эти методы обеспечивают глубокое понимание метаболизма липидов, экспрессии белков и изменений, происходящих во время старения. Выявляя ключевые молекулярные изменения, эти методы обладают потенциалом для обнаружения биомаркеров для раннего выявления, мониторинга возрастных заболеваний и разработки терапевтических стратегий для содействия здоровому старению и предотвращения возрастных расстройств.

4.3.1.3. Выделение теней эритроцитов

Эритроциты важны для жизнедеятельности организма человека, так как выполняют функцию переноса газов кровью. Эти клетки являются уникальными по своей структуре, в том числе обладают сложной и очень прочной мембраной, форма

которой имеет значение для функционирования этих клеток. Эритроциты с возрастом претерпевают патологические изменения, сказывающиеся на состоянии человека. Такие возрастные изменения в эритроцитах, например, как повышенная жесткость, окислительное повреждение, сокращение продолжительности жизни и снижение гибкости, могут способствовать возникновению ряда патологических последствий, включая анемию, нарушение доставки кислорода, гемолиз, сердечно-сосудистые проблемы и снижение иммунной функции. Эти изменения не только способствуют распространенным возрастным состояниям, но и могут усугубить существующие проблемы со здоровьем, поэтому важно рассматривать функцию эритроцитов как ключевой аспект старения и связанных с ним заболеваний. Как выше уже отмечалось, мембрана эритроцитов играет центральную роль в функциональности клетки, при этом возрастные изменения ее структуры, состава и свойств существенно влияют на поведение и продолжительность жизни эритроцитов. Понимание этих изменений имеет решающее значение для оценки влияния старения на эритроциты и их роли в возрастных состояниях, включая анемию, сердечно-сосудистые заболевания и нарушение доставки кислорода. Мембрана эритроцитов служит ключевым индикатором клеточного старения, и ее изучение может привести к более эффективным стратегиям диагностики и лечения возрастных заболеваний.

4.3.2. Полученные результаты

4.3.2.1. Адаптация протоколов стандартных наборов ферментативного анализа белков и липидов в сыворотке крови для биохимического анализа в компонентах крови (сыворотка, плазма, фракции липопротеинов, лизат мембран эритроцитов).

Для исследований были использованы образцы стандартных коммерчески доступных наборов ферментативного анализа белков и липидов в сыворотке крови (таблица 4.7).

Таблица 4.7 – Стандартные наборы ферментативного анализа белков и липидов в сыворотке крови человека

№	Наименование	Шифр
1	Триглицериды-1-Ольвекс	017.001
	Триглицериды-Ольвекс	017.002
2	Холестерин-1-Ольвекс	013. 011
	Холестерин-ЛПВП-Ольвекс	013.004
	Холестерин-ЛПНП-Ольвекс	013.006
	Холестерин ЛПВП (прямой иммуно). (DiaSys, Германия)	135219910021
	Холестерин ЛПНП (прямой селективный). (DiaSys, Германия)	141219910021
3	Общий белок-Ольвекс	006.011
	Общий белок-2-Ольвекс	006.002
	Общий белок-3-Ольвекс	006.003
4	Контрольная сыворотка Ольвекс	042.011
5	Мультикалибратор-Ольвекс	043.001
6	Фосфолипиды, 5x10 мл	S/17320
7	Свободные жирные кислоты. (DiaSys, Германия)	
8	Стандарт свободных жирных кислот, NEFA Standart FS (Non-esterified fatty acids) (DiaSys, Германия)	
9	Стандартный раствор Фосфолипидов (Phospholipids Standart FS) (DiaSys, Германия)	

Контрольная сыворотка Ольвекс, Мультикалибратор Ольвекс и другие стандартные растворы необходимы для поверки и калибровки. Также для дальнейшего выполнения хроматографических исследований и профилирования липопротеинов сыворотки крови и их последующего комплексного анализа методами масс-спектрометрии в 2024-м году были закуплены необходимые реагенты, материалы, хроматографические сорбенты и колонки: Sepharose CL-2B Cross-linked (Henghuibio, KHP, Lot. № C2LR2404); колонка хроматографическая пустая HY-Column10-400 (HyTec, KHP); колонка хроматографическая NmVALID 8/100 упакованная сорбентом NMGel-200DEAE (NanoMicro, KHP, Part.№ 08101-04083-200100); диски для твердофазной экстракции Empore Octadecyl C18 (Supelco, США, арт. 66883-U).

Стандартные протоколы анализов были адаптированы для их применения с использованием мини-робота Hudson SOLO (Hudson, США) и планшетного оптического ридера CLARIOstar (BMG Labtech, Германия).

Для проверки адаптированных протоколов были выполнены биохимические анализы на общий белок, общий холестерин и триглицериды образцов контрольной сыворотки N (нормальный уровень), контрольной сыворотки P (патологический уровень) и сыворотки здорового человека (шифр 780075178). Анализы были выполнены в 3-х повторах. Результаты представлены в таблице 4.8.

Таблица 4.8 – Результаты измерения липидного профиля образцов крови посредством биохимических тестов

Анализ	Контрольная сыворотка N		Контрольная сыворотка P		Сыворотка 780075178	
Общий белок	г/л	медиана		медиана	г/л	медиана
	50,3	50,3	65,9	64,3±4,7	71,4	57,9±9,2
	55,2		64,3		57,9	
	44,9		57,1		53,8	
Триглицериды	ммоль/л		ммоль/л		ммоль/л	
	1,17	1,23	2,62	2,81±0,16	1,34	1,42±0,12
	1,23		2,81		1,57	
	1,26		2,93		1,42	
Общий холестерин	ммоль/л		ммоль/л		ммоль/л	
	2,34	2,34±0,29	3,88	4,21±0,20	2,90	3,72±0,57
	2,05		4,25		4,00	
	2,64		4,21		3,72	

Так как в стандартных ферментативных наборах используется принцип анализа по конечной точке, то для оценки полноты завершения ферментативных реакций по адаптированным протоколам и стабильности получаемых результатов были выполнены контрольные измерения оптической плотности в ячейках планшетов с проведенными анализами в течении 3 часов (рисунок 4.4). Как видно из рисунка, окраска анализируемых растворов остается стабильной в данном интервале времени.

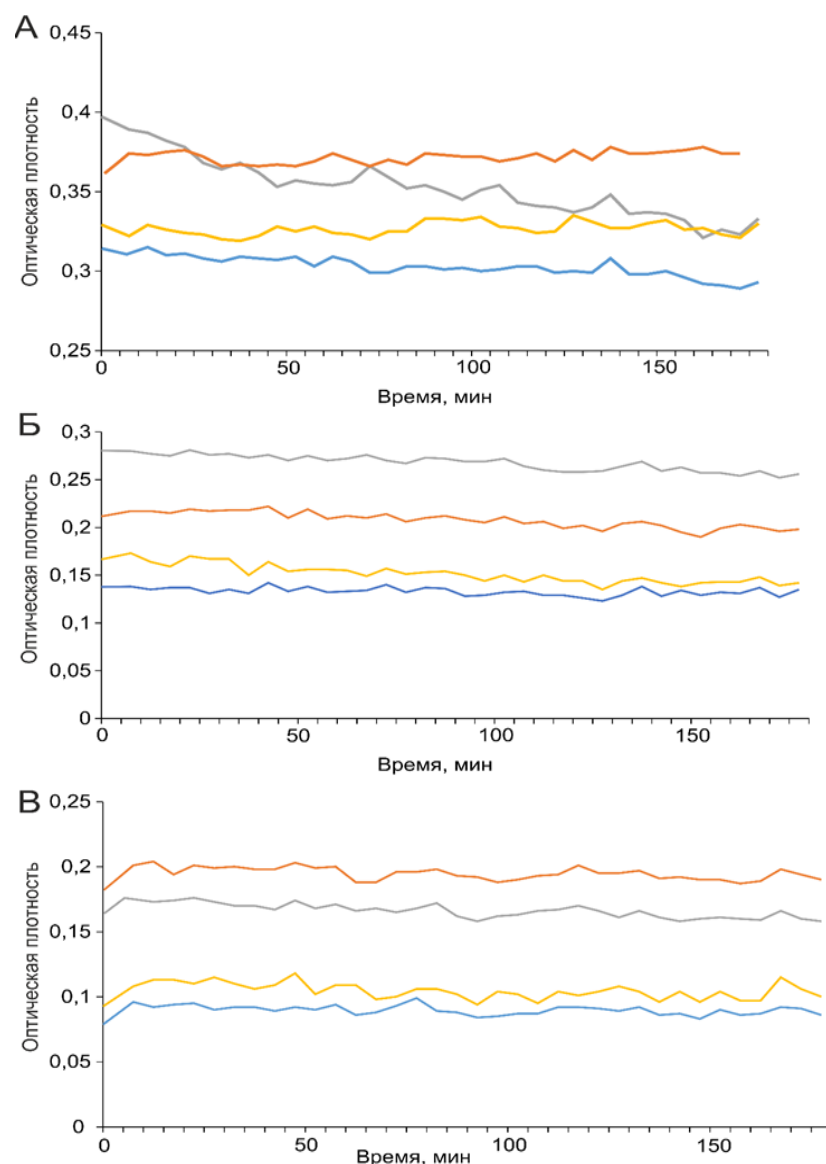


Рисунок 4.4 – Измерение оптической плотности растворов в ячейках планшетов с анализами на общий белок (А), общий холестерин (Б) и триглицериды (В). Серая линия – калибратор, оранжевая линия - контрольная сыворотка Р, синяя линия - контрольная сыворотка N, желтая линия – сыворотка крови человека (образец 780075178)

4.3.2.2. Фракционирование липопротеинов крови (ультрацентрифугирование, высокоэффективная гель-хроматография).

Выполнены технические работы по подготовке ультрацентрифуги Beckman Optima L-90K для препаративного выделения фракций липопротеинов крови человека методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности.

Для фракционирования сыворотки крови человека с помощью высокоэффективной гель-хроматографии был использован хроматограф АКТА Purifier 10 (GE Healthcare Life Sciences, США) с готовой к использованию колонкой

10/300GL, заполненной гелем Superose 6 (Cytiva, США).

Для анализа количества белка по поглощению при 280 нм, детектор хроматографа был откалиброван раствором БСА (рисунок 4.5).

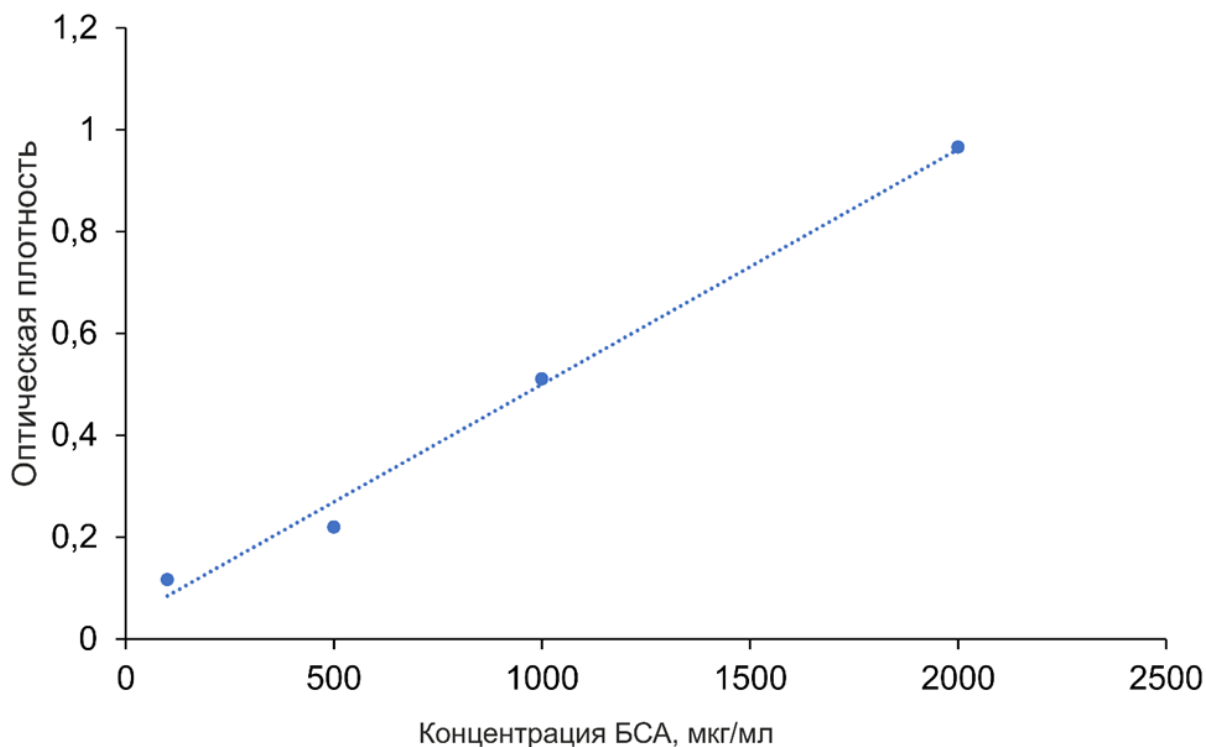


Рисунок 4.5 – График калибровки регистратора хроматографа длина волны 280 нм с помощью растворов БСА

Для подготовленных заполненных колонок фирма Cytiva (США) предоставляет ориентировочные калибровки по молекулярным массам разделяемых объектов. Однако для точной калибровки конкретного экземпляра колонки была выполнена процедура ее проверки с помощью набора стандартных калибровочных белков и голубого декстрана 2000 (рисунок 4.6).

Выполнены пилотные эксперименты по фракционированию сыворотки крови человека с помощью высокоэффективной гель-хроматографии. На всём протяжении эксперимента скорость потока жидкости была 300 мкл/мин, а температура хроматографической камеры равна 4°C. Образец сыворотки крови человека (шифр 780075178) инжестировали в объеме 100 мкл. Регистрировалась хроматограмма по поглощению белка при 280 нм (рисунок 4.5). Фракционирование элюата (по 500 мкл) начинали спустя 4 мл после инъекции образца. В каждой фракции было определено содержание общего белка методом Бредфорда с использованием планшетного

ридера ClarioStar (BMG, Германия).

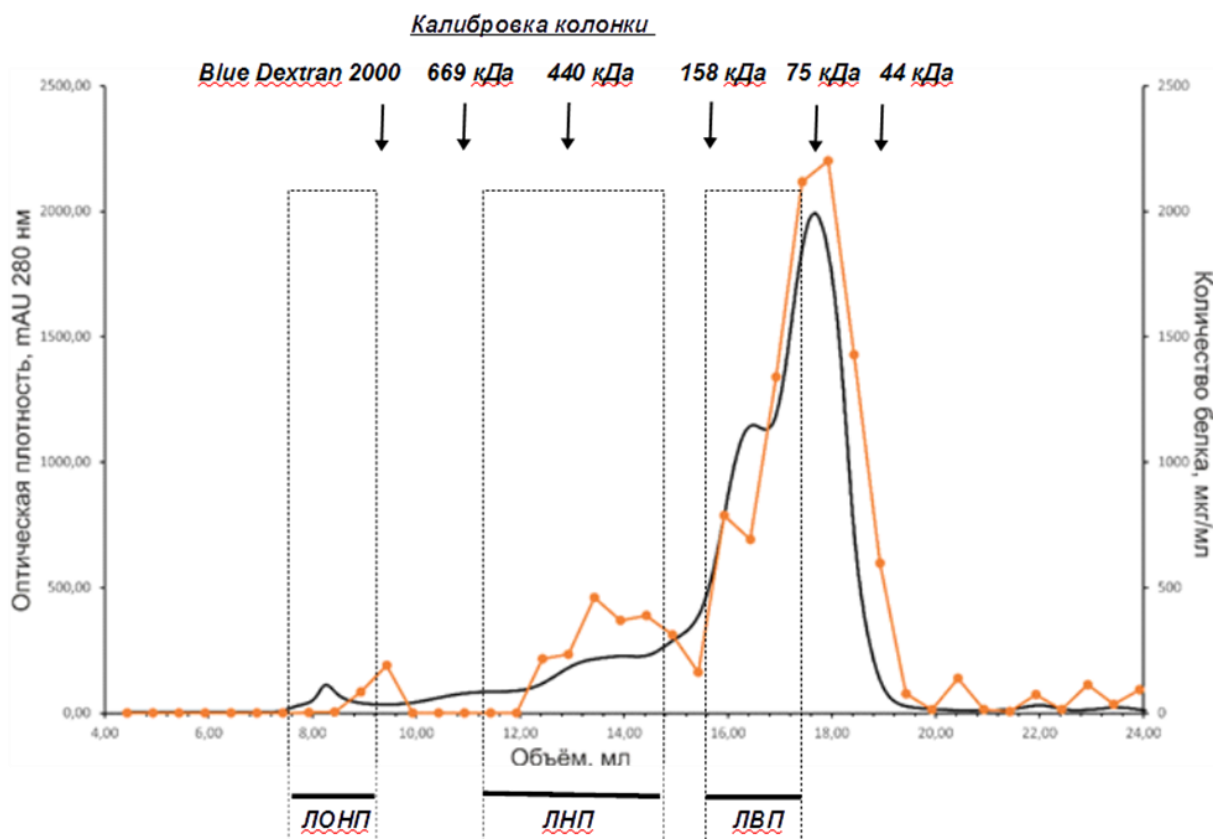


Рисунок 4.6 – Высокоэффективная гель-хроматография сыворотки крови человека (шифр образца 780075178) на колонке 10/300GL с гелем Superose 6. Чёрная линия - изменение оптической плотности на длине волны 280 нм. Оранжевая линия - количество белка во фракциях, определенное по методу Бредфорда

Можно видеть, оценки количества белка во фракциях, выполненные с помощью двух подходов, согласуются. Вверху стрелками показана калибровка колонки по молекулярной массе.

Так как хроматограммы, полученные в наших пилотных экспериментах, очень хорошо согласуются с аналогичными хроматограммами из ранее опубликованной работы китайских авторов [278], то нам удалось сделать предварительную оценку зон элюции разных классов липопротеинов крови. На рисунке 4.6 пунктирами отмечены области хроматограммы, где ориентировочно должны находиться фракции липопротеинов высокой плотности (ЛВП), низкой плотности (ЛНП) и очень низкой плотности (ЛОНП).

4.3.2.3. *Разработка протокола получения лизата мембран эритроцитов и оценка возможности его использования для комплексного анализа белков и липидов.*

Донорскую кровь с антикоагулянтом (К-ЭДТА) центрифугировали при 1500 g в течение 15 мин при комнатной температуре. Далее производился отбор плазмы, а к полученному клеточному осадку добавляли двукратный объем физиологического раствора, ресуспендировали осадок и центрифугировали в течение 10 мин при 1500 g при комнатной температуре. Процедуру повторили три раза.

Тени эритроцитов выделили согласно протоколу [279]. К эритроцитам добавляли разбавленный в четыре раза фосфатный буфер (PBS) в соотношении 1:10 (эритроциты/разбавленный PBS) и инкубировали смесь 30 минут на льду. Далее смесь центрифугировали в течение 20 минут на скорости 15000 g при температуре +4°C и отобрали супернатант. К осадку добавляли тот же объем разбавленного PBS и повторяли центрифугирование. Процедуру отмывки повторяли три раза.

Для получения лизата теней эритроцитов к ним добавляли 150 мкл лизирующего буфера CellLytic (Sigma, C3228 MT Cell Lysis Reagent) и инкубировали 15 мин при перемешивании и диспергировали ультразвуком с помощью гомогенизатора SONOPULS HD 3110 (Bandelin, Германия) при мощности излучателя 45 % от максимальной в течение 30 с охлаждением на льду.

Была выполнена проверка пригодности лизата мембран эритроцитов для биохимических ферментативных анализов липидов. Для этого с помощью набора ХОЛЕСТЕРИН-1-ОЛЬВЕКС был выполнен анализ общего холестерина в лизате теней эритроцитов, контрольной сыворотке и нулевом контроле (лизирующий буфер) (таблица 4.9).

Таблица 4.9 – Результаты ферментативного анализа мембран эритроцитов на общий холестерин

Лизат мембран эритроцитов		Нулевой контроль		Контрольная сыворотка N	
ммоль/л	медиана	ммоль/л	медиана	ммоль/л	медиана
0,78	0,78±0,22	0	0,03±0,09	2,97	2,61±0,55
0,47		0,16		2,61	
0,89		0,03		1,89	

Таким образом, полученный нами образец лизата мембран эритроцитов

оказался пригодным для анализа липидов с помощью стандартных наборов биохимического ферментативного анализа сыворотки крови.

Полученный образец лизата мембран эритроцитов оказался также пригодным для анализа общего белка по оптическому поглощению при длине волны 280 нм с калибровкой по БСА (см. график на рисунке 4.5). Концентрация белка в лизате оказалась равной 6,8 мг/мл.

Была также выполнена проверка пригодности полученного лизата для исследований компонентов лизата с помощью SPR анализа. Для этого был использован SPR биосенсор Biacore X100 (Cytiva, США) и стандартный оптический чип CM5, поверхность которого покрыта карбоксиметилированным декстраном. Лизат мембран эритроцитов разбавляли PBS-буфером в 10 раз и далее инжестировали образец через один из каналов биосенсора в течение 3 мин при скорости потока 5 мкл/мин (рисунок 4.7).

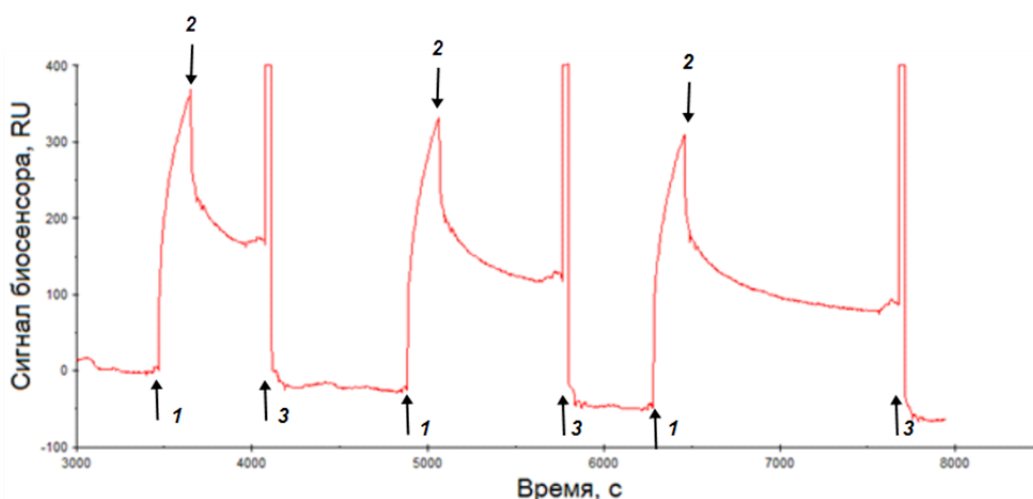


Рисунок 4.7 – Сенсограмма трех инъекций лизата мембран эритроцитов через рабочий канал SPR биосенсора Biacore X100: 1 – начало инъекции лизата, 2- конец инъекции лизата, 3 – инъекция регенерирующего буфера (2 М NaCl, 0,4% CHAPS)

Наблюдалась сорбция части компонентов лизата на поверхности чипа, которая не отмывалась как промывкой PBS, так и инъекцией кислым глициновым буфером (pH 1,5). Поэтому для полного удаления сорбированных компонентов лизата с поверхности чипа была использована инъекция регенерационного буфера (2 М NaCl, 0,4% CHAPS), в течение 30 с со скоростью потока 30 мкл/мин. Таким образом, полученный лизат мембран эритроцитов пригоден для исследований его компонентов с помощью SPR анализа.

Таким образом, на текущем этапе выполнены работы, являющиеся методической основой для исследований последующих этапов. Подобраны реагенты и оборудование, в наибольшей степени соответствующие поставленным задачам. Планшетный ридер CLARIOstar (BMG Labtech, Германия) по показателям стабильности и чувствительности пригоден для поставленных задач, жидкостной мини-робот Hudson SOLO (Hudson, США) обеспечивает высокую точность дозирования исследуемых растворов.

Методика разделения сыворотки крови человека на фракции по молекулярному весу частиц может быть использована для фракционирования сыворотки с оценкой содержания во фракциях белков (масс-спектрометрия) и липидов (биохимические тесты, масс-спектрометрия). На хроматограмме определены пики, соответствующие по молекулярной массе ЛОНП, ЛВП, ЛНП. Данные методики будут использованы в дальнейшей работе для оценки содержания липидов и целевого препарата в мембранах эритроцитов.

На SPR- биосенсоре при инъекции лизата мембран эритроцитов заметно неспецифическое связывание с декстраном поверхности чипа. Связавшиеся молекулы смываются раствором с высокой ионной силой и с содержанием детергента, что говорит об ионной и гидрофобной природе такой сорбции.

На последующих этапах выполнения работ будут проведены экспериментальные исследования влияния водорастворимой формы фосфатидилхолина на компоненты крови и исследован механизм его действия.

По результатам экспериментальных исследований *in vitro* и *in vivo* показана способность водорастворимых фосфолипидов препятствовать атерогенным нарушениям [280–282].

Клиническое исследование II-III фазы показало эффективность препарата Витафосфолип® в отношении достижения целевого уровня ХС-не ЛПВП и триглицеридов у пациентов с комбинированной гиперлипидемией, а также его безопасность при длительном пероральном приеме [283]. В этой связи представляется перспективным исследовать препарат Витафосфолип® на моделях старения у мышей и рыб *Danio rerio*: изучить динамику показателей триглицеридов, холестерина (общего, ХС-ЛПВП, ХС-не ЛПВП) в крови животных разных возрастных групп, концентрацию водорастворимой формы фосфатидилхолина в

крови и его накопление в органах-мишенях и выявить возможную взаимосвязь концентрации фосфолипидов с активным долголетием.

Другим направлением исследований будет являться улучшение фармакодинамических и фармакокинетических свойств известных лекарственных препаратов с использованием водорастворимой формы фосфатидилхолина (препарат Витафосфолип®).

Известно, что у пожилых людей необходимо снижать рекомендуемые дозы ряда лекарственных препаратов с целью снижения риска возможного возникновения нежелательных явлений. Наряду с этим, необходимо сохранить их эффективность. В этой связи представляется перспективным применение водорастворимой формы фосфатидилхолина, которое, как было показано в эксперименте, позволяет повысить эффективность β -адреноблокаторов и нестероидных противовоспалительных лекарственных средств (напроксена) посредством воздействия на каталитическую активность ферментов CYP 2C9 и 2D6, участвующих в метаболизме указанных лекарственных препаратов. Установлено, что в присутствии водорастворимой формы фосфатидилхолина электроферментный катализ CYP 2C9 препарата напроксен был усилен на 55% в сравнении с контрольным образцом, не содержащим фосфатидилхолин. По результатам этой части работ подготовлена публикация, представленная в составе отчетных документов за текущий этап, в которой подробно описан ход работ (Koroleva, P.I.; Bulko, T.V.; Kuzikov, A.V.; Gilep, A.A.; Romashova, Y.A.; Tichonova, E.G.; Kostukova, L.V.; Archakov, A.I.; Shumyantseva, V.V. Role Assessment of Water-Soluble Pharmaceutical Form of Phosphatidylcholine on the Catalytic Activity of Cytochrome P450 2C9 and 2D6. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, 26, 4. <https://doi.org/10.3390/ijms26010004>)

Предлагается продолжить работу по изучению влияния водорастворимой лекарственной формы фосфатидилхолина (препарата Витафосфолип®) на биодоступность лекарственных препаратов у пожилых людей с целью их эффективного и безопасного применения.

С целью особенностей лечения возрастных пациентов мы провели ретроспективный анализ результатов безопасности пациентов с массивной ТЭЛА старше 60 лет, которым была назначена неиммуногенная стафилокиназа в исследовании FORPE. Рандомизированное, открытое, многоцентровое,

параллельно-групповое, не менее эффективное исследование FORPE было проведено в 23 клинических центрах в России. В исследование было включено в общей сложности 310 пациентов в возрасте 18 лет и старше с подтвержденным с помощью компьютерной томографии легочной ангиографии диагнозом массивной тромбоэмболии легочной артерии, дисфункцией правого желудочка и гемодинамической нестабильностью. Пациенты были случайным образом распределены на получающих либо неиммуногенную стафилокиназу (15 мг), либо альтеплазу (100 мг). Исследование FORPE показало, что лечение массивной ТЭЛА с гемодинамической нестабильностью неиммуногенной стафилокиназой было безопасным у пожилых пациентов старше 60 лет и не требовало снижения дозы для снижения частоты крупных кровотечений. Необходимы будущие исследования и регистры для принятия окончательного решения о безопасности тромболитической терапии неиммуногенной стафилокиназой у пожилых пациентов [284].

Таким образом, понимание фармакокинетики и фармакодинамики водорастворимой формы фосфатидилхолина (препарата Витафосфолип®) у мышей и рыб *Danio rerio* разных возрастных групп может стать важным шагом на пути к разработке новых стратегий фармакологической коррекции, направленных на продление активного долголетия человека (longevity).

4.3.3. Масс-спектрометрическое исследование препарата Витафосфолип®

Гиперлипидемия связана с повышенным риском сердечно-сосудистых осложнений. Известно, что липопротеины высокой плотности (ЛПВП) являются антиатерогенными веществами, и их основная функция заключается в обеспечении обратного транспорта холестерина, где первым этапом является отток холестерина из макрофагов в ЛПВП, так называемая способность к оттоку холестерина. Для повышения эффективности оттока холестерина был предложен новый метод с использованием водорастворимой формы фосфатидилхолина сои (РС). Предполагается, что фосфолипидизация ЛПВП улучшает взаимодействие липопротеинов, что приводит к снижению уровня атерогенных липидов.

С целью разработки протокола для изучения фармакокинетики разработанного в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» нового препарата на основе фосфолипидных

наночастиц Витафосфолип® был проведен масс-спектрометрический анализ состава препарата, а также поиск целевых метаболитов в плазме крови человека и установлены лимиты детекции фосфатидилхолинов препарата в биологическом образце.

4.3.3.1. Материалы и методы

Образцы

Препарат Витафосфолип® был получен в научно-производственном отделе ИБМХ. Каждое саше содержит 500 мг фосфатидилхолинов сои и 2 г мальтозы.

Пробоподготовка биологического образца

Для проведения масс-спектрометрического анализа препарат Витафосфолип® был растворен в 100 мл воды, как указано в инструкции. Непосредственно перед масс-спектрометрическим анализом полученный раствор смешали с 0,1% раствором муравьиной кислоты в метаноле до конечной концентрации фосфатидилхолинов 5 мкг/мл.

Для выявления пределов детектирования фосфатидилхолинов препарата Витафосфолип® в плазме крови человека раствор препарата добавляли в образец плазмы крови до конечной концентрации – 0,02, 0,04, 0,1, 0,2 и 1 мг/мл. Экстракцию низкомолекулярной фракции из полученных образцов плазмы крови проводили с одновременным предварительным осаждением белков с помощью 90% раствора метанола. Для этого в чистой пластиковой пробирке объемом 1,5 мл (Eppendorf™) 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) перенесли в чистую пластиковую пробирку объемом 1,5 мл (Eppendorf™). Все полученные образцы проходили процесс пробоподготовки одновременно.

Непосредственно перед масс-спектрометрическим анализом 10 мкл полученной низкомолекулярной фракции отбирали в чистую пробирку и добавляли 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 $C_{22}H_{23}ClN_6O$ с молекулярной массой 422,917 у.а.е.

Масс-спектрометрический анализ

Масс-спектрометрический анализ проводили на гибридном квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре с электроспрейным источником ионизации maXis Imact/timsTOF (Bruker Daltonik GmbH, Germany) методом прямой инъекции образца. Для этого использовали стеклянный шприц (“Hamilton Bonaduz”, Швейцария) объемом 500 мкл, установленный в шприцевой инжекторный насос масс-спектрометра. Поток пробы, подаваемой в электроспрейный источник ионизации, составлял 180 мкл/час. Для источника ионизации использовали следующие параметры:

- температура осушающего газа (азот) – 200°C;
- скорость потока осушающего газа – 4 л/мин;
- напряжение на капилляре – 4500 В;
- фокусирующее напряжение: – 500 В;
- 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 проводилась предварительная калибровка масс-спектрометра с помощью смеси низкомолекулярных веществ ESI-L Low Concentration Tuning Mix (Agilent). Запись детектируемых сигналов проводилась 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, получили список характеристик (m/z , интенсивность и др.) пиков масс-спектра. Полученные значения m/z использовали для идентификации целевых фосфатидилхолинов и сопутствующих соединений с поправкой на возможность формирования ионов с H^+ , Na^+ и K^+ .

4.3.3.2. Результаты

4.3.3.2.1. Масс-спектрометрический анализ препарата Витафосфолип®

По результатам масс-спектрометрического анализа, проведенного методом прямого ввода образца в электроспрейный источник ионизации масс-спектрометра *maXis Impact* (Bruker Daltonic) в режиме регистрации положительно заряженных ионов, препарата Витафосфолип®, приготовленного согласно инструкции, были выявлены следующие составляющие – мальтоза, фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламины, лизофосфатидилхолины, холин и ряд жирных кислот (таблица 4.10).

Таблица 4.10 – Состав препарата Витафосфолип®

Название
Мальтоза
Фосфатидилхолины
Фосфатидилэтаноламины
Лизофосфатидилхолины
Холин
Жирные кислоты

Наиболее интенсивные пики в масс-спектре детектировались для мальтозы и фосфатидилхолинов, что соответствует заявленному производителем составу. Лизофосфатидилхолины, холин и свободные жирные кислоты (C16:0 – пальмитиновая, C16:1 – пальмитолеиновая, C18:0 – стеариновая, C18:1 – олеиновая, C18:2 – линолевая, C18:3 – линоленовая, C20:2 – эйкозодиеновая, C20:3 – эйкозатриеновая) детектировались в масс-спектре препарата в низкой концентрации. Интенсивность пика, соответствующего холину, была не более 3%, а пиков, соответствующих лизофосфатидилхолинам и свободным жирным кислотам - менее 1% от наиболее представленного пика мальтозы.

Согласно литературным данным по значению m/z и изотопному распределению были определены 14 фосфатидилхолинов, регистрируемых в масс-

спектре препарата Витафосфолип® (таблица 4.11). Некоторые пики в масс-спектре соответствуют смеси двух фосфатидилхолинов, отличающихся только жирными кислотами в составе. Наибольшей интенсивностью характеризовались пики фосфатидилхолинов, имеющих в своем составе пальмитиновую (C16:0), олеиновую (C18:1), линолевую (C18:2) и линоленовую (C18:3) жирные кислоты, что полностью соответствует типичному распределению жирных кислот в фосфатидилхолинах, выделяемых из сои.

Таблица 4.11 – Состав фосфатидилхолинов препарата Витафосфолип®

Название*	Формула	Регистрируемая масса, m/z	Относительная интенсивность по содержанию мальтозы (%)
PC (15:0-18:3) [#]	C ₄₁ H ₇₆ NO ₈ P	742.5381	0,4
PC (15:0-18:2)	C ₄₁ H ₇₈ NO ₈ P	744.5538	0,3
PC (16:0-18:2)/ PC (16:1-18:1)	C ₄₂ H ₈₀ NO ₈ P	758.5694	31,2
PC (16:0-18:1)	C ₄₂ H ₈₂ NO ₈ P	760.5851	7,0
PC (16:0-18:0)	C ₄₂ H ₈₄ NO ₈ P	762.6007	0,7
PC (15:0-20:3)	C ₄₃ H ₈₀ NO ₈ P	770.5694	0,4
PC (18:3-18:3)	C ₄₄ H ₇₆ NO ₈ P	778.5381	3,1
PC (18:2-18:3)	C ₄₄ H ₇₈ NO ₈ P	780.5538	29,8
PC (18:2-18:2)/ PC (18:1-18:3)	C ₄₄ H ₈₀ NO ₈ P	782.5694	72,3
PC (16:1-20:2)	C ₄₄ H ₈₂ NO ₈ P	784.5851	26,3
PC (18:0-18:2)/ PC (18:1-18:1)	C ₄₄ H ₈₄ NO ₈ P	786.6007	12,6
PC (16:1-22:6)	C ₄₆ H ₇₈ NO ₈ P	804.5538	33,9
PC (18:3-20:3)	C ₄₆ H ₈₀ NO ₈ P	806.5694	13,8
PC (18:2-20:3)	C ₄₆ H ₈₂ NO ₈ P	808.5851	6,8

* Согласно Fu Yang, Minghao Zhang, Zhou Li, Jikai Liu, Eric Marchioni. Exploration of natural phosphatidylcholine sources from six beans by UHPLC-Q-HRMS. Journal of Food Science, 2020. [#] PC фосфатидилхолин, C15:0 – пентадекановая, C16:0 – пальмитиновая, C16:1 – пальмитолеиновая, C18:0 – стеариновая, C18:1 – олеиновая, C18:2 – линолевая, C18:3 – линоленовая, C20:2 – эйкозодиеновая, C20:3 – эйкозатриеновая и C22:6 – декозагексаеновая кислоты.

4.3.3.2.2. Детекция эндогенных фосфатидилхолинов и сопутствующих метаболитов в плазме крови

Для разработки протокола для изучения фармакокинетики препарата Витафосфолип® был проведен масс-спектрометрический анализ образца плазмы крови с целью поиска целевых метаболитов. Идентификация целевых метаболитов была проведена по точно измеренной массе иона и массе фрагментов (таблица 4.12). В плазме крови были детектированы и идентифицированы с подтверждением по

МС/МС фосфатидилхолины, которые в высокой концентрации содержатся в препарате Витафосфолип® - РС (18:2-18:2)/РС (18:1-18:3) и РС (16:0-18:2)/РС (16:1-18:1). Также в плазме крови были детектированы линолевая (C18:2) и линоленовая (C18:3) кислоты, как наиболее представленные жирные кислоты в фосфатидилхолинах, выделяемых из сои. В качестве сопутствующих целевых метаболитов, напрямую связанных с уровнем атерогенных липидов, были детектированы холестерин и ацетилхолин.

Таблица 4.12 – Идентификация целевых метаболитов в плазме крови

Метаболит	Ион предшественник				Образовавшиеся ионы			
	регистрируемое	подсчитанное	химическая	тип	регистрируемое	референтское	химическая	тип
	значение m/z , Da	значение m/z , Da	формула	иона	значение m/z , Da	значение* m/z , Da	формула	иона
Фосфатидилхолин PC (18:2-18:2)/ PC (18:1-18:3)	782.5676	782.5694	$C_{44}H_{80}NO_8P$	$[M+H]^+$	184.0751	184.0733	$C_5H_{14}NO_4P$	$[M+H]^+$
Фосфатидилхолин PC (16:0-18:2)/ PC (16:1-18:1)	758.5702	758.5694	$C_{42}H_{80}NO_8P$	$[M+H]^+$	184.0759	184.0733	$C_5H_{14}NO_4P$	$[M+H]^+$
Линолевая кислота (C18:2)	303.2287	303.2294	$C_8H_{32}O_2$	$[M+Na]^+$	135.0811	135.0900	$C_{10}H_{15}$	$[M]^+$
					245.2078	245.2100	$C_{18}H_{29}$	$[M]^+$
	281.2463	281.2475		$[M+H]^+$	---	---	---	---
	279.2397	279.2318		$[M-H]^-$	128.0124	128.0090	---	---
					132.1049	132.0900	---	---
					249.9826	248.9700	---	---
Холестерин	409.3443	409.3448	$C_{24}H_{46}O$	$[M+Na]^+$	---	---	---	---
	425.3185	425.3181		$[M+K]^+$	---	---	---	---
Линоленовая кислота (C18:3)	279.2295	279.2318	$C_8H_{30}O_2$	$[M+H]^+$	---	---	---	---
	301.2115	301.2138		$[M+Na]^+$	---	---	---	---
	317.1877	317.1877		$[M+K]^+$	---	---	---	---
Ацетилхолин	146.1186	146.1175	$C_7H_{16}NO_2$	$[M]^+$	---	---	---	---
	147.1199	147.1253		$[M+H]^+$	---	---	---	---

*- референсные значения MS/MS фрагментации получены из открытых баз данных метаболитов (METLIN и HMDB).

4.3.3.2.3. Изменение интенсивности пиков основных фосфатидилхолинов, содержащихся в препарате Витафосфолип®, при разных концентрациях препарата в образце плазмы крови

Для выявления пределов детектирования фосфатидилхолинов препарата Витафосфолип® в плазме крови человека был проведен масс-спектрометрический анализ образцов плазмы крови с добавлением препарата до различной конечной концентрации – от 0,02 до 1 мг/мл. Для этого было выбрано 10 наиболее представленных фосфатидилхолинов препарата Витафосфолип®, которые присутствуют и в крови человека (рисунок 4.8). Видно, что, не смотря на то, что все эти фосфатидилхлины есть и в препарате, и в плазме, их содержание различается (распределение интенсивностей соответствующих пиков в масс-спектре). В масс-спектре препарата Витафосфолип® превалируют пики, относящиеся к фосфатидилхолинам, содержащим в своем составе пальмитолеиновую, олеиновую, линолевую, линоленовую, эйкозодиеновую и декозагексаеновую кислоты – PC (16:0-18:2)/PC (16:1-18:1) (m/z 758.5694), PC (18:2-18:2)/PC (18:1-18:3) (m/z 782.5694), PC (16:1-20:2) (m/z 784.5851) и PC (16:1-22:6) (m/z 804.5538). В то время как в плазме крови наиболее интенсивные пики относятся к фосфатидилхолинам, содержащим в своем составе линолевую, линоленовую и эйкозатриеновую кислоты - PC (18:2-18:3) (m/z 780.5538) и PC (18:2-20:3) (m/z 808.5851).

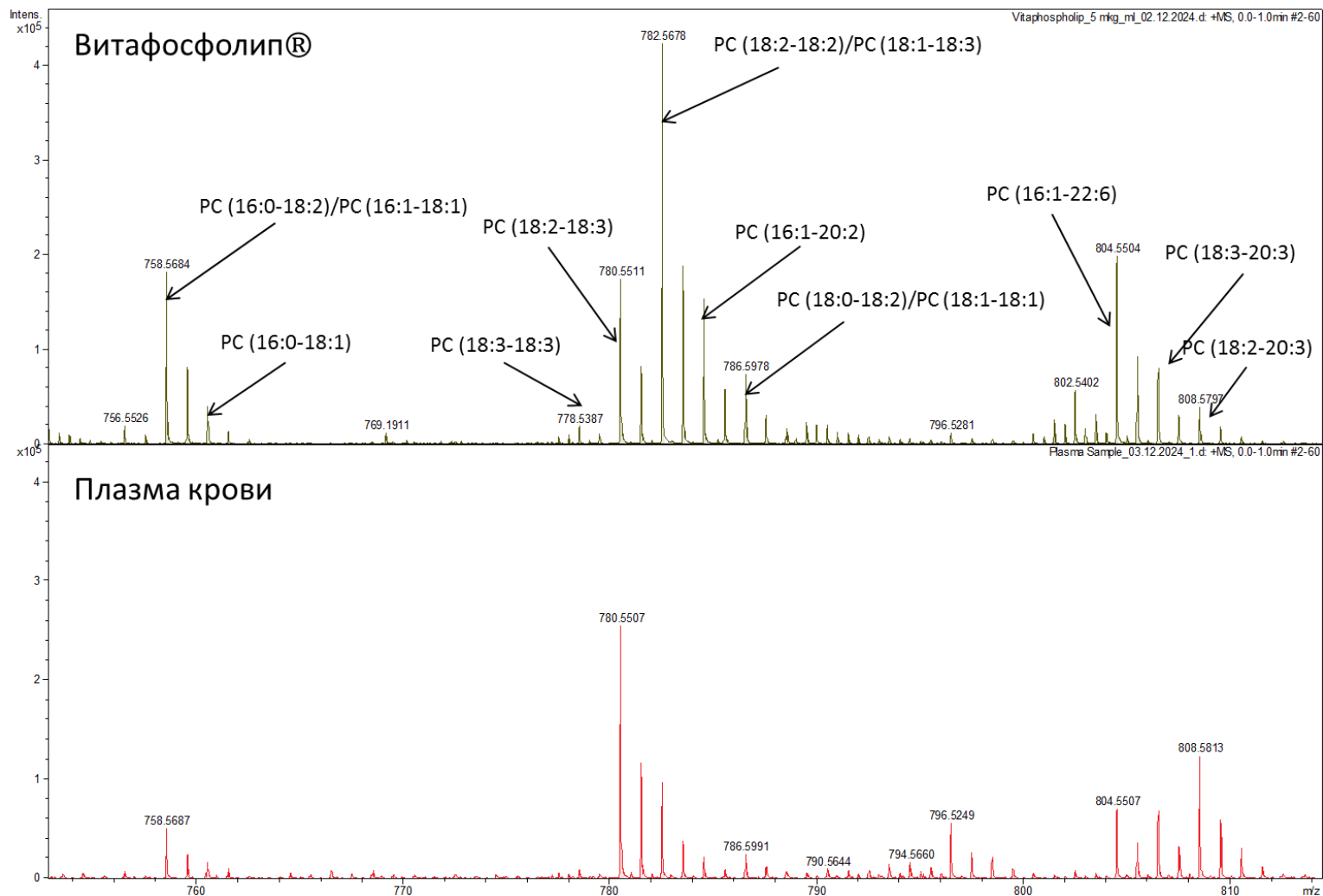


Рисунок 4.8 – Масс-спектры фосфатидилхолинов (PC) препарата Витафосфолип® и образца плазмы крови. На спектре отмечены 10 фосфатидилхолинов, которые детектируются и в препарате Витафосфолип®, и в плазме крови (эндогенные фосфатидилхолины)

Изменение интенсивности 10 выбранных фосфатидилхолинов оценивали по приросту интенсивности соответствующих пиков относительно содержания эндогенных фосфолипидов в чистом образце плазмы крови (таблица 4.13). Минимальная концентрация для анализа была рассчитана с учетом того, что согласно литературным данным максимальная концентрация фосфатидилхолина в крови составляет 19,9% от начальной дозы.

Таблица 4.13 – Прирост интенсивности пиков основных фосфатидилхолинов препарата Витафосфолип® относительно эндогенного уровня их содержания в образце плазмы крови при увеличении концентрации препарата

Название*	Изменение интенсивности пика относительно содержания эндогенных фосфатидилхолинов плазмы крови (%)				
	0,02 мг/мл (1:250)	0,04 мг/мл (1:125)	0,1 мг/мл (1:50)	0,2 мг/мл (1:25)	1 мг/мл (1:5)
PC (16:0-18:2)/ PC (16:1-18:1)	51±22	170±16	164±21	170±27	287±33
PC (16:0-18:1)	52±21	160±15	158±21	162±25	242±32
PC (18:3-18:3)	0	25±12	11±14	33±15	214±22
PC (18:2-18:3)	0	21±6	22±11	25±13	84±21
PC (18:2-18:2)/ PC (18:1-18:3)	5±14	44±9	46±14	59±17	196±27
PC (16:1-20:2)	30±20	108±14	109±19	129±24	333±30
PC (18:0-18:2)/ PC (18:1-18:1)	55±22	166±15	160±21	163±26	250±32
PC (16:1-22:6)	5±13	35±7	50±11	87±13	436±21
PC (18:3-20:3)	9±14	39±8	45±12	58±13	204±21
PC (18:2-20:3)	6±14	26±6	27±11	28±13	67±20

В таблице 4.13 видно, что для большинства фосфатидилхолинов не было зарегистрировано достоверного увеличения интенсивности при минимальной концентрации препарата в плазме крови. В то время как при концентрации 0,04 мг/мл прирост интенсивности был детектирован практически для всех анализируемых фосфатидилхолинов. Минимальный прирост интенсивности наблюдался для пиков, соответствующих фосфатидилхолинам с линоленовой кислотой в составе (C18:3) (рисунок 4.9). Наибольший прирост интенсивности наблюдался для фосфатидилхолинов, имеющих в составе олеиновую (C18:1) и линолевою (C18:2) кислоты (рисунок 4.10).

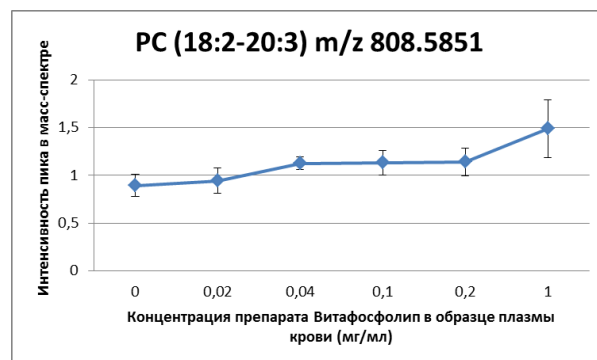
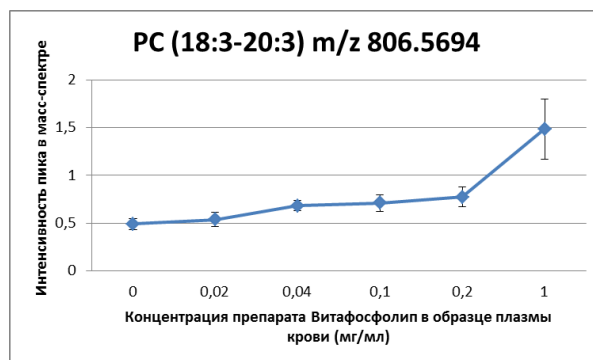
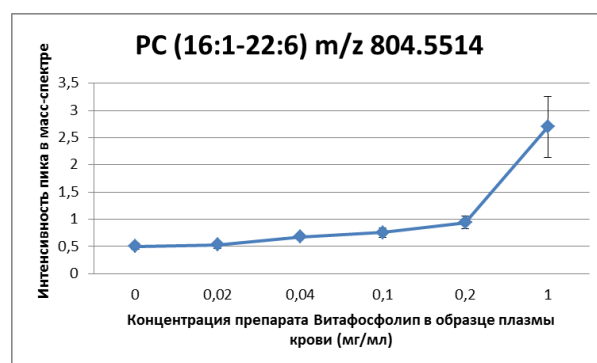
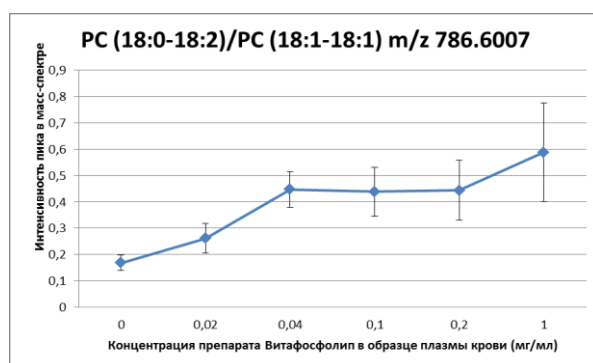
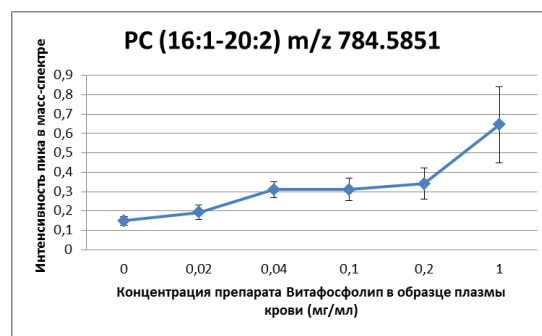
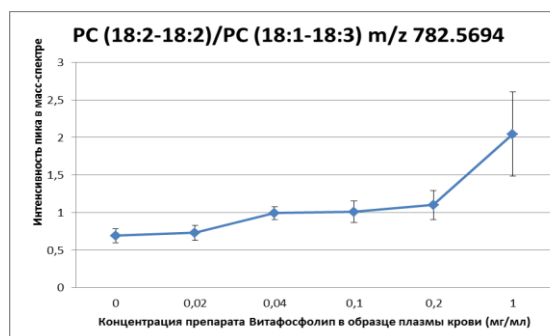
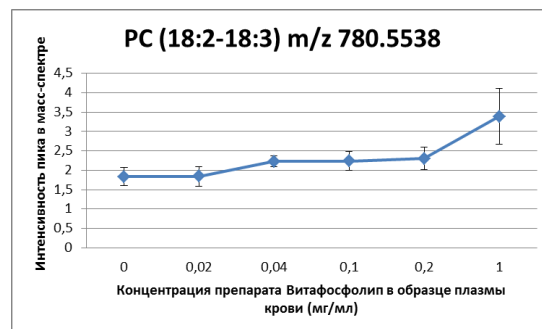
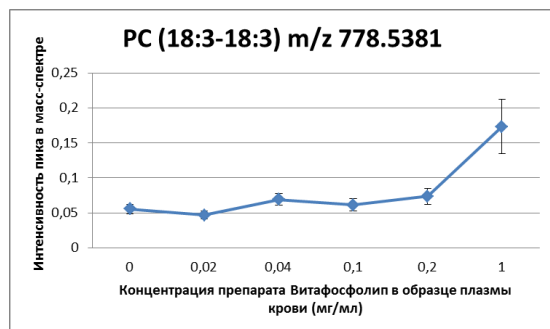
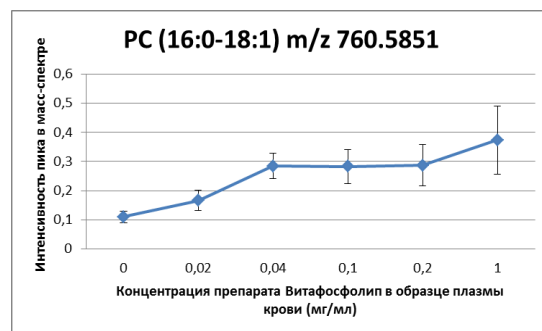
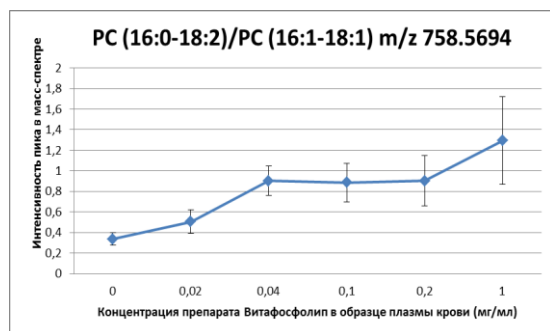


Рисунок 4.9 – Графики зависимости интенсивности пиков фосфатидилхолинов препарата Витафосфолип® от концентрации препарата в образце плазмы крови

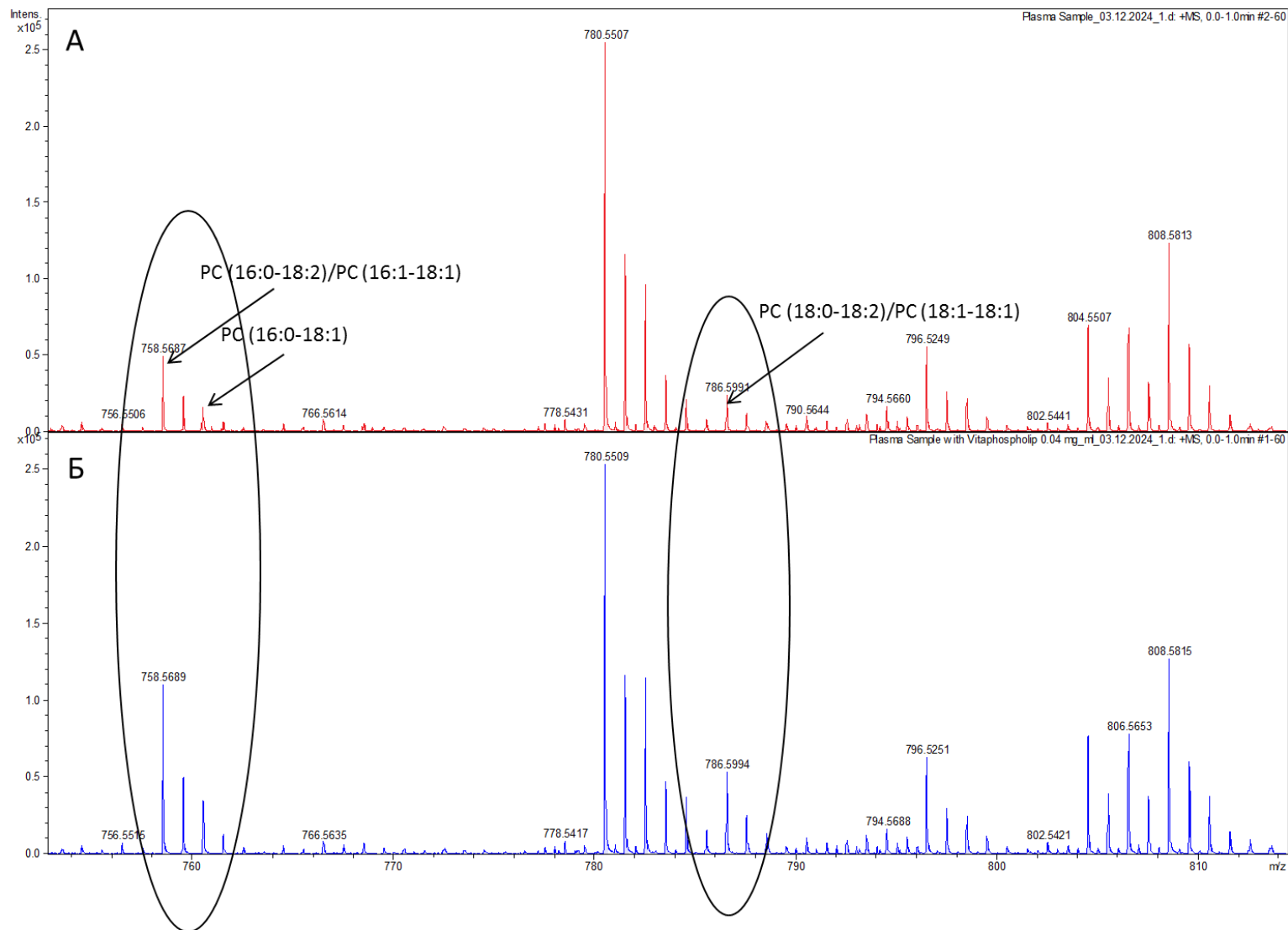


Рисунок 4.10 – Масс-спектры образца плазмы крови без (А) и с 0,04 мг/мл препарата Витафосфолип® (Б). Отмечены фосфатидилхолины (РС), имеющие в составе линолевую (C18:2) и олеиновую (C18:1) кислоты

4.4. Заключение к Разделу 4

Старение — сложный многофакторный процесс, по разному влияющий на множество когнитивных, сенсорных, нейронных, метаболических и молекулярных систем. Выбор модельного объекта для оценки эффективности геропротективных свойств соединений показал, что для изучения возрастных изменений, происходящих в различных системах организма, используется широкий ряд биологических объектов, наиболее популярными из которых являются грызуны (мыши), рыбы (*Danio rerio*), а также беспозвоночные (мухи *Drosophila* и нематоды *Caenorhabditis elegans*). В целом, наиболее распространенной моделью в изучении процессов старения и обмена веществ являются мыши, которые будут продолжать занимать лидирующую позицию в этом вопросе до тех пор, пока не будет выяснено большинство патогенетических механизмов у *Danio rerio*, и не будут созданы новые мутантные особи. *Danio rerio* имеют некоторые преимущества в изучении влияния липидного метаболизма при атеросклерозе, поэтому модель следует выбирать в соответствии с гипотезой, а для углубленных исследований следует рассмотреть комбинацию экспериментов с мышами и *Danio rerio*. Кроме того, важно найти метод визуализации *in vivo*, который отвечает задачам различных моделей и в то же время создает платформу, которая обеспечивает последовательные, надежные и, прежде всего, сопоставимые результаты, независимо от выбранной модели. На основе имеющегося в ИБМХ задела по разработке фосфолипидных препаратов и оценке возможности использования фосфолипидных препаратов в исследованиях *in vitro* и *in vivo* препарат Витафосфолип™ выбран как потенциальное геропротективное соединение, влияющее на липидом крови, а следовательно, и атеросклеротические поражения. В таблице 4.14 представлена характеристика различных животных моделей, выбранных для изучения атеросклеротических поражений в разных возрастных группах и оценки эффективности геропротективных свойств на основе фосфолипидов.

Таблица 4.14 – Сравнительная характеристика животных моделей [203]

Характеристика	Мышь	Danio rerio	
		личинки	взрослые
ApoE-/-	+	-	-
Ldlr-/-	+	+	+
ApoC2-/-	+	+	+
СЕТР	-	+	+
Созревание	2 мес	3 мес	-
Потомство	5-8	200-300	-
Прозрачность	-	+	-
Размещение групп	Группа 6-10	Рой (4-10/л)	Рой (4-10/л)
Преобладающий профиль липопротеинов	ЛПНП	ЛПВП	ЛПВП
Транспорт холестерина	ЛПВП	ЛПВП	ЛПВП
Синтез витамина С	+	-	-
Предпочтительный источник энергии	Углеводы	Липиды	Липиды
Сбор образцов крови	Нелетально	летально	В основном летально
Утолщение интимы	+	-	+
Поражения	Аорта и сонные артерии	Каудальная вена	Спинная аорта
Разрыв поражения	Редко	-	-
Стадии атеросклероза	V-VI	II	III
Отложение эфиров холестерина	В атеросклеротических поражениях	В жидкостях организма	В атеросклеротических поражениях

В соответствии с требованиями п. 4.4 ТЗ, выбор модельного объекта для оценки эффективности геропротективных соединений проведен на основе оценки способности реагировать на фармакодинамические эффекты, фармакокинетический профиль, вид животных, пол, возраст, а также возможности использования соединения, обладающего потенциальными геропротективными свойствами, в исследованиях *in vitro* и *in vivo*. Исследования с использованием животных моделей для выбранных моделей могут быть проведены с соблюдением требований к проведению доклинических исследований безопасности лекарственных средств, поскольку: группы животных будут достаточными и сопоставимыми по полу и возрасту; исследование будет проведено с использованием животных, не подвергшихся анестезии при условии избежания боли и дискомфорта; методы оценки геропротекторных свойств будут проводиться по методикам, характеризующим, в том числе «метабомику возраста» (metabolomic aging, см. подраздел 4.3). Таким образом, работы по п 1.4ПГ выполнены в полном объеме и соответствуют пп 3.4, 4.4, 5.4 ТЗ.

По результатам работ подготовлена публикация Koroleva, P.I.; Bulko, T.V.;

Kuzikov, A.V.; Gilep, A.A.; Romashova, Y.A.; Tichonova, E.G.; Kostrukova, L.V.; Archakov, A.I.; Shumyantseva, V.V. Role Assessment of Water-Soluble Pharmaceutical Form of Phosphatidylcholine on the Catalytic Activity of Cytochrome P450 2C9 and 2D6. *Int. J. Mol. Sci.* 2025, 26, 4. <https://doi.org/10.3390/ijms26010004>. Публикация №8 в составе пакета отчетной документации.

5. ОТБОР МИШЕНЕЙ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ПРОЦЕССОВ СТАРЕНИЯ, ПРИГОДНЫХ ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕГО МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Работы по п.1.5 ПГ выполнялись Соисполнителем - Федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», (химический факультет) по Договору № 13/К от 16 августа 2024, заключенному в рамках текущего проекта. В работе Соисполнителем также использованы результаты работы Кулаковой А.М., выполненные по Договору ГПХ №19К/223, заключенному с ИБМХ. В том числе использованы данные по кластеризации траекторий молекулярной динамики для систем различного состава для определения стабильности доменов белка ORF2p.

Целью работ по п.1.5 ПГ являлась оценка ландшафта внутриклеточных мишеней белковой природы и нацеленных на них антивозрастных агентов, потенциальных геропротективных соединений, для выявления наиболее перспективных мишеней и агентов. В результате анализа полученного набора данных, в качестве мишени для дальнейшего моделирования был отобран белок ORF2p, обладающий активностью обратной транскриптазы или полимеразы.

Для этого белка получен набор молекулярных полноатомных трехмерных структур мишеней.

5.1. Получение набора данных о внутриклеточных мишенях белковой природы и нацеленных на них известных антивозрастных агентах

Для обобщения полученных к настоящему времени сведений о внутриклеточных мишенях-белках, был проведён поиск соответствующих научно-исследовательских статей и обзоров в электронных базах данных PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), Wiley (<https://www.wiley.com/en-us>), Scopus (<https://www.elsevier.com/products/scopus>), CAS Content Collection (<https://www.cas.org/cas-data>), Protein Data Bank (<https://www.nist.gov/publications/protein-data-bank>), IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY (<https://www.guidetopharmacology.org/>).

В качестве поисковых запросов использовались известные по литературным данным белки-мишени: теломераза, сиртуины, матриксные металлопротеиназы,

мишень рапамицина у млекопитающих (mTOR), аденозинмонофосфат-активируемая протеинкиназа (AMPK), супероксиддисмутаза, белки вилокобразной формы FOXO, ядерный фактор NF-κB, ядерный фактор эритроидного происхождения 2 (NRF2), активируемая митогеном протеинкиназа p38 (MAPK), фактор транскрипции c-Jun (JNK). Так же в качестве поисковых запросов были указаны известные антивозрастные агенты, такие как метформин, рапамицин, ресвератрол, бутират натрия, трихостатин А, спермидин, аспирин, акарбоза, кверцетин, дазатиниб, физетин, лютеолин, куркумин, навитоклакс, нордигидрогваяретовая кислота (NGDA), циклоастрегенол (ТА-65), метадиол, азацитидин, β-каротин, липоевая кислота, коэнзим Q10, глутатион, астрагалозид, икариин, бутеин, катехин, галлат эпигаллокатехина, гастродин, 6-гингерол, гинзенозид Rg1, нарингенин, теафлавин, эмодин, фикоцианин, полифенолы, фитоэстрогены, витамины. Также при составлении списка антивозрастных агентов и белков-мишеней в качестве исходного материала был взят обзор 2024 года Tenschov и соавторов [285], где систематизировано множество препаратов против старения, антивозрастные свойства которых документированы и клинически подтверждены. В коллекции антивозрастных агентов, исследуемых в настоящее время, много природных соединений, как чистых веществ, так и экстрактов из различных растений. Для конкретизации натуральных продуктов, которые обладают эффектом борьбы со старением, был использован обзор Shen и соавторов [286].

5.2. Получение набора данных о природных и синтетических соединениях, способных воздействовать на процессы, происходящие при нейродегенеративных заболеваниях, с указанием конкретных мишеней

Нами были собраны сведения о соединениях природного происхождения, для которых показано нейропротекторное действие, либо действие на процессы, происходящие при нейродегенеративных заболеваниях, в том числе связанных, либо усиливающихся с возрастом (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона (Гентингтона), боковой амиотрофический склероз, амнезия). Для сбора этих сведений был проведён поиск соответствующих научно-исследовательских статей и обзоров в электронной базе данных PubMed.

Первичный анализ данных показал, что наиболее часто эти соединения активируют/восстанавливают аутофагию, приводя к деградации токсичных белков (встречается 55 раз), а также защищают от или подавляют окислительный стресс (встречается 32 раза). Кроме того, некоторые из этих соединений влияют на экспрессию (встречается 56 раз) либо самих токсичных белков, либо белков, участвующих в процессе их деградации (убиквитин-лигазы, шапероны, протеазы, субъединицы протеасомы и т.п.), либо антиоксидантных ферментов (SOD, каталаза и т.п.).

Кроме того, отдельно была собрана информация о синтетических веществах, действующих на процессы, происходящие при болезни Хантингтона (Гентингтона) – нейродегенеративном заболевании, относящемся к протеинопатиям (также, как и болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона) и характеризующимся накоплением агрегатов белка хантингтина. Для сбора информации был проведён поиск научно-исследовательских статей и обзоров в электронной базе данных PubMed.

Суммированные результаты могут быть использованы для разработки новых целевых синтетических и полусинтетических антивозрастных препаратов, в том числе путем выявления новых мишеней для уже известных препаратов.

В результате анализа полученного набора данных, в качестве мишени для дальнейшего моделирования был отобран белок ORF2p, обладающий активностью обратной транскриптазы или полимеразы.

На основе анализа набора данных о внутриклеточных мишенях белковой природы в качестве мишени для моделирования был выбран белок открытой рамки считывания 2 (ORF2p), ген которого находится в ретротранспозоне LINE-1 (L1). Ретротранспозон L1 относится в группе ретротранспозонов LINE (Long Interspersed Nuclear Element, LINE), которые широко распространены в геноме эукариот. L1 обнаружен у всех млекопитающих и является единственным ретротранспозоном, который все ещё активен, т.е. способен к автономной ретротранспозиции в геноме современного человека, кодируя свой собственный белковый аппарат для обратной транскрипции и интеграции в геном [287]. L1 является достаточно распространённым мобильным генетическим элементом: существует тысяча полноразмерных и сотни тысяч укороченных элементов L1, которые составляют 17% человеческого генома [288]. Хотя подавляющее большинство

последовательностей L1 человека являются неактивными «молекулярными окаменелостями», примерно 80-100 копий на геном сохраняют способность к мобилизации с помощью процесса, называемого ретротранспозицией [289].

Полноразмерный ген L1 составляет 6,5 тыс пар нуклеотидов (п.н.), и включает 900 п.н., 5'-нетранслируемый регион (UTR), два белка открытой рамки считывания: ORF1p и ORF2p, необходимые для успешной ретротранспозиции и короткую 3'-UTR [288].

Глобальная перестройка генома по мере старения, в том числе переход гетерохроматина в эухроматин, приводит к активации L1. ORF2p может полимеризовать ДНК на матрицах РНК или ДНК (активность обратной транскриптазы (ОТ) или полимеразы) с примерно одинаковой эффективностью, используя либо ДНК, либо РНК-праймеры. РНК-прайминг синтеза кДНК на матрице РНК менее эффективен, но все равно происходит со значительной скоростью. Этот сниженный, но значительный уровень L1 ORF2p РНК-прайминга на матрицах РНК резко контрастирует с обратной транскрипцией ВИЧ-1, для которой при инициации используются только специализированные РНК-праймеры, с эффективностью, сниженной на порядки [290]. Синтез РНК L1 ORF2p (активность белка как РНК-зависимой РНК-полимеразы) протекает с минимальной обнаруживаемой активностью. В одонуклеотидных добавлениях с длинными 20-нуклеотидными праймерами ORF2p не имел явного предпочтения к матрице РНК или ДНК.

Функциональные домены, присутствующие в ORF1p, являются транскрипционными факторами, демонстрируют РНК/ДНК связывающую активность. ORF2p представляет собой белок с активностью обратной транскриптазы, и эндонуклеазы. Помимо вышеупомянутых доменов человеческий ORF2p обладает еще тремя другими доменами с неустановленной функцией [291].

Хотя транскрипты L1 в основном активны только во время эмбриогенеза, они обнаруживаются и во взрослых соматических клетках, таких как эндотелиальные клетки, а также в соматических опухолях и линиях опухолевых клеток [292]. Кроме того, L1 экспрессируются на высоких уровнях в дифференцирующихся нейронных прогениторных клетках, регулируя скорость нейронной дифференциации независимо от обратной транскрипции [293].

Исследования показали, что L1 способствует генетическим изменениям при онкологических заболеваниях, при этом соматические вставки L1 наблюдаются в отдельных типах онкозаболеваний человека. Rodi и соавторы показали, что ORF1p является широко распространенным, но при этом высокоспецифичным для опухолей антигеном [294]. Почти половина всех раковых заболеваний человека иммунореактивна для белка ORF1. Для многих типов онкозаболеваний показано гипометилирование промотора L1, транскрипция L1, экспрессия белка ORF1p и соматическая ретротранспозиция L1 [295].

Существует ряд молекулярных механизмов для подавления активности ретротранспозонов в клетках хозяев. Однако эти механизмы подавления L1 становятся менее эффективными в процессе старения. Сигнальный белок SIRT6, участвующий в регуляции метаболизма, является мощным репрессором активности L1, в частности, SIRT6 связывается с 5'-UTR локусами L1, где через последовательность реакций способствует упаковке L1 в транскрипционно репрессивный гетерохроматин. Однако в ходе старения, а также в ответ на повреждение ДНК, SIRT6 истощается в локусах L1, что позволяет последнему активироваться [296].

Вклад активности ретротранспозонов в старение и возрастные заболевания только-только приоткрывается исследователям, это новая мишень. В публикации 2019 года De Сессо и соавторы показали, что во время клеточного старения для некоторых клеток здоровых людей характерна активация L1, которая в свою очередь активирует ответ интерферона I типа [297]. Ответ интерферона I типа является фенотипом позднего старения. Им-мунофлуоресцентное обнаружение p16 и ORF1 в стареющих клетках показало сверхэкспрессию ORF1. De Сессо и соавторами было показано, что в биопсиях кожи пожилых людей 10,7% дермальных фибробластов были положительными по маркеру старения p16, что находится в диапазоне, зарегистрированном у стареющих приматов. Некоторые из p16-положительных дермальных фибробластов были также положительными по ORF1 (10,3%). Доля клеток, положительных по L1 ORF1, увеличивалась в тканях с возрастом. Авторы наблюдали увеличение экспрессии L1 и генов ответа интерферона I типа в экспериментальной модели клеточного старения (молодые мыши, подвергнутые сублетальному облучению) [297].

В геноме человека содержится более 500000 копий L-1, но почти все они стали неактивными из-за неполной обратной транскрипции и появления стоп-кодона в двух открытых рамках считывания [298]. Можно предположить, что виды млекопитающих с высокой активностью L1, особенно в соматических стволовых/прогениторных клетках, должны иметь более короткую продолжительность жизни, чем виды с низкой активностью L1 [288]. Хотя данные в этой области скудны, оценки числа полноразмерных функциональных элементов L1 у современных людей в среднем составляют от 80 до 100, мышь же содержит более 3000 функциональных L1, создавая в 50 раз больший потенциал для повреждения ДНК, опосредованного L1, по сравнению с человеком. Хотя, при сравнении средней продолжительности жизни шимпанзе, 52 года, и человека, 67,2 года, большее количество L1, наблюдается в транскриптах шимпанзе, а не человека.

После транскрипции L1-транскрипт полиаденилируется и перемещается в цитоплазму, где ORF1 и ORF2 транслируются в белок ORF1 (ORF1p) и белок ORF2 (ORF2p) [288]. ORF1p связывает L1-транскрипты и возвращает их в ядро для реинтеграции в геном хозяина (поэтому процесс реинтеграции еще называется целевой обратной транскрипцией, target-primed reverse transcription TPRT). Реинтеграции способствует белок ORF2p, который обладает как эндонуклеазной, так и обратной транскриптазной активностью. Реинтеграция начинается с того, что ORF2p надрезает геномную ДНК и использует свободную 3' гидроксильную группу для запуска обратной транскрипции L1-транскрипта, также осуществляемой ORF2p. ORF2p ко-трансляционно связывает кодирующую его L1 РНК, свойство, называемое «цис-предпочтение», образуя комплекс рибонуклеопротеина со многими копиями ORF1 и белками хозяина [291]. Далее следует разрезание и лигирование второй цепи, механизм этого до конца не изучен. Но описанная выше последовательность действий при ретротранспозиции – это канонический механизм ORF2p. Неканонические же процессы - неудачные вставки и аберрантная активность эндонуклеазного домена - приводят к повреждению ДНК и транслокациям, а цитозольная аберрантная активность обратнотранскриптазного домена ORF2p генерирует патогенные гибриды РНК:ДНК [291].

ORF2p опосредует геномную нестабильность LINE-1. Показано, что повышенная экспрессия ORF2 в отдельности подавляла уровень жизнеспособных

клеток на 60% и 50% при клеточной пролиферации в клетках HeLa и MCF7 соответственно [300]. Предполагается, что ORF2p при ретротранспозиции надрезает хромосомную ДНК, неспецифически, значит, общая жизнеспособность клеток, экспрессирующих L1, в первую очередь зависит от ORF2. Благодаря точным и эффективным механизмам репарации только небольшой процент разрывов приводит к устойчивому повреждению или ретротранспозиции. Однако кумулятивный эффект может привести к накоплению точечных мутаций, перестроек, поврежденного хроматина и, в конечном итоге, репликативного стресса. Предполагается, что эти разрывы ДНК и результаты неправильной репарации накапливаются с возрастом, в конечном итоге активируя клеточные пути старения p16/pRB и p53.

Очевидно, что избыточная экспрессия ORF2p вызывает чрезмерное повреждение ДНК. Однако если повреждение ДНК, опосредованное ретротранспозоном L1, поддерживать в течение десятилетий, то даже очень низкий уровень активности L1 может привести к прогрессирующему накоплению повреждений ДНК, геномной нестабильности, повышенному репликативному стрессу и клеточному старению. Наиболее пагубные эффекты повреждения, вызванного L1, возникают в субпопуляции взрослых стволовых клеток, которые реагируют на сигналы регенерации тканей.

Как эндонуклеазный, так и обратнотранскриптный домены ORF2 могут по отдельности способствовать пагубным эффектам экспрессии L1. Мутации, приводящие к преждевременным стоп-кодонам в той части последовательности гена L1, которая экспрессируется в ORF2p могут давать укороченные белки, которые сохраняют функцио-нальный эндонуклеазный домен. Kines и соавторы показали, что некоторые укороченные формы белка ORF2p вызывают токсичность различного уровня и повреждения ДНК при хронической сверхэкспрессии в клетках млекопитающих [298].

Сложнее оценить, почему обратнотранскриптный домен может быть вредным для клеток. Биохимические и структурные анализы показывают, что ORF2p содержит высокоактивную обратную транскриптазу, которая уникально адаптирована для своего паразитического цикла репликации, с как консервативными, так и новыми структурными особенностями, которые сохраняют

оптимальную ретротранспозицию на протяжении всей эволюции. Посредством ORF2p L1 способен ретротранспозировать не только копию своей собственной РНК в цис-положении, но и другие РНК (Alu, SINE-VNTR-Alu (SVA), U6) в транс-положении в новые места генома [299]

Одним из способов лечения заболеваний, связанных с активностью обратной транскриптазы, таких как инфекции ВИЧ и гепатит В, является использование ингибиторов обратной транскриптазы. Два из четырёх классов одобренных в настоящее время анти-ВИЧ-препаратов, нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (НИОТ) и ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (ННИОТ), как очевидно из названия ингибируют, этот фермент. Baldwin и соавторы показали, что ламивудин и карбовир были умеренными ингибиторами ORF2p ($IC_{50} = 5-7$ мкМ), тогда как ставудин и энтекавир - более мощными ингибиторами ($IC_{50} = 0,4-0,6$ мкМ), причем на клетках HeLa, авторы подтвердили умеренное ингибирование ORF2p ставудином, ламивудином, эмтрицитабином, азитотимидином, тенофовиром ($IC_{50} = 1-5$ мкМ). Различия между анализами *in vitro* и на основе клеток авторы объясняют дифференциальным трифосфорилированием НИОТ. Эволюционный анализ демонстрирует структурную консервативность между ORF2p и другими РНК- и ДНК-зависимыми полимеразам. Опубликована 3Д структура «ядра» человеческого ORF2p (остатки 238–1061, включая домен обратной транскриптазы), полученная с помощью рентгеновской кристаллографии и криоэлектронной микроскопии в нескольких конформационных состояниях [291]. Кристаллическая структура ORF2p обеспечивает важную отправную точку для дизайна новых НИОТ, специфичных для ORF2p. Таким образом, поиск веществ, способных ингибировать активность ORF2p и снижать вероятность встраивания L1, и, как следствие, нарушения работы генов и появления перерожденных клеток, является актуальной и важной задачей на пути разработки геропротекторов нового механизма действия.

Учитывая роль ретротранспозона L1 в формировании раковых клеток, в литературе исследовалась активность текущих ингибиторов обратной транскрипции (ИОТ) против ORF2p. Титрование форм нуклеозидтрифосфата (НТФ) нуклеозидных ИОТ (НИОТ) в гелевых анализах ОТ L1 показало, что ЗТС (ламивудин) и карбовир (активный метаболит абакавира) были умеренными ингибиторами ORF2p

(полумаксимальная ингибирующая концентрация (IC_{50}) 5–7 мкМ), тогда как d4Т (ставудин) и энтекавир были более мощными (IC_{50} 0,4–0,6 мкМ). Для обеспечения надежного высокопроизводительного анализа ингибирования были разработаны гомогенные флуоресцентные анализы с временным разрешением для обратной транскрипции ORF2p. Все НИОТ NTP ингибировали ORF2p в разной степени, причем наиболее мощными были аналоги тимидина дидезокситимидин (ddТ) и 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидротимидин (d4Т) ($IC_{50} < 10$ нМ), за которыми следовали 3'-азидо-3'-дезокситимидин (AZТ) и ламивудин (ЗТС) как умеренные ингибиторы в этих условиях (IC_{50} 200–750 нМ) [290] (рисунок. 5.1a). При этом ни один из шести протестированных аллостерических ненуклеозидных ИОТ ВИЧ-1 (ННИОТ) не ингибировал ORF2p; в частности, невирапин даже в концентрации 1 мМ не показал ингибирующей активности по отношению к ORF2p (рисунок 5.1a). Используя стабильную двойную люциферазную ретротранспозонную репортерную систему, в клетках HeLa было подтверждено умеренное ингибирование L1 d4Т, ЗТС, FTC (2',3'-дидезокси-3'-тиа-5-фторцитидин, эмтрицитабин), AZТ, тенофовиром и GBS-149 (IC_{50} 1–5 мкМ) [290]. Активность GBS-149 существенно не отличалась от активности родственных ЗТС и FTC; ингибитор HCV софосбувир не ингибировал L1 при концентрации до 30 мкМ. Различия между анализами *in vitro* и на основе клеток могут быть связаны с дифференциальным трифосфорилированием НИОТ.

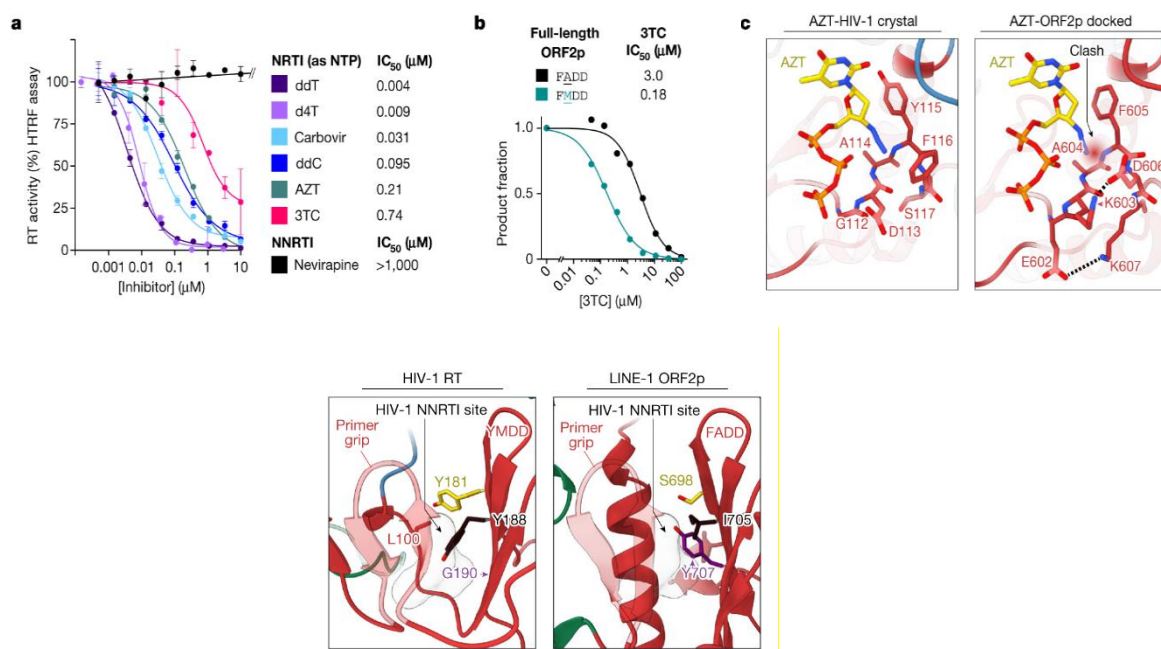


Рисунок 5.1 – Ингибирование ORF2p. Иллюстрация взята из [291].

а, Ядро ORF2p ингибировалось НИОТ, но не аллостерическими ингибиторами ВИЧ ННИОТ *in vitro* в соответствии с гомогенным флуоресцентным анализом с временным разрешением ($n = 3$ лунки). **б**, Ингибирование 3ТС в геле на основе ОТ полноразмерного ORF2p WT (FADD) или ВИЧ-подобного (FMDD). **в**, Структурная основа слабого ингибирования L1 AZT. Кристаллическая структура трифосфата AZT, связанного с ОТ ВИЧ-1 (PDB 5I42), по сравнению с моделью трифосфата AZT, связанного с L1 ORF2p. Выделено столкновение между 3'-азидо и NH-остовом ORF2p F605. Пунктирные линии обозначают солевые мостики, придающие жесткость карману ORF2p. **г**, Сравнение области связывания ННИОТ ОТ ВИЧ-1 с ORF2p. Слева, ОТ ВИЧ-1 в несвязанной с ННИОТ конформации (PDB 7LRI). Остатки, участвующие в устойчивости к ННИОТ, выделены; пространство, занимаемое связанным с ВИЧ-1 неврипином, затенено (PDB 4PUO). Справа, эквивалентная область в L1 ORF2p. Длинная α -спираль соответствует остаткам 572–588 в ORF2p. Остатки, аналогичные остаткам в ОТ ВИЧ-1, помечены

Эффективность против ORF2p различалась почти в 200 раз между протестированными НИОТ, а AZT и 3ТС не были мощными ингибиторами (рисунок 5.1а). У ВИЧ-1 устойчивость к 3ТС может быть вызвана мутациями M184I в ОТ (высоко консервативный мотив Y-M-D-D, в который входят два из трех остатков Asp, которые формируют активный центр полимеразы, мутирует в Y-V-D-D/Y-I-D-D), которые стерически мешают взаимодействию с оксатиолоновым кольцом [301]. Мутанты ВИЧ-1 по Ala (Y-A-D-D, как F-A-D-D в ORF2p) были изучены в отношении эффективности 3ТС, продемонстрировав, что ван-дер-ваальсовы взаимодействия между M184 и оксатиолоновым кольцом 3ТС являются стабилизирующими; эти взаимодействия отсутствуют с меньшим A701 (F-A-D-D) в ORF2p, и это различие может объяснять относительно более низкую эффективность

ЗТС против L1 ORF2p ОТ. Моделирование родственного аналога ЗТТ-ТР в активном сайте L1 с использованием кристаллической структуры dTTP подтвердило близость M701 к оксатиолоновому кольцу, тогда как A701 в диком типе L1 был дальше. Дальнейшее подтверждение этого режима ингибирования заключается в том, что ЗТС был примерно в 15 раз более эффективным в ингибировании мутантного полноразмерного ORF2p A701M (F-M-D-D), чем дикого типа (F-A-D-D, рисунок 5.1в). На основании этих результатов, ингибирования ВИЧ-1 [302] и анализа HERV-K [303] получается, что ЗТС и родственные FTC и GBS-149 вряд ли будут селективными для L1 ORF2p.

Чтобы понять структурную основу, лежащую в основе различий между AZT и другими аналогами тимидина, учеными были смоделированы трифосфаты НИОТ на основе тимидина в тройную кристаллическую структуру ORF2p, содержащую dTTP в N-сайте [290]. Как и ожидалось, ddTTP и d4T-ТР не показали никаких столкновений с белком, поскольку они очень похожи по форме на dTTP. Однако модель AZT-ТР показала столкновение среднего азота 3'-азидогруппы с амидным водородом F605 (расстояние 2,03 Å, рисунок 5.1в), которое не было устранено минимизацией энергии. Это столкновение не наблюдалось в кристаллической структуре AZT-ТР, связанного с обратной транскриптазой ВИЧ-1 (соответствующее расстояние 2,28 Å, рисунок 5.1в). Невозможность устранить столкновение в ORF2p может быть объяснена разницей в конформационной гибкости области вокруг 3'-азидогруппы (остатки 602–607 в ORF2p и 112–117 в ОТ ВИЧ-1). В ORF2p этот сегмент содержит два внутренних солевых мостика, которые отсутствуют в ОТ ВИЧ-1, и имеет более низкие средние факторы остова, чем ВИЧ-1, относительно полного сайта dNTP (определяемого как все остатки в пределах 6 Å от dTTP; сайт против региона в ORF2p, 43,4 против 48,1; ОТ ВИЧ-1, 114,3 против 110,7). Расчеты на основе моделирования возмущения свободной энергии относительного связывания ORF2p этих нуклеотидов показали незначительную разницу в относительной свободной энергии связывания (ΔG) между ddTTP и d4T, но большую положительную разницу между ними и AZT, что согласуется с более чем 20-кратным изменением ингибирующей активности ORF2p AZT по сравнению с ddTTP и d4T (рисунок 5.1а).

НИИОТ действуют на активный сайт ОТ и ингибируют ORF2p с различной эффективностью, тогда как ННИОТ ВИЧ-1 [290] связываются с индуцированным аллостерическим сайтом в ладони между захватом праймера, β -слоем, содержащим петлю с мотивом Y-M-D-D, и сегментом 94–102 [302]; этот карман отсутствует у HBV, HIV-2 и HERV-K [37]. ННИОТ ВИЧ-1 не ингибируют ORF2p (рисунок 5.1a), а структурные и последовательные различия между карманом ННИОТ ВИЧ-1 и эквивалентной областью в ORF2p объясняют это отсутствие ингибирования. Поскольку ОТ ВИЧ-1 претерпевает конформационные изменения при связывании ННИОТ, структура ОТ ВИЧ-1 в отсутствие ННИОТ сравнивалась с кристаллической структурой ORF2p. Наиболее ярким отличием была замена сегмента 94–102 ОТ ВИЧ-1 на более длинную α -спираль, образованную остатками 572–588 в ORF2p, что делает ни одну из этих позиций структурно не эквивалентной. Кроме того, остатки Y181 и Y188, которые были вовлечены в укладку ароматического кольца с невирапином и другими ННИОТ, были заменены на S698 и I705 соответственно, а небольшой остаток G190 в ОТ ВИЧ-1 был заменен на объемный Y707 в ORF2p. Эти различия совместно объясняют, почему ORF2p не образует карман, который связывает ННИОТ ВИЧ-1.

Для дальнейших исследований в данной области необходимо более чётко представлять трехмерную структуру комплекса ORF2p, для поиска подходящих потенциальных инактиваторов фермента. Известные до недавнего времени кристаллические структуры ORF2p в банке данных PDB представляли собой только эндонуклеазный домен. Последняя добавленная в банк данных PDB структура ORF2p представляет собой тройной комплекс фермента с нуклеотидом дезокситимидинтрифосфатом (ТТФ) и гетеродуплексом шаблон-праймер, содержащим трехнуклеотидный 5'-выступ в матрице РНК и 3'-дидезокси-терминированный праймер ДНК [291]. В отличие от других обратных транскриптаз, структура ядра ORF2p состоит из пяти доменов: «пальцы», «ладонь», «большой палец», «запястье» и «башня» (рисунок. 5.2). Все пять доменов обеспечивают обширный контакт со связанной последовательностью нуклеиновых кислот.

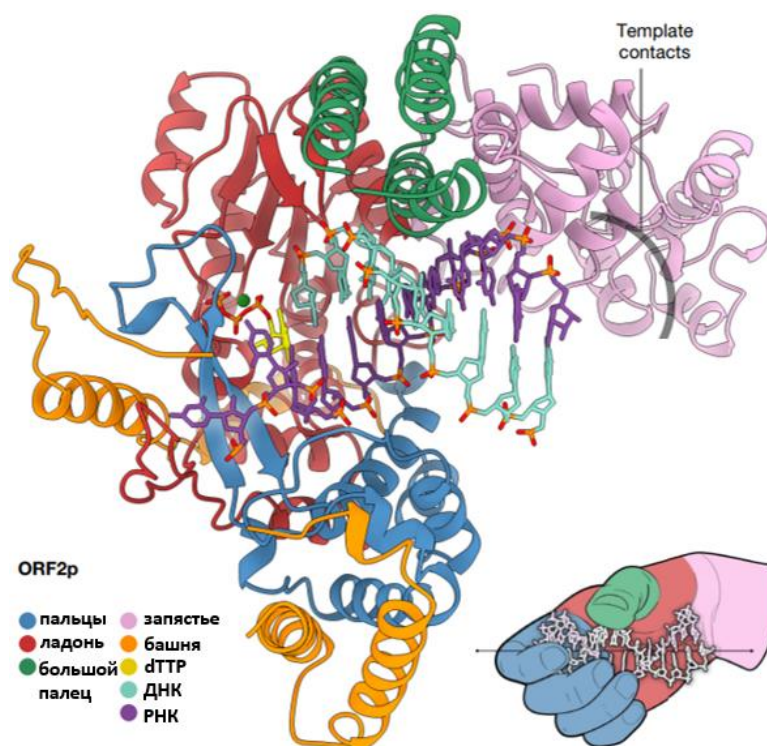


Рисунок 5.2 – Домены «башня», «запястье», «пальцы», «ладонь», «большой палец» координируются с гибридной дуплексной РНК-матрицей (фиолетовый) и ДНК-праймером (голубой) и нуклеотидом ТТФ (желтый) для активности обратной транскриптазы ядра ORF2p. Все пять доменов ядра ORF2p контактируют с матрицей или праймером, а многочисленные остатки контактируют с входящим основанием. Иллюстрация взята из [304]

Известные эксперименты по удалению больших частей домена «запястья» (863–1061) и последующего CTD показали, что оба домена необходимы для эффективного функционирования ретротранспозона [305]. Домен «запястье» состоит из 12 спиралей, прикрепленных к консервативным доменам обратной транскриптазы посредством взаимодействий со спиралью доменов «большой палец» и «ладонь» через спираль в остатках 573-581 и короткий β -поворот в остатках 688-695. Поиски сходства с помощью серверов Dali и Foldseek показали слабое сходство со стерильным доменом, подобным мотиву альфа, что указывает на возможные роли в связывании нуклеиновых кислот или белок-белковых взаимодействиях. Домен «запястье» образует многочисленные контакты остова с шаблоном РНК через $n+4$ до $n+7$, и триаланиновые мутанты, охватывающие эти остатки, привели к снижению или отсутствию активности ретротранспозиции [306].

Известны также эксперименты [291] по исследованию термической стабильности ORF2p в дифференциальных сканирующих флуориметрических

анализах, в которых денатурация, вызванная нагревом, приводит к увеличению экспозиции гидрофобного ядра белка и, как следствие, связыванию и флуоресценции красителя SYPRO Orange. ORF2p, лишенный связанной нуклеиновой кислоты, был нестабилен, с температурой плавления $34,1 \pm 0,4$ °C. ORF2p был заметно стабилизирован путем связывания одноцепочечной РНК ($\Delta T_m = 14,4 \pm 0,6$ °C) и дополнительно стабилизирован путем связывания гибрида РНК-ДНК [291]. Чтобы понять структурные изменения, возникающие в результате связывания праймера и шаблона, авторы использовали одночастичную криоэлектронную микроскопию для получения реконструкций ORF2p в трех различных состояниях: в активном тройном комплексе с ТТФ и шаблоном-праймером; связанный с олиго-25(А) одноцепочечной РНК; и в апо-форме (разрешения 3,30, 3,66 и 4,06 Å соответственно) (рисунок 5.3).

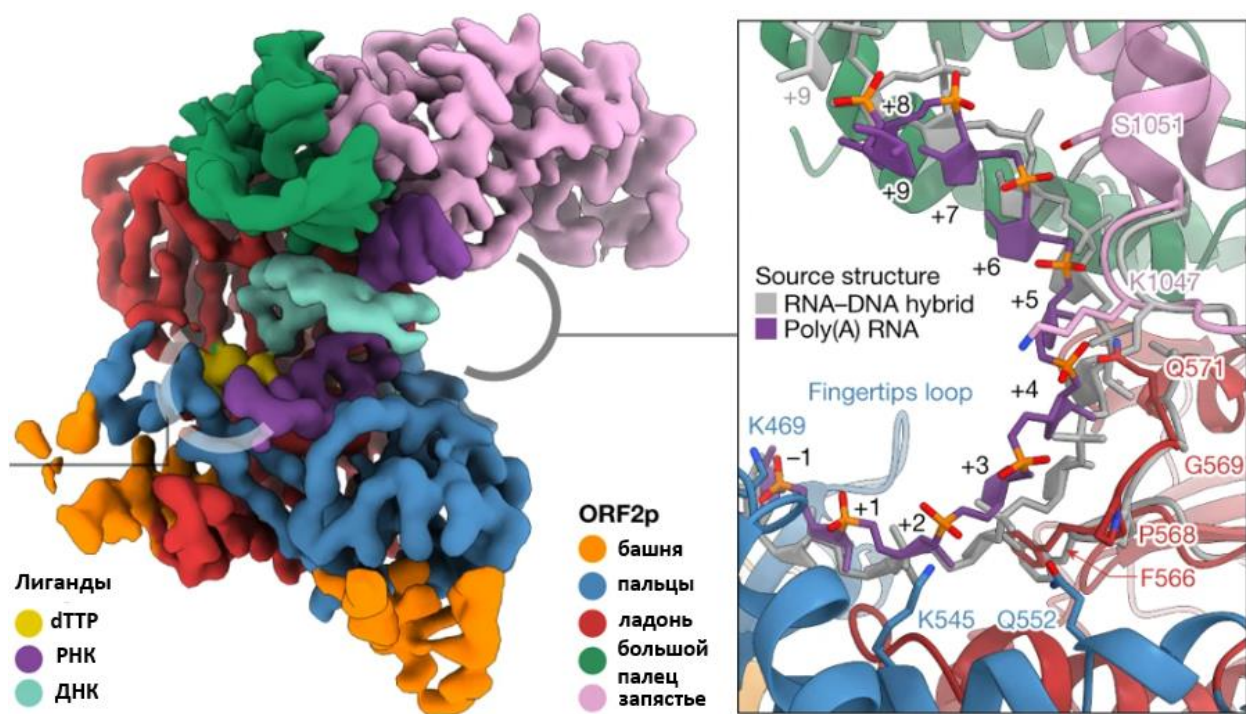


Рисунок 5.3 – Карта плотности (разрешение 3,3 Å) крио-ЭМ реконструкции ядра ORF2p в тройном комплексе с гетеродуплексом РНК-матрица–ДНК-праймер и ТТФ, окрашенная в зависимости от близости к смоделированным доменам с подходящей атомной моделью (вставка слева), которая показывает четкую плотность для праймера, матрицы и основания dTTP для присоединения. Отклонение РНК-матрицы (вставка справа) в структуре одноцепочечной РНК крио-ЭМ (фиолетовый) от гетеродуплекса (серый, RMSD основной цепи 3,76 Å). Иллюстрации взяты из [291]

Апо-ORF2p был обнаружен в конформации «большой палец вверх», в которой были доступны связывание шаблона и активные сайты. Известно, что апо-вирусные

обратные транскриптазы напротив предполагали неактивную конформацию «большой палец вниз», в которой большой палец занимал сайт связывания нуклеиновой кислоты (рисунок 5.4, 5.5). Эта конформация «большой палец вверх», нестабильность апо-формы белка и прочное связывание РНК, вероятно, способствуют цис-предпочтению L1.

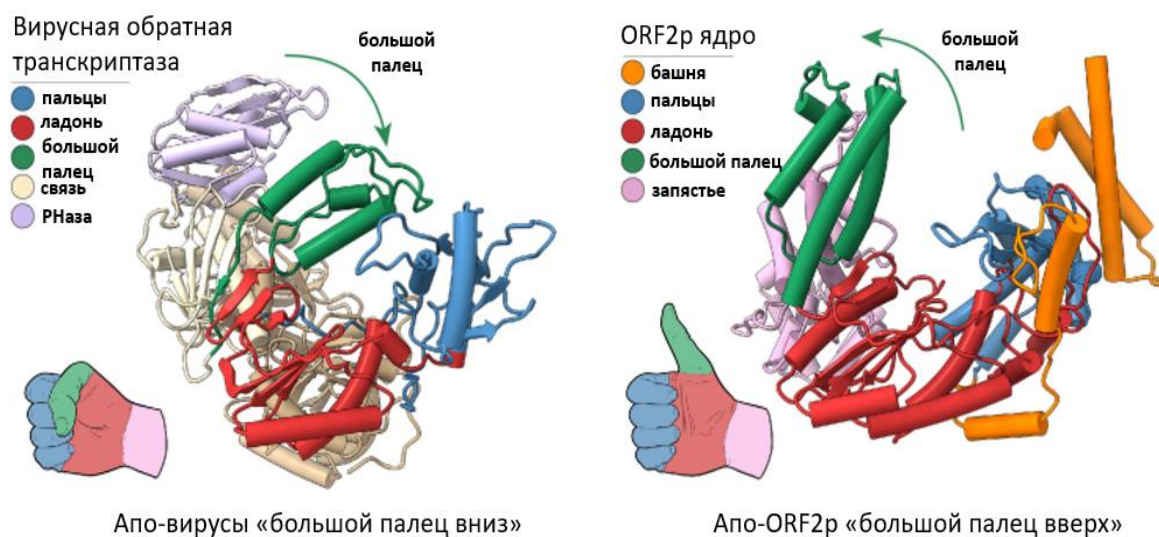


Рисунок 5.4 – Структуры апо-формы вирусных обратных транскриптаз и ORF2p. Обычно апо-формы вирусных обратных транскриптаз находят в положении «большой палец вниз» конформации, а у ORF2p апо-форма – «большой палец вверх». Иллюстрации взяты из [291]

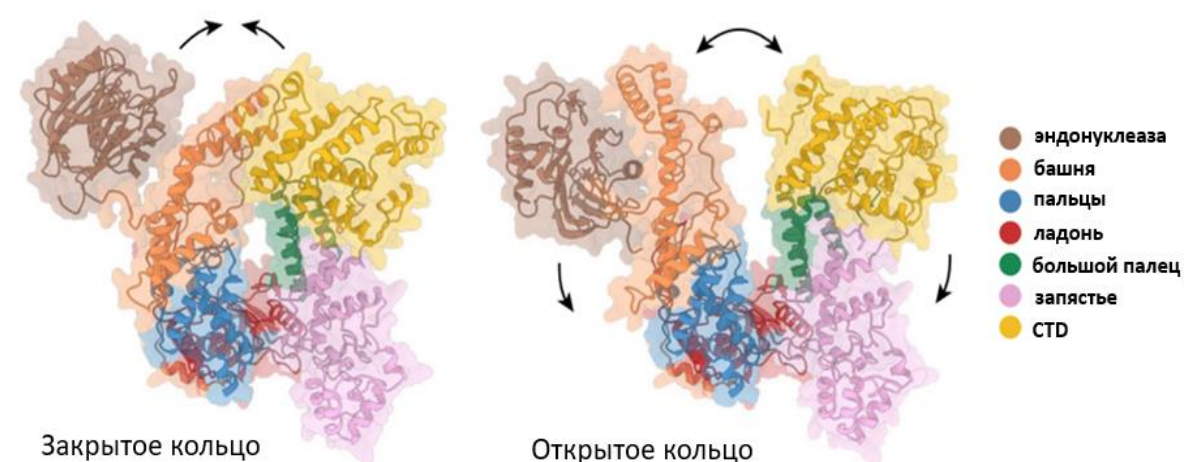


Рисунок 5.5 – Структуры «закрытое кольцо» и «открытое кольцо» ORF2p. Иллюстрации взяты из [291]

Белок ORF2p содержит в N-концевой части APE-подобную эндонуклеазу [307] и является первым ретротранспозоном этого типа, который был структурно

охарактеризован; другие классы ретротранспозонов, не являющихся LTR, имеют С-концевые рестриктазы, подобные эндонуклеазам [308]. Домен башни (239–440) соответствует области между доменами эндонуклеазы и обратной транскриптазы и состоит из четырех ключевых компонентов: (1) базовая пластина (остатки 254–300), (2) выступающие башенные спирали (остатки 301–370), (3) последующий замок башни (остатки 374–382) и (4) спираль РІР-бокса (белок, взаимодействующий с ядерным антигеном пролиферирующих клеток (PCNA), остатки 404–419), и охватывает области, ранее называвшиеся «криптическими» или «пустынными» [309]. Поиски структурного подобия не показали значительного сходства с другими белками.

Имеющаяся в банке данных белковых структур Protein Data Bank экспериментальная кристаллографическая структура ORF2p (PDB 8C8J) представляет собой тройной комплекс ORF2p с тимидинтрифосфатом (ТТФ) и двойной цепочки РНК матрицы (из 12 остатков) и ДНК праймера (из 9 остатков). При этом в самом ферменте ORF2p из семи доменом присутствуют только 5 основных доменов ORF2p, два из которых («башня» и «запястье») разрешены не полностью. Остаток цистеина в 661 положении модифицирован и находится в форме S-оксицистеина. Поэтому для полноатомного моделирования необходимо дотраивать имеющуюся структуру.

Данные экспериментов по криоэлектронной микроскопии аналогичного тройного комплекса ORF2p доступны в репозитории ModelArchive. Там имеются 5 различных структур, отличающихся как положением подвижных концевых EN и CTD доменов, так и положением различных частей консервативной части обратной транскриптазы (доменов «пальцы», «ладонь», «большой палец»). Наиболее интересными среди них являются структуры «открытого кольца» (CTD и EN домены находятся на максимальном расстоянии друг относительно друга, а две спирали подвижной части домена «башня» находятся близко к EN домену), а также «замкнутого кольца» (с минимальным расстоянием между CTD доменом и петлей между двумя спиралями подвижной части домена «башня»). Фрагменты данных структур будут использованы для получения полноатомных моделей комплексов ORF2p различной степени сложности.

В качестве начального приближения для построения полноатомных моделей комплексов фермента ORF2p была использована кристаллографическая структура (PDB ID: 8C8J) тройного комплекса ORF2p с тимидинтрифосфатом (ТТФ) и гетеродуплексом РНК и ДНК. Неразрешенные в рентгеноструктурном анализе части белка, такие как EN и CTD домены, а также части доменов Башня и Запястье, были добавлены на основе результатов криоэлектронной микроскопии, доступных в репозитории ModelArchive. Неразрешенные фрагменты были добавлены таким образом, чтобы получить конформации «замкнутого кольца» и «открытого кольца», характеризующиеся минимальным и максимальным расстоянием между доменами CTD и Башня соответственно. Недостающие атомы водорода были добавлены в модель с помощью программы Reduce таким образом, чтобы получить нейтральный pH. В таком случае аминокислотные остатки аргининов (Arg) и лизинов (Lys) были заряжены положительно; остатки глутаминовых (Glu) и аспарагиновых (Asp) кислот – заряжены отрицательно; остатки гистидинов (His) имели нейтральный заряд. Таким образом были получены полноатомные модели комплексов фермента ORF2p с тимидинтрифосфатом и РНК-ДНК гетеродуплексом в конформациях «замкнутого кольца» (далее будет называться «закрытая форма») и «открытого кольца» (далее будет называться «открытая форма») для соответствующих условий кислотности среды.

На основе полученных полноатомных моделей закрытой и открытой форм комплексов были построены модели комплексов ORF2p разной степени сложности. ДНК-комплексы ORF2p закрытой и открытой форм были получены из соответствующих тройных комплексов путем удаления нуклеозида ТТФ. Затем были получены РНК-комплексы ORF2p содержащие только РНК-матрицу и фермент. Наиболее простыми моделями являются апо-формы ORF2p в закрытой и открытой конформации. Все восемь полученных модельных систем были сольватированы в ячейке воды, таким образом чтобы расстояние от атомов комплекса до границ ячейки в виде прямоугольного параллелепипеда всегда превышало 10 Å. В полученные сольватированные системы были добавлены противоионы для нейтрализации общего заряда системы. Размер всех 8 систем оказался примерно равным и составил $131 \times 160 \times 146 \text{ Å}^3$. Тройные комплексы, ДНК-комплексы, РНК-комплексы и апо-формы ORF2p содержали 283160, 283110, 282804

и 282396 атомов, соответственно. Данные полноатомные модели прошли последующую подготовку к молекулярному моделированию посредством классической молекулярной динамики.

Для описания наших моделей было использовано полноатомное силовое поле CHARMM36. Все атомы фермента, атомы цепочек РНК и ДНК, тимидинтрифосфат и ион магния описывались данным силовым полем. Для молекул воды использовалось силовое поле TIP3P. Вся подготовка модельных систем проводилась с использованием программы VMD.

5.3. Результаты расчётов классических молекулярно-динамических траекторий для выбранной модели ORF2p

Для проведения классической молекулярной динамики использовалась программа NAMD 3.0, умеющая работать не только на центральных процессорах, но и на графических ускорителях. Расчёты проводили в каноническом NPT ансамбле при температуре 298 К и давлении 1 атм, которые поддерживались постоянными с помощью термостата Ланжевена и баростата Нозе-Гувера. Для проведения расчётов со столь масштабными моделями шаг интегрирования взяли равным $\Delta t = 2$ фс, а на связи атомов водорода в молекулах воды было наложено ограничение по алгоритму SHAKE/SETTLE. Радиус обрезки электростатических и ван-дер-ваальсовых взаимодействий составлял 12 Å с переключением на функцию сглаживания при 10 Å.

Подготовка моделей комплексов ORF2p различной степени сложности к дальнейшему молекулярному моделированию состояла из двух этапов. На первом этапе происходила релаксация сольватной оболочки. Для этого сначала запускался процесс спуска по энергетической поверхности к ближайшему локальному минимуму (минимизация) с помощью метода градиентного спуска на 1000 шагов. Затем проводилось молекулярно-динамическое моделирование с фиксированными атомами белка, цепочек ДНК и РНК, атомами тимидинтрифосфата длиной 2 нс. За это время молекулы воды сольватной оболочки подстраивались под структуру комплекса, а также взаимодействовали между собой, а общее RMSD сольватной оболочки выходило на плато.

На втором этапе проводилась общая релаксация всей системы. Для этого проводилось молекулярно-динамическое моделирование длиной 5 нс без фиксации каких-либо атомов. Но для исключения поступательного движения системы в ячейке на C_{α} атомы белка и атомы фосфора в цепочках ДНК/РНК были добавлены незначительные гармонические потенциалы с константой жесткости $0.1 \text{ ккал/\AA}^2$, которые не мешают релаксации системы. За время подготовки структуры к моделированию конформационный состав исследуемых комплексов не изменился.

Важно отметить, что структура полноразмерного белка ORF2p была получена [291] из экспериментальных данных рентгеноструктурного анализа, а также криоэлектронной микроскопии с применением методов молекулярного моделирования, включая метод молекулярной динамики и построения полноатомных моделей с использованием программы AlphaFold2. Такое поэтапное построение трехмерного комплекса должно быть впоследствии валидировано, для чего и были в нашей работе рассчитаны продолжительные траектории, с анализом стабильности отдельных структурных элементов путем расчета среднеквадратичного отклонения тяжелых атомов по траектории.

Отметим, что во всех полученных моделях, включая апоформы ORF2p консервативные домены обратной транскриптазы («пальцы», «ладонь», «большой палец») находятся в конформации «большой палец вверх», что важно для последующего моделирования.

Затем был выполнен расчет МД траектории в 500 нс. МД траектории всех 4 комплексов (тройной комплекс, комплекс ДНК, комплекс РНК и апо-форма ORF2p) были подготовлены к анализу путем извлечения только тяжелых (неводородных) атомов белка. После извлечения координат тяжелых атомов белка из всех траекторий набор данных состоял в общей сложности из более чем 61 000 кадров. Этот объем данных трудно визуализировать и анализировать без привлечения дополнительных инструментов. Только по визуальной инспекции полученных молекулярно-динамических траекторий можно заметить, что домены «пальцы», «ладонь» и «большой палец» остаются в довольно фиксированном положении, в то время как домены EN, «башня», «запястье» и CTD достаточно подвижны и претерпевают несколько конформационных перестроек. Чтобы определить и количественно оценить их, было принято решение обратиться к методам машинного

обучения и проанализировать все наборы кадров МД с их помощью. Для первичного анализа RMSD белка и кластеризации полученных данных использовались программные пакеты TtClust и MDTraj.

Структуры ORF2p, полученные в разных молекулярно-динамических моделированиях, были выравнены по ядру «пальцы»-«ладонь»-«большой палец» (FPT-ядро) и для них по-отдельности были вычислены значения RMSD доменов, чтобы оценить их гибкость и подвижность (таблица 5.1).

Таблица 5.1. Среднеквадратичное отклонение RMSD (в ангстремах), рассчитанное по МД траекториям, средние значения и стандартное отклонение (в скобках). МД траектории были выровнены по атомам белкового остова FPT-ядра, либо по исходной структуре, либо по средней структуре

	Тип системы	открытая		закрытая	
	Референс	Кадр 0	Средняя структура	Кадр 0	Средняя структура
Домен	EN	25.7(13.2)	21.5(8.1)	34.0(17.9)	21.4(10.8)
	Башня	10.7(2.4)	9.4(2.0)	9.1(2.4)	6.9(1.7)
	FPT-ядро	2.8(0.6)	2.2(0.5)	3.3(0.7)	2.3(0.5)
	Запястье	8.7(2.5)	5.3(1.7)	8.3(2.2)	7.0(2.7)
	CTD	19.8(9.1)	17.7(8.4)	21.6(12.0)	16.0(9.0)

Расчетные значения RMSD показывают, что в то время как FPT-ядро во всех комплексах является жестким, соседние и тесно связанные домены «башня» и «запястье» демонстрируют выраженные флуктуации. Домены EN и CTD более подвижны из-за трансляционных и вращательных степеней свободы. Колебания доменов уменьшаются в ряду: EN – CTD – «башня» – «запястье» – FPT-ядро. Развертки RMSD по времени для каждого домена в отдельности представлены на рисунке 5.6.

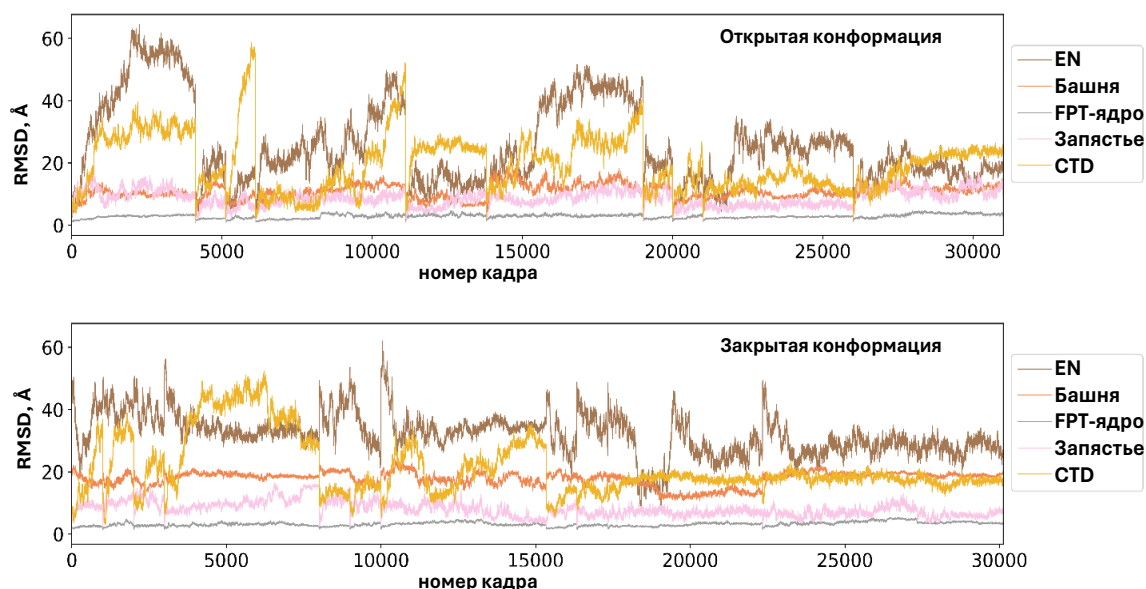


Рисунок 5.6 – Развертка по времени среднеквадратичных отклонений отдельных доменов при выравнивании по ядру «пальцы»-«ладонь»-«большой палец» (FPT-ядро)

Наиболее интересными являются конформации комплекса, в которых домены CTD и «башня» взаимодействуют между собой (открытые конформации). При визуальном осмотре молекулярно-динамических траекторий выяснилось, что эти домены могут иметь различную ориентацию относительно друг друга (рисунок 5.7).

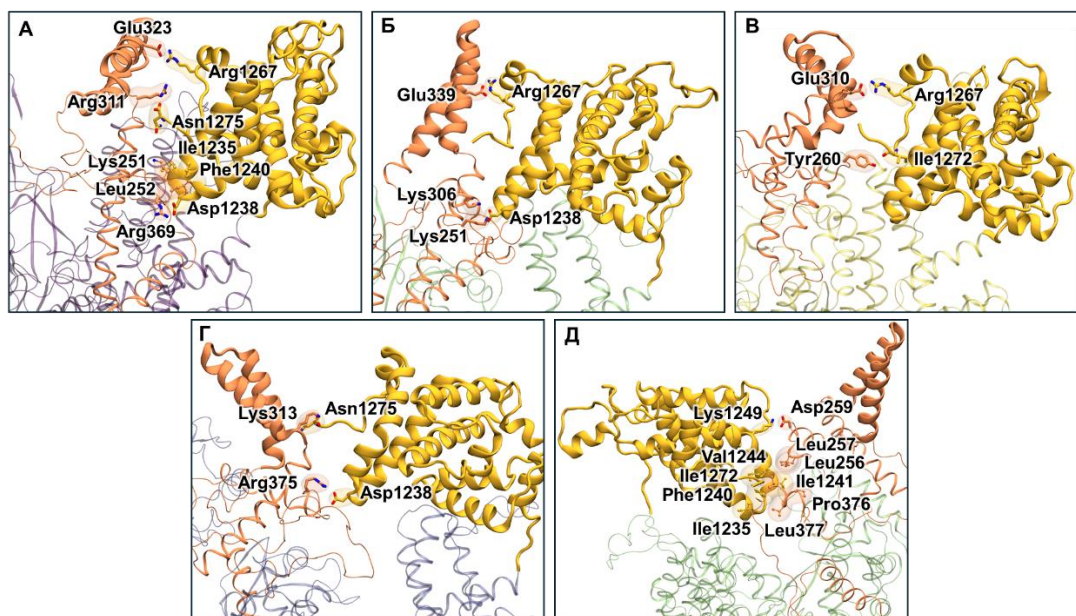


Рисунок 5.7 – Аминокислотные остатки, участвующие в междоменных взаимодействиях доменов «башня» (оранжевый) и CTD (желтый) в различных близких взаимных расположениях доменов. (А), (Б), (В) - репрезентативные кадры из траекторий, стартовавших с конформации «закрытое кольцо», (Г), (Д) - репрезентативные кадры из траекторий, стартовавших с конформации «открытое кольцо»

В траекториях, стартовавших с «закрытых» конформаций комплекса, встречаются кадры, в которых двойная спираль домена «башня» расположена вдоль CTD домена, но данное взаимодействие может происходить за счет разных аминокислотных остатков (рисунок 5.7 А, Б). Этому могут способствовать только солевые мостики Lys251-Asp1238, Lys306-Asp1238 и Glu339-Arg1267 (рисунок 5.7Б) или солевые мостики Arg311-Asn1275, Glu323-Arg1267, Arg369-Asp1238, вместе с гидрофобными взаимодействиями между Lys251, Leu252, Ile1235 и Phe1240 (рисунок 5.7А). Также существуют конформации в которых CTD в основном взаимодействует с доменом «большой палец», всего лишь касаясь домена «башня» у основания шпильки через солевой мостик Glu310-Arg1267 и водородную связь между Ile1272 и Tyr260 (рисунок 5.7В).

В траекториях, стартовавших с «открытой» системы, есть конформации (рисунок 5.7Г) имеющие некоторое сходство с конформациями «закрытой» структуры (рисунок 5.7В). Домен CTD контактирует с основанием шпильки домена «башня», но разными контактами: Lys313-Asn1275 и Arg375-Asp1238. В других конформациях «открытой» динамики с короткими расстояниями между CTD и доменом «башня» на самом деле домен CTD в основном взаимодействует с доменом «пальцы» и отличным от шпильки фрагментом домена «башня» (рисунок 5.7Д). Взаимодействие между ними поддерживается солевым мостиком Asp259-Lys1249 и гидрофобными взаимодействиями между Leu256, Leu257, Leu377, Leu380, Pro376, Ile1235, Phe1240, Ile1241, Val1244, Ile1272.

Подвижность CTD домена и его взаимодействие с доменом «башня» может играть важную роль для биологической активности всего комплекса ORF2p, поскольку домен CTD при близком взаимодействии с доменом «башня» в некоторых конформациях закрывает вход в активный центр обратной транскриптазы.

5.4. Заключение к Разделу 5

Согласно п. 4.5 ТЗ работы по п.1.5 ПГ включали:

1. Работы «Анализ литературы и имеющихся экспериментальных данных по трехмерным структурам белков/белковых комплексов (данные РСА, 3D ЯМР, крио-ЭМ) для последующего использования при создании полноатомных трехмерных моделей для дальнейшего молекулярного моделирования» описаны в подразделах 5.1.
5. Работы «Подготовка молекулярных моделей, проведение тестовых расчётов методом классической молекулярной динамики» описаны в подразделах 5.2.

Согласно п .5.5 ТЗ выполнены следующие требования:

1. При поиске трехмерных структур использованы только экспериментальные данные (см. подраздел 5.2).
6. Депонированные трехмерные структуры, полученные с помощью AlphaFold2, валидированы (см. подраздел 5.3).
7. Получаемые модельные структуры собраны для соответствующих условий кислотности среды, при которых планируется проведение последующих экспериментов (см. подраздел 5.2).

Результаты работы опубликованы: Anna M. Kulakova, Maria G. Khrenova, Maria I. Zvereva, Igor V. Polyakov, “Domain mobility in the ORF2p complex revealed by molecular dynamics simulations and big data analysis” International Journal of Molecular Sciences, 2025, 26(1), 73 <https://doi.org/10.3390/ijms26010073>. <https://www.mdpi.com/1422-0067/26/1/73>. Публикация №11 в составе пакета отчетной документации.

6. ФОРМИРОВАНИЕ НАБОРОВ ДАННЫХ ПО ИЗВЕСТНЫМ ГЕРОПРОТЕКТОРАМ, ПОСТРОЕНИЕ МОДЕЛЕЙ ЗАВИСИМОСТЕЙ «СТРУКТУРА - ГЕРОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ» НА ОСНОВЕ МЕТОДОВ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ И ИХ ВАЛИДАЦИЯ

Старение организма – природный биологический феномен. Его основные патологические механизмы прослеживаются на всех уровнях организации живого [310]. Постоянство и многообразие процессов, выстроенных в систему генетических, биохимических, патофизиологических и социальных закономерностей, побуждают к осознанию значимости и исследованию возможностей влияния на этот процесс.

В опубликованной более ста лет назад работе «Этюды о природе человека» И. И. Мечников обосновал неизбежность борьбы со старением и сопутствующими ему заболеваниями: «Человечество не могло ждать научного выяснения дисгармоний нашей природы для борьбы с ними. Желание жить, сохранить здоровье, удовлетворять инстинктам и согласовать их, с самых ранних ступеней сознательной жизни заставляло человека придумывать различные средства для устранения несовершенств своей природы» (цит. по [310]).

В современной трактовке старение определяют как «совокупность возрастных изменений организма, ведущих к снижению его жизнеспособности и увеличению вероятности смерти» [311]. Под геропротекторами понимают «вещества, которые замедляют процесс старения и могут быть использованы в профилактике возраст-зависимых заболеваний» [312].

Критерием, позволяющим отнести то или иное вещество к геропротекторам, является наличие одного или нескольких свойств [313]:

- Увеличение продолжительности жизни.
- Обращение процессов, связанных с возрастными заболеваниями.
- Положительное влияние на биомаркеры старения человека.
- Отсутствие выраженных побочных эффектов.
- Улучшение качества жизни.

Необходимо подчеркнуть, что в настоящее время нет ни одного лекарственного препарата, показанием к медицинскому применению которого является геропротекция [314]. Сложность организации, высокая стоимость и

большая длительность проведения клинических испытаний геропротекторов [315] существенно снижают заинтересованность фармацевтических компаний к такого рода деятельности. Дополнительные ограничения в формировании однородных когорт пациентов для проведения клинических испытаний могут быть связаны с популяционной вариабельностью скорости старения различных органов и тканей у разных индивидов [316–318].

Исследования влияния потенциальных геропротекторов на увеличение продолжительности жизни проводятся на модельных организмах, включая дрозофил, нематод, дрожжи и др. [319]. Трансляция полученных на беспозвоночных организмах результатов на человека не вполне адекватна; рекомендуется предварительно подтвердить сделанные заключения на позвоночных, в частности, на собаках [320].

Хотя из вышеизложенного материала вытекает наличие серьезных проблем в исследовании потенциальных геропротекторов, эта область интенсивно развивается, что видно из соответствующей статистики работ, индексируемых информационной системой PubMed [321] (рисунок 6.1).

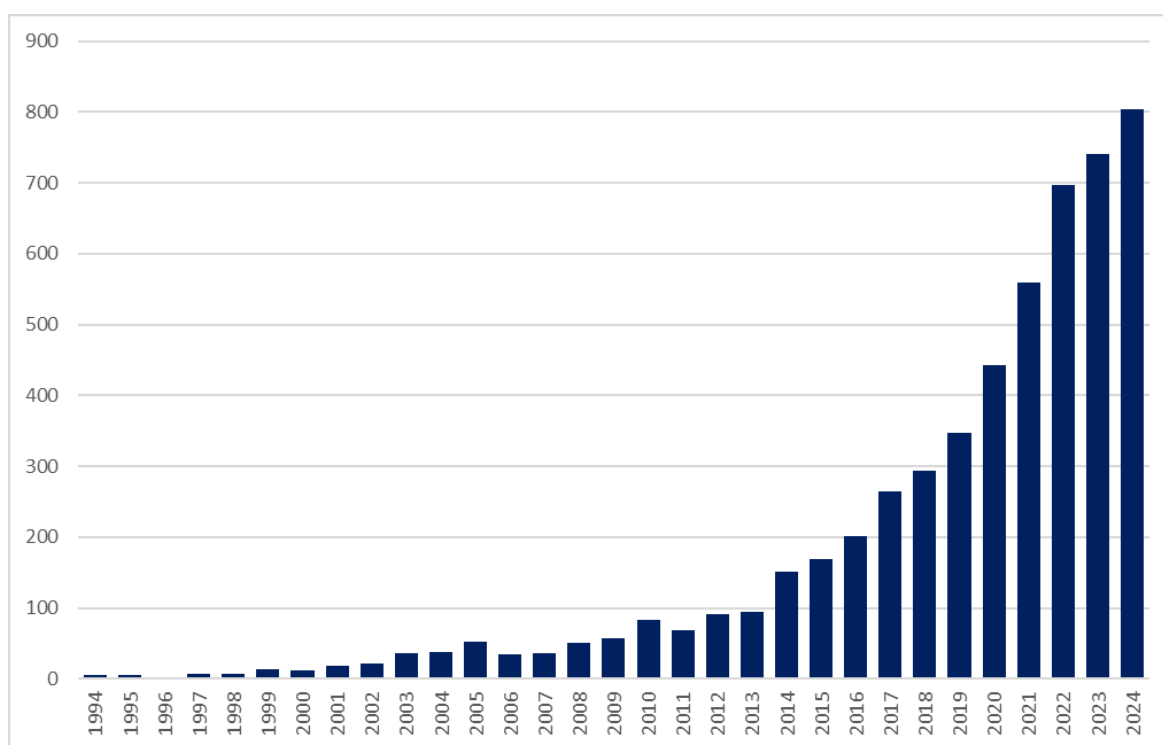


Рисунок 6.1 – Рост числа публикаций по тематике геропротекторов в информационной системе PubMed за 1994-2024 гг. (запрос “geroprotector OR antiaging medicine”)

Полученные в ходе научных исследований данные агрегируются в специализированных базах данных [322,323]. Для поиска новых потенциальных геропротекторов применяют компьютерные методы, основанные на построении моделей зависимостей «структура-активность» методами машинного обучения [324–326], молекулярного докинга [327,328], сетевой фармакологии [329,330] или комбинации различных методов *in silico* [331,332].

Более чем тридцатилетний опыт сотрудников лаборатории структурно-функционального конструирования лекарств Института биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича по разработке и практическому применению методов компьютерного конструирования лекарств [333–350] позволяет осуществить построение обладающих определенной предсказательной способностью моделей зависимостей «структура – геропротекторная активность», и провести с использованием этих моделей поиск новых потенциальных геропротекторов.

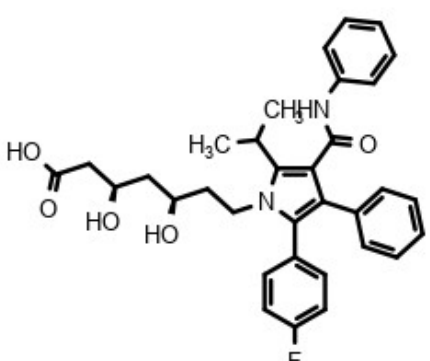
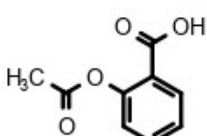
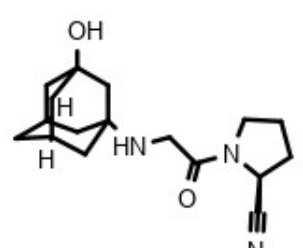
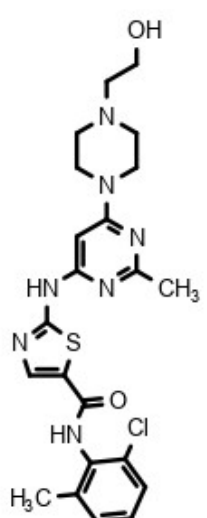
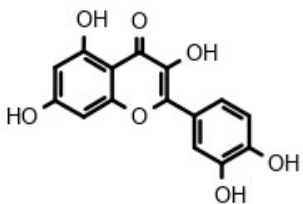
Для построения этих моделей и их валидации необходимо формирование обучающих выборок, содержащих информацию о структуре и геропротекторной активности соединений, подтвержденной в эксперименте. Данные для построения моделей отобраны из опубликованных в научных журналах статей и БД, с учетом особенностей экспериментов, в которых эти данные были получены (Согласно п 5.6 ТЗ)

6.1. Формирование наборов данных по известным геропротекторам

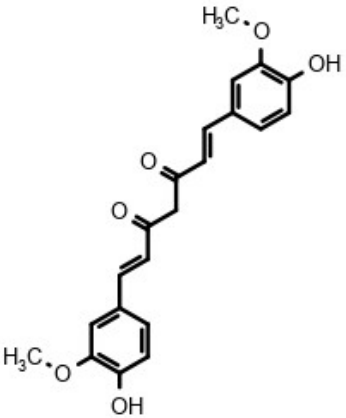
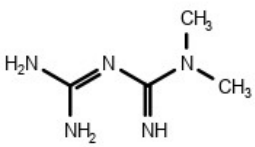
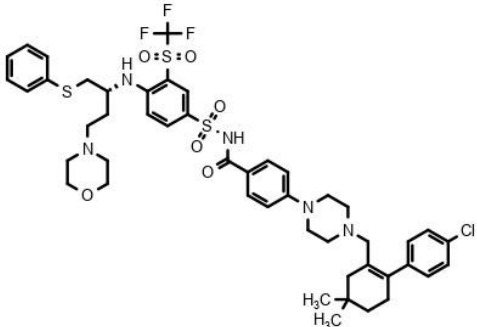
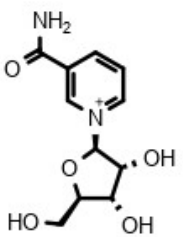
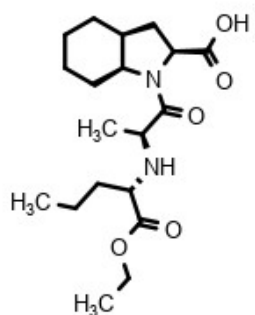
6.1.1. Выборка референтных соединений

Как уже упоминалось выше, в настоящее время нет ни одного лекарственного препарата, который был бы разрешен к медицинскому применению как геропротектор. Анализ литературы показал, что имеется ряд препаратов, удовлетворяющих упомянутым выше критериям отнесения к потенциальным геропротекторам, часть из которых изучается в клинике с целью терапии возраст-ассоциированных заболеваний [314,351–357]. Информация об этих фармакологических веществах приведена в таблице 6.1.

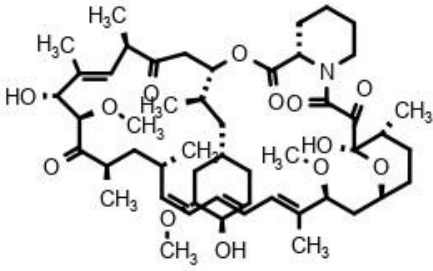
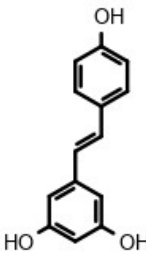
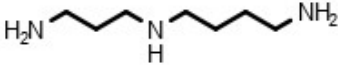
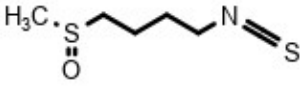
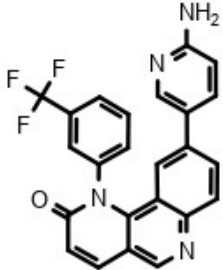
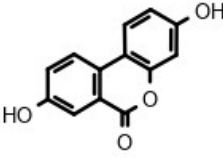
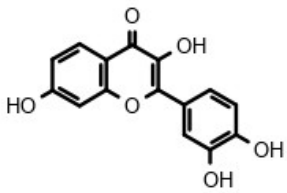
Таблица 6.1 – Примеры потенциальных геропротекторов

Название	Структурная формула	Механизм действия	Ссылка
Аторвастатин, Atorvastatin		Действие на сенесцентные клетки, ингибирование экспрессии CDKN2A	[358]
Ацетилсалицилов ая кислота, Acetylsalicylic acid		Действие на сенесцентные клетки, ингибирование экспрессии CDKN2A	[358]
Вилдаглиптин, Vildagliptin		Снижение скорости сенесценции, вызванной стрессом	[359]
Дазатиниб, Dasatinib		Действие на сенесцентные клетки, ингибирование PI3K	[355]
Кверцетин, Quercetin		Действие на сенесцентные клетки, ингибирование PI3K	[355]

Продолжение таблицы 6.1

Название	Структурная формула	Механизм действия	Ссылка
Куркумин, Curcumin		Ингибитор DNMT1, DNMT3B, HATs, HDAC2 и HDAC8	[360]
Метформин, Metformin		Аутофагия, митохондриальны й биогенез	[355]
Навитоклак, Navitoclax		Действие на сенесцентные клетки, ингибирование Bcl-2 и Bcl-xl	[361]
Никотинамид рибозид, Nicotinamide riboside		Восполнение дефицита NAD ⁺	[362]
Периндоприл, Perindopril		NA	[363]

Продолжение таблицы 6.1

Рапамицин, Rapamycin		Действие на сенесцентные клетки, ингибитор mTOR	[355]
Ресвератрол, Resveratrol		Уменьшение окислительного стресса, противовоспалите льное действие, улучшение функции митохондрий, регуляция апоптоза	[364]
Спермидин, Spermidine		Индуктор аутофагии	[365]
Сульфوران, Sulforaphane		Антиоксидантное и противовоспалите льное действие, активация протеасомы, ингибитор	[366]
Торин 2, Torin 2		Ингибитор TORC1 и TORC2	[367]
Уролитин А, Urolithin A		Митофагия	[368]
Физетин, Fisetin		Действие на сенесцентные клетки, ингибирование PI3K	[369]

Примечание. NA – требует уточнения.

Как видно из приведенных в таблице 6.1 данных, потенциальными геропротекторами являются соединения, относящиеся к различным химическим классам и проявляющие разные виды биологической активности. Более того, они вызывают плеiotропные фармакологические эффекты, что создает предпосылки для мультитаргетного действия на молекулярные мишени и модуляцию нескольких регуляторных сигнальных путей одновременно. Учитывая многообразие процессов, ассоциированных со старением, именно такие вещества могут проявлять геропротекторные эффекты.

В то же время, понятно, что необходим тщательный индивидуализированный подход к отбору референтных соединений, как при ретроспективной валидации построенных моделей (Q)SAR, так и в качестве положительного контроля при проведении лабораторных экспериментов.

6.1.2. Подготовка обучающей выборки на основе информации из базы данных DrugAge

Как упоминалось выше, информация о потенциальных геропротекторах аккумулирована в базах данных (БД) Geroprotectors [322] и DrugAge [323]. Как показал проведенный нами анализ, данные из БД Geroprotectors.org [370] практически без исключения входят в БД DrugAge [371], поэтому в дальнейшем мы использовали данные из DrugAge. БД DrugAge агрегирует данные по лекарствам, фармакологическим веществам и пищевым добавкам, которые были исследованы на продление продолжительности жизни у модельных организмов. Эти сведения были собраны из различных научных публикаций, и на 29.11.2024 г. БД DrugAge содержит 3 423 записи. Информация охватывает данные по 2 363 исследованиям, в которых изучалось увеличение продолжительности жизни (LifeSpan); 879 исследований, в которых изучалось снижение продолжительности жизни; общее число исследованных препаратов – 1 046; различных модельных объектов (species) – 35; общее число ссылок на литературу – 663.

Объекты DrugAge представлены наименованиями субстанций и величинами изменений LifeSpan различных модельных организмов. Лишь часть записей соответствует индивидуальным химическим соединениям с установленной структурной формулой (рисунок 6.2).

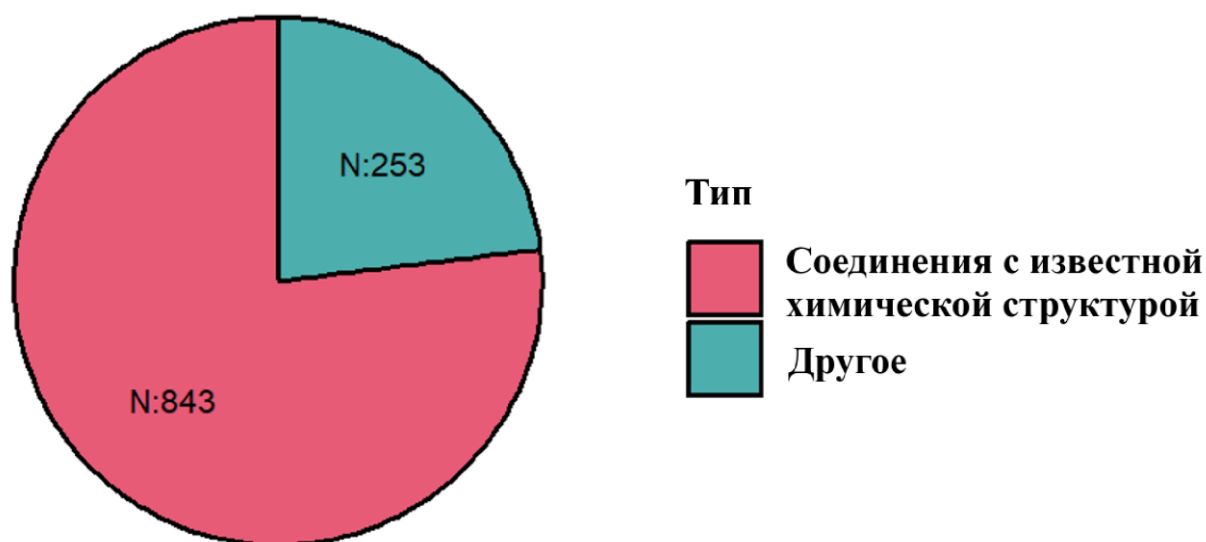


Рисунок 6.2 – Химические соединения, информация о наименованиях которых представлена в БД DrugAge

Нами были восстановлены 843 структурные формулы по наименованиям малых молекул, сведения о которых содержится в БД DrugAge; остальные 253 объекта представлены либо экстрактами, либо высокомолекулярными соединениями (в частности, белками). Анализ показал, что в некоторых соединениях содержатся атомы, редко встречаемые в фармацевтических субстанциях лекарственных препаратов: Li, Be, Al, Si, Ti, V, Fe, Ni, As, Ba, W, Pt, Hg, Pb. Среди восстановленных структур имеются токсичные вещества, соли, смеси и другие соединения, не удовлетворяющие современным ограничениям на включение в обучающие выборки с целью построения моделей (Q)SAR [372].

Экспериментальные данные представлены 3 270 записями; при этом, лишь для 3 229 записей имеются сведения об изменении характеристики LifeSpan. Основное число всех записей относится к *C. Elegans* и *D. melanogaster*. Данные о положительном изменении LifeSpan могут быть рассмотрены как свидетельствующие о наличии геропротекторной активности; соединения, для которых имеются данные об отрицательном изменении LifeSpan, рассматриваются как токсичные, геропротекторной активностью не обладающие.

Каждой записи соответствует уровень значимости исследованного результата, оценка которого получена так, как это описано в работе [371].

Данные об отнесении конкретного соединения к потенциальным геропротекторам различаются для разных модельных организмов. Также значительно различаются полученные распределения изменений величин LifeSpan

для различных модельных организмов, что обусловлено различиями в подходах к изучению геропротекторной активности (рисунок 6.3). Анализ соответствующих распределений указывает на невозможность построения количественных моделей на обобщенных данных, из-за высокой вариабельности значений изменения величин LifeSpan для различных модельных организмов. Поэтому мы использовали эти данные для построения классификационных моделей с учетом выбранного порога по величине активности.

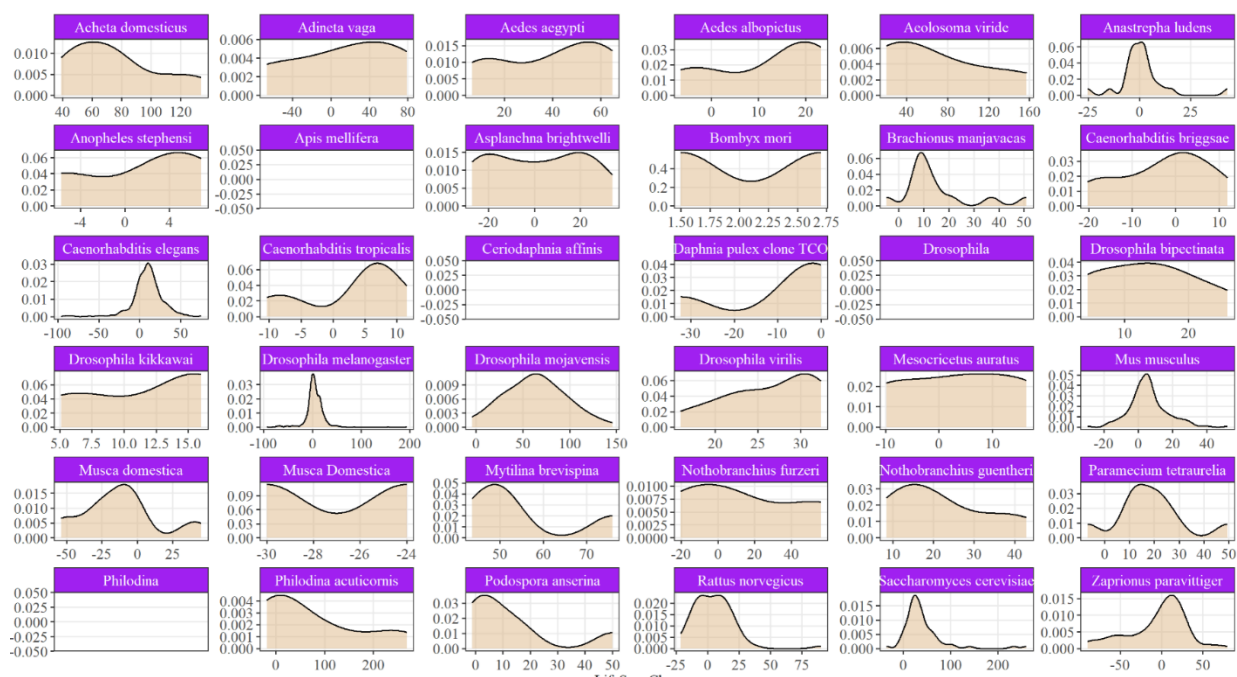


Рисунок 6.3 – Распределения значений изменения LifeSpan для различных модельных организмов

Кроме того, определенными ограничениями для практического использования данных, представленных в DrugAge, являются: (1) очень высокое химическое разнообразие структур в выборке (наличие экзотических атомов, редких подструктур, широкий разброс молекулярных масс); (2) отсутствие сведений о механизмах действия (возможно, эти сведения представлены в первичных публикациях); (3) неоднозначная трактовка дозировки из-за различия экспериментальных процедур при исследованиях на разных модельных организмах.

Согласно п.5.6 ТЗ выполнена предобработка информации по структуре и биологической активности согласно широко применяемым при моделировании Q(SAR) требованиям. С учетом отмеченной выше вариабельности экспериментальных значений из БД DrugAge, характеризующих геропротекторную

активность, они были преобразованы для последующего построения классификационных моделей.

Пошаговая процедура формирования обучающей выборки представлена ниже.

1. Восстановлены химические структуры для записей, для которых такое восстановление было возможно. Наименования соединений проверялись по данным, содержащимся в базе данных PubChem, в случае отсутствия – по другим источникам, содержащим информацию о коммерчески доступных химических соединениях.

2. В выборку отбирались только те соединения, для которых было возможно однозначно определить химический компонент, связанный с активностью.

3. В качестве экспериментальных данных об активности была использована величина изменения LifeSpan (в процентах).

4. Изменения величин LifeSpan учитывались в обучающей выборке для каждого модельного организма.

5. Значения изменения LifeSpan усреднялись, если они относились к одному химическому веществу и были измерены для одного и того же модельного организма.

6. Значения изменения LifeSpan были классифицированы как имеющие геропротекторную активность, так и не обладающие этой активностью.

7. В качестве порога классификации принято значение изменения LifeSpan, равное 5%, из-за высоких стандартных отклонений экспериментальных значений, составляющих в среднем ~5%.

8. Были удалены структуры, не соответствующие критериям построения моделей с использованием компьютерной программы PASS [335].

9. Если соединение было классифицировано как геропротектор хотя бы для одного модельного организма, ему присваивалась обобщенная категория активности «Geroprotector (All studies)».

В результате применения вышеописанной процедуры была получена обучающая выборка, содержащая информацию о 827 уникальных структурах и 999 ассоциированных записях о геропротекторной активности. Геропротекторная активность была классифицирована как по отношению к каждому модельному

организму, например, «Geroprotector (*Caenorhabditis elegans*)», так и в обобщенном виде – «Geroprotector (All studies)». При этом механизмы геропротекторного действия не определены, поскольку эта информация отсутствовала в БД DrugAge.

6.1.3. Подготовка обучающей выборки на основе информации о сенолитиках

На основании агрегированных данных, извлеченных нами из дополнительных материалов к публикации [326], была сформирована обучающая выборка, содержащая 2 342 соединения, для построения моделей зависимости «структура – сенолитическая активность». В данном случае химические структуры были представлены строками SMILES, что не потребовало дальнейшей обработки. Высокое химическое разнообразие структур отражено наличием атомов, редко встречающихся в фармацевтических субстанциях лекарственных препаратов: Li, Al, Fe, Co, As, Sb, Gd, Pt, Hg, Pb, Bi.

Экспериментальные данные, характеризующие величину сенолитической активности, были представлены значениями выживаемости клеток, полученными при 1 микромолярной (мкМ) концентрации и при 10 мкМ концентрации изучаемых соединений.

При 1 и 10 мкМ концентрациях вещества оценивались выживаемость клеток под воздействием препарата (опыт) V_S и выживаемость клеток без воздействия препарата V_C (контроль). Считали, что соединение обладает сенолитической активностью, если: (1) выживаемость под воздействием препарата $V_S < 0,7$; (2) выживаемость в контроле $V_C > 0,5$; (3) соотношение $\frac{V_S}{V_C} < 0,7$ (рисунок 6.4).

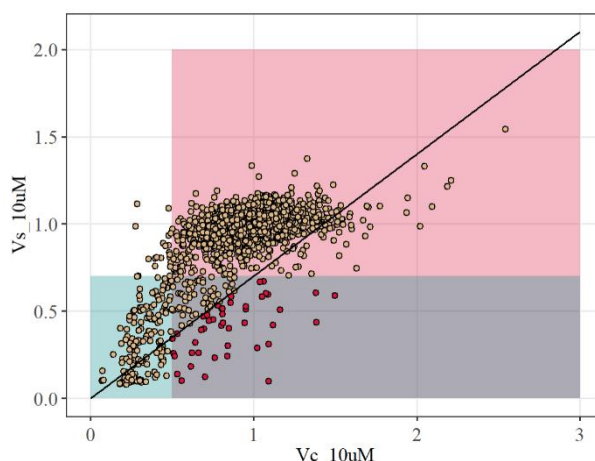


Рисунок 6.4 – Классификация активности сенолитиков. Красным показаны активные сенолитики, желтым неактивные. Красная область соответствует порогу $V_c > 0,5$, голубая $V_s < 0,7$, прямая граница соответствует порогу $\frac{V_s}{V_c} < 0,7$

При обработке данных было выявлено и удалено 4 дубликата. При пороге 10 мкМ 45 соединений считаются активными, при пороге 1 мкМ - только 6. Для построения классификационной модели использовалась выборка, содержащая данные об активных соединениях при пороге 10 мкМ, аналогично тому, как это было сделано в работе [326].

Также на основе данных из дополнительных материалов к публикации [326] нами сформирована тестовая выборка, содержащая 268 соединений, не входящих в обучающую выборку, которая содержала 25 известных сенолитиков. Эта выборка была использована для оценки прогностической способности построенных моделей (Q)SAR.

6.2. Построение моделей (Q)SAR на основе обучающей выборки по геропротекторной активности для модельных организмов

Классификационные модели были построены с использованием компьютерной программы PASS на основе подготовленной нами обучающей выборки из базы данных DrugAge (см. раздел 6.1.2).

Информация для 715 удовлетворяющих необходимым критериям уникальных соединений из обучающей выборки была введена в программу PASS [335] и могла быть использована для построения моделей (Q)SAR.

Согласно п. 5.6 ТЗ при построении моделей были сопоставлены результаты применения разных методов и отобраны лучшие модели для конкретных видов

геропротекторной активности. Качество моделей оценивали по значению инвариантной точности прогноза (IAP – Invariant Accuracy of Prediction), которая рассчитывалась в ходе обучения при скользящем контроле с исключением по одному. Для 10 видов геропротекторной активности (9 – для модельных организмов и 1 – обобщенная активность) среднее значение IAP составило 0,7624.

Ранее [335] нами было установлено, что расширение обучающей выборки за счет добавления в нее условно неактивных соединений позволяет повысить точность и предсказательную способность прогноза. Поэтому мы добавили в обучающую выборку около одного миллиона соединений, случайным образом извлеченных из PubChem [350], и повторили процедуру обучения. Число уникальных соединений в базе знаний SAR Base составило 1 052 722, среднее значение IAP для 12 видов активности составило 0,9028. Предсказательную точность построенных моделей (Q)SAR оценивали при перекрестном контроле с разбиением выборки на 20 частей (20-Fold IAP); среднее значение 20-Fold IAP составило 0,9011. Характеристики для всех построенных моделей приведены в таблице 6.2.

Таблица 6.2 – Характеристики моделей зависимостей «структура – геропротекторная активность», построенных на основе информации из базы данных *DrugAge*.

№	N	IAP	20-Fold IAP	Вид геропротекторной активности
1	454	0,8738	0,8748	Geroprotector (All studies)
2	331	0,8887	0,8900	Geroprotector (<i>Caenorhabditis elegans</i>)
3	120	0,8185	0,8182	Geroprotector (<i>Drosophila melanogaster</i>)
4	33	0,8333	0,8318	Geroprotector (<i>Mus musculus</i>)
5	24	0,9406	0,9429	Geroprotector (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
6	13	0,8403	0,8425	Geroprotector (<i>Rattus norvegicus</i>)
7	7	0,8616	0,8634	Geroprotector (<i>Brachionus manjavacas</i>)
8	5	0,9985	0,9985	Geroprotector (<i>Aedes aegypti</i>)
9	4	0,8230	0,7944	Geroprotector (<i>Asplanchna brightwelli</i>)
10	4	0,9994	0,9994	Geroprotector (<i>Mytilina brevispina</i>)
11	3	0,9885	0,9889	Geroprotector (<i>Philodina acuticornis</i>)
12	3	0,9677	0,9682	Geroprotector (<i>Podospora anserina</i>)

N – количество соединений с данным видом активности, **IAP** – инвариантная точность прогноза при скользящем контроле с исключением по одному, **20-Fold IAP** – инвариантная точность прогноза при перекрестном контроле с разбиением выборки на 20 частей, **Activity** – вид активности.

Как видно из представленных в таблице 6.2 данных, точность и предсказательная способность построенных моделей (Q)SAR позволяют их использовать для прогноза геропротекторной активности новых соединений.

Результаты прогноза геропротекторной активности для референтных соединений с использованием построенных моделей представлены в таблице 6.3. Здесь приведены оценки вероятностей наличия (P_a) и отсутствия (P_i) каждой активности; все активности, для которых $P_a > P_i$, рассматриваются как вероятные [335].

Таблица 6.3 – Прогноз геропротекторной активности для референтных соединений на основе моделей (Q)SAR, построенных с использованием программы PASS на основе информации из базы данных DrugAge

Наименование препарата	Значения Ра и Рi, прогнозируемая активность
Ацетилсалициловая кислота, Acetylsalicylic acid	0,861 0,005 Geroprotector (Drosophila melanogaster) 0,697 0,069 Geroprotector (Asplanchna brightwelli) 0,582 0,027 Geroprotector (All studies) 0,571 0,036 Geroprotector (Rattus norvegicus) 0,524 0,028 Geroprotector (Caenorhabditis elegans) 0,473 0,017 Geroprotector (Saccharomyces cerevisiae) 0,429 0,061 Geroprotector (Mus musculus) 0,374 0,024 Geroprotector (Philodina acuticornis) 0,292 0,091 Geroprotector (Brachionus manjavacas) 0,119 0,092 Geroprotector (Podospira anserina) 0,090 0,032 Geroprotector (Mytilina brevispina) 0,062 0,045 Geroprotector (Aedes aegypti)
Аторвастатин, Atorvastatin	0,898 0,003 Geroprotector (Brachionus manjavacas) 0,498 0,156 Geroprotector (Asplanchna brightwelli) 0,268 0,144 Geroprotector (All studies)
Куркумин, Curcumin	0,827 0,008 Geroprotector (Drosophila melanogaster) 0,777 0,017 Geroprotector (Mus musculus) 0,775 0,043 Geroprotector (Asplanchna brightwelli) 0,743 0,012 Geroprotector (All studies) 0,651 0,015 Geroprotector (Caenorhabditis elegans) 0,632 0,006 Geroprotector (Saccharomyces cerevisiae) 0,313 0,006 Geroprotector (Podospira anserina) 0,297 0,177 Geroprotector (Rattus norvegicus) 0,239 0,147 Geroprotector (Brachionus manjavacas) 0,216 0,005 Geroprotector (Aedes aegypti)
Дазатиниб, Dasatinib	0,952 0,003 Geroprotector (Mus musculus)
Физетин, Fisetin	0,949 0,003 Geroprotector (Drosophila melanogaster) 0,890 0,008 Geroprotector (Mus musculus) 0,878 0,002 Geroprotector (Saccharomyces cerevisiae) 0,877 0,000 Geroprotector (Aedes aegypti) 0,849 0,022 Geroprotector (Asplanchna brightwelli) 0,835 0,007 Geroprotector (All studies) 0,830 0,006 Geroprotector (Caenorhabditis elegans) 0,806 0,014 Geroprotector (Rattus norvegicus) 0,793 0,000 Geroprotector (Podospira anserina) 0,247 0,136 Geroprotector (Brachionus manjavacas) 0,228 0,083 Geroprotector (Philodina acuticornis)
Метформин, Metformin	0,923 0,004 Geroprotector (Rattus norvegicus) 0,860 0,010 Geroprotector (Mus musculus) 0,695 0,019 Geroprotector (Drosophila melanogaster) 0,507 0,041 Geroprotector (All studies) 0,468 0,037 Geroprotector (Caenorhabditis elegans) 0,257 0,064 Geroprotector (Philodina acuticornis) 0,181 0,114 Geroprotector (Saccharomyces cerevisiae)
Навитоклакс, Navitoclax	-

Продолжение таблицы 6.3

Наименование препарата	Значения Ра и Рi, прогнозируемая активность
Никотинамид рибозид, Nicotinamide riboside	0,838 0,005 Geroprotector (Caenorhabditis elegans) 0,833 0,007 Geroprotector (All studies) 0,803 0,007 Geroprotector (Brachionus manjavacas) 0,698 0,004 Geroprotector (Saccharomyces cerevisiae) 0,454 0,101 Geroprotector (Drosophila melanogaster) 0,401 0,071 Geroprotector (Mus musculus)
Периндоприл, Perindopril	0,950 0,003 Geroprotector (Rattus norvegicus) 0,529 0,036 Geroprotector (All studies) 0,506 0,152 Geroprotector (Asplanchna brightwelli) 0,276 0,105 Geroprotector (Caenorhabditis elegans)
Кверцетин, Quercetin	0,963 0,002 Geroprotector (Drosophila melanogaster) 0,932 0,004 Geroprotector (Mus musculus) 0,921 0,000 Geroprotector (Aedes aegypti) 0,902 0,001 Geroprotector (Saccharomyces cerevisiae) 0,881 0,005 Geroprotector (All studies) 0,873 0,004 Geroprotector (Caenorhabditis elegans) 0,862 0,008 Geroprotector (Rattus norvegicus) 0,834 0,000 Geroprotector (Podospira anserina) 0,823 0,029 Geroprotector (Asplanchna brightwelli) 0,221 0,177 Geroprotector (Brachionus manjavacas) 0,180 0,124 Geroprotector (Philodina acuticornis)
Рапамицин, Rapamycin	0,998 0,000 Geroprotector (Mus musculus) 0,996 0,000 Geroprotector (Drosophila melanogaster) 0,995 0,001 Geroprotector (All studies) 0,993 0,001 Geroprotector (Caenorhabditis elegans) 0,871 0,004 Geroprotector (Brachionus manjavacas)
Ресвератрол, Resveratrol	0,839 0,010 Geroprotector (Rattus norvegicus) 0,811 0,003 Geroprotector (Saccharomyces cerevisiae) 0,804 0,015 Geroprotector (Mus musculus) 0,800 0,010 Geroprotector (Drosophila melanogaster) 0,779 0,041 Geroprotector (Asplanchna brightwelli) 0,747 0,001 Geroprotector (Aedes aegypti) 0,664 0,017 Geroprotector (All studies) 0,636 0,016 Geroprotector (Caenorhabditis elegans) 0,427 0,003 Geroprotector (Podospira anserina) 0,345 0,031 Geroprotector (Philodina acuticornis) 0,242 0,142 Geroprotector (Brachionus manjavacas) 0,089 0,033 Geroprotector (Mytilina brevispina)
Спермидин, Spermidine	0,952 0,003 Geroprotector (Mus musculus) 0,929 0,001 Geroprotector (Philodina acuticornis) 0,883 0,006 Geroprotector (Rattus norvegicus) 0,819 0,008 Geroprotector (Drosophila melanogaster) 0,738 0,004 Geroprotector (Saccharomyces cerevisiae) 0,521 0,037 Geroprotector (All studies) 0,504 0,031 Geroprotector (Caenorhabditis elegans) 0,131 0,015 Geroprotector (Mytilina brevispina)

Продолжение таблицы 6.3

Наименование препарата	Значения Pa и Pi, прогнозируемая активность
Сульфоран, Sulforophane	0,728 0,010 Geroprotector (Caenorhabditis elegans) 0,696 0,014 Geroprotector (All studies) 0,297 0,218 Geroprotector (Drosophila melanogaster) 0,177 0,127 Geroprotector (Philodina acuticornis)
Торин 2, Torin 2	0,742 0,014 Geroprotector (Drosophila melanogaster) 0,266 0,146 Geroprotector (All studies) 0,251 0,132 Geroprotector (Brachionus manjavacas)
Уролитин А, Urolithin A	0,892 0,004 Geroprotector (Drosophila melanogaster) 0,819 0,012 Geroprotector (Rattus norvegicus) 0,800 0,035 Geroprotector (Asplanchna brightwelli) 0,771 0,010 Geroprotector (All studies) 0,769 0,008 Geroprotector (Caenorhabditis elegans) 0,630 0,006 Geroprotector (Saccharomyces cerevisiae) 0,570 0,033 Geroprotector (Mus musculus) 0,408 0,003 Geroprotector (Podospira anserina) 0,382 0,003 Geroprotector (Aedes aegypti) 0,323 0,071 Geroprotector (Brachionus manjavacas) 0,243 0,073 Geroprotector (Philodina acuticornis) 0,064 0,060 Geroprotector (Mytilina brevispina)
Вилдаглиптин, Vildagliptin	0,377 0,239 Geroprotector (Asplanchna brightwelli)

Pa и Pi – оценки вероятностей проявления (Pa) и отсутствия (Pi) данного вида активности. Результаты прогноза упорядочены по убыванию разности Pa-Pi.

Как видно из представленных в таблице 6.3 данных, для 16 из 17 референтных соединений (кроме Навитоклакса) прогнозируется хотя бы один вид геропротекторной активности; а для 14 соединений прогнозируется обобщенная активность, выделенная в таблице полужирным шрифтом, **Geroprotector (All studies)**.

Учитывая особенности обучающей выборки, сформированной на основе сведений из базы данных DrugAge, построенные с ее использованием модели (Q)SAR целесообразно применять, прежде всего, для отбора соединений, геропротекторные свойства которых предполагается изучать на модельных организмах.

6.3. Построение моделей (Q)SAR с использованием обучающих выборок, содержащих информацию о сенолитах

Подготовленные выборки с данными о сенолитах (см. раздел 6.1.2) были использованы для построения классификационных моделей. Модели были построены с помощью компьютерной программы Sarmath с применением

самосогласованного экстремального классификатора [347].

Оценка качества моделей проводилась с применением пятикратного перекрестного контроля. В процессе валидации выборки разбивались на 5 равных частей таким образом, чтобы 4 части составляли обучающую выборку и 1 часть – тестовую. Для полученной обучающей выборки строили модель, которая использовалась для прогноза активности соединений в тестовой выборке. Обучение и прогноз осуществлялись для каждого разбиения. Точность классификационных моделей оценивали по двум характеристикам:

BA – сбалансированная точность при перекрестном контроле;

AUC – площадь под кривой оперативной характеристики при перекрестном контроле.

Построенная нами классификационная модель для оценки сенолитической активности имела удовлетворительные характеристики, о чем свидетельствуют приведенные на рисунке 6.5 ROC кривые, а также рассчитанные по этим кривым средние значения BA=0,663 и AUC=0,708.

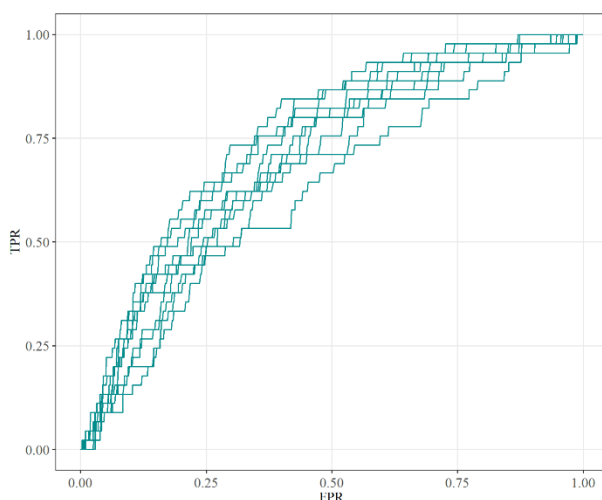


Рисунок 6.5 – ROC кривые для моделей, основанных на выборке при 10 мкМ пороге для отбора соединений, обладающих сенолитической активностью

Согласно п. 5.6 ТЗ валидация моделей выполнена на основе критериев, широко используемых при моделировании (Q)SAR. Ретроспективная валидация модели, построенной на данных, полученных при концентрации изучаемых соединений 10 мкМ, была осуществлена путем прогноза активности для независимой тестовой выборки. Все 25 активных соединений были предсказаны как активные; при этом, аналогично оригинальной статье [326], наблюдалось

значительное число ложноположительных прогнозов. При применении модели для виртуального скрининга можно ожидать отбор активных соединений в соотношении примерно 1:9.

Мы также выполнили прогноз сенолитической активности для референтных соединений с применением данной модели, результаты которого приведены в таблице 6.4.

Таблица 6.4 – Прогноз сенолитической активности для референтных соединений на основе модели «структура – сенолитическая активность», построенной на основе данных о сенолитиках, полученных при концентрации изучаемых соединений 10 мкМ

Наименование препарата	Результат классификации
Ацетилсалициловая кислота, Acetylsalicylic acid	Не обладает сенолитической активностью, ложно отрицательный прогноз
Аторвастатин, Atorvastatin	Обладает сенолитической активностью, положительный прогноз
Куркумин, Curcumin	Не обладает сенолитической активностью, отрицательный прогноз
Дазатиниб, Dasatinib	Обладает сенолитической активностью, положительный прогноз
Физетин, Fisetin	Не обладает сенолитической активностью, ложно отрицательный прогноз
Метформин, Metformin	Не обладает сенолитической активностью, отрицательный прогноз
Навитоклакс, Navitoclax	Обладает сенолитической активностью, положительный прогноз
Никотинамид рибозид, Nicotinamide riboside	Обладает сенолитической активностью, ложно положительный прогноз
Периндоприл, Perindopril	Обладает сенолитической активностью, ложно положительный прогноз
Кверцетин, Quercetin	Обладает сенолитической активностью, положительный прогноз
Рапамицин, Rapamycin	Обладает сенолитической активностью, положительный прогноз
Ресвератрол, Resveratrol	Обладает сенолитической активностью, ложно положительный прогноз
Спермидин, Spermidine	Не обладает сенолитической активностью, отрицательный прогноз
Сульфوران, Sulforophane	Не обладает сенолитической активностью, отрицательный прогноз

Продолжение таблицы 6.4

Наименование препарата	Результат классификации
Торин 2, Torin 2	Не обладает сенолитической активностью, отрицательный прогноз
Уролитин А, Urolithin A	Обладает сенолитической активностью, ложно положительный прогноз
Вилдаглиптин, Vildagliptin	Не обладает сенолитической активностью, ложно отрицательный прогноз

Как видно из приведенных в таблице 6.4 данных, 5 из 8 известных сенолитиков были классифицированы правильно; также правильно были классифицированы 5 соединений, не обладающих сенолитической активностью. Данные, использованные для построения модели, содержат всего 45 активных сенолитиков. Малое число активных соединений охватывает лишь небольшую часть химического пространства, что объясняет некоторые ошибки классификации на этапе прогноза.

6.4. Разработка специализированной версии программы PASS GERO

Компьютерная программа PASS, развитие которой осуществляется уже в течение более чем 30 лет [333–342,344], прогнозирует по структурной формуле соединения с высокой точностью несколько тысяч видов биологической активности на основе зависимостей «структура – активность», построенных на выборке, содержащей свыше полутора миллионов биологически активных веществ.

Проведенный нами анализ рассматриваемых в литературе механизмов геропротекторного действия [313] в сопоставлении со списком биологических активностей, прогнозируемых PASS (таблица 6.5), показывает, что имеются предпосылки для реализации специализированной версии программы PASS – PASS GERO.

Таблица 6.5 – Сопоставление механизмов действия потенциальных геропротекторов с прогнозируемыми PASS видами биологической активности

№№	Механизмы действия потенциальных геропротекторов	Категория геропротекторов	Прогнозируемые PASS виды биологической активности
1	Предотвращение свободнорадикального окисления	поглотители свободных радикалов или антиоксиданты; хелаторы переходных металлов; жирные кислоты, устойчивые к перекисному окислению липидов	Free radical scavenger Antioxidant Adenosine deaminase inhibitor Lipid peroxidase inhibitor Phosphatidic acid synthesis inhibitor Adenosine deaminase inhibitor Lipid peroxidase inhibitor Phosphatidic acid synthesis inhibitor Chelator Lipid peroxidase inhibitor Chelator, Iron
2	Поддержание митохондриальной функции	митогорметины и ингибиторы митохондриальной электрон-транспортной цепи; индукторы митофагии; активаторы PPAR γ /PGC-1 α и митопролиферации; предшественники NAD ⁺	Mitochondrial electron transport inhibitor Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist
3	Поддержание протеостаза	агенты, препятствующие гликированию, и ингибиторы перекрестных сшивок конечных продуктов гликирования (КПГ); антагонисты рецепторов КПГ RAGE; антиамилоидные соединения; стимуляторы обмена внеклеточного матрикса; индукторы аутофагии; активаторы протеасом; частичные ингибиторы трансляции	RAGE receptor antagonist Antiamyloidogenic Autophagy inducer

Продолжение таблицы 6.5

№№	Механизмы действия потенциальных геропротекторов	Категория геропротекторов	Прогнозируемые PASS виды биологической активности
4	Сенолитики/ сеностатики	вещества, способствующие избирательной элиминации сенесцентных клеток или замедляющие их появление	-
5	Горметины	вещества, вызывающие умеренные повреждения и стимулирующие активизацию защитных механизмов стрессоустойчивости	-
6	Супрессоры нестабильности генома	антимутагенные соединения; стабилизаторы теломер; ингибиторы ретротранспозиций	Antimutagenic Telomerase stimulant DNA directed RNA polymerase inhibitor

Продолжение таблицы 6.5

№№	Механизмы действия потенциальных геропротекторов	Категория геропротекторов	Прогнозируемые PASS виды биологической активности
7	Эпигенетические регуляторы	ингибиторы HDACs, HATs; активаторы SIRTs	Histone deacetylase inhibitor Histone deacetylase class I inhibitor Histone deacetylase class II inhibitor Histone deacetylase class III inhibitor Histone deacetylase class IV inhibitor Histone deacetylase 1 inhibitor Histone deacetylase 2 inhibitor Histone deacetylase 3 inhibitor Histone deacetylase 8 inhibitor Histone deacetylase 1A inhibitor Histone deacetylase 1B inhibitor Histone deacetylase class IIa inhibitor Histone deacetylase class IIb inhibitor Histone deacetylase 4 inhibitor Histone deacetylase 5 inhibitor Histone deacetylase 7 inhibitor Histone deacetylase 9 inhibitor Histone deacetylase 10 inhibitor Histone deacetylase 6 inhibitor Histone deacetylase 11 inhibitor Histone deacetylase SIRT1 inhibitor Histone deacetylase SIRT2 inhibitor Histone deacetylase SIRT3 inhibitor Histone deacetylase SIRT4 inhibitor Histone deacetylase SIRT5 inhibitor Histone deacetylase SIRT6 inhibitor Histone deacetylase SIRT7 inhibitor Sir2p inhibitor Histone deacetylase SIRT1 stimulant Histone deacetylase SIRT2 stimulant Histone acetyltransferase inhibitor Histone acetyltransferase KAT2A inhibitor Histone acetyltransferase KAT2B inhibitor Histone acetyltransferase KAT5 inhibitor Histone acetyltransferase KAT6A inhibitor Histone acetyltransferase KAT7 inhibitor Histone acetyltransferase p300 inhibitor Histone acetyltransferase PCAF inhibitor Histone acetyltransferase RTT109 inhibitor Nuclear receptor coactivator 1 inhibitor Nuclear receptor coactivator 3 inhibitor

Продолжение таблицы 6.5

№№	Механизмы действия потенциальных геропротекторов	Категория геропротекторов	Прогнозируемые PASS виды биологической активности
8	Ингибиторы связанных со старением сигнальных путей	ингибиторы mTORC1; ингибиторы PI3K; ингибиторы Ras; ингибиторы Мус; ингибиторы AT1; активаторы AMPK; активаторы Клото	mTOR complex 1 inhibitor Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor Phosphatidylinositol 3-kinase alpha inhibitor Phosphatidylinositol 3-kinase beta inhibitor Phosphatidylinositol 3-kinase delta inhibitor Phosphatidylinositol 3-kinase gamma inhibitor Myc inhibitor Angiotensin AT1 receptor antagonist Angiotensin AT1A receptor antagonist Angiotensin AT1B receptor antagonist AMP-activated protein kinase inhibitor AMP-activated protein kinase, alpha-1 subunit inhibitor AMP-activated protein kinase, alpha-2 subunit inhibitor AMP-activated protein kinase, beta-1 subunit inhibitor AMP-activated protein kinase, beta-2 subunit inhibitor AMP-activated protein kinase, gamma-1 subunit inhibitor AMP-activated protein kinase, gamma-2 subunit inhibitor
9	Противовоспалительные препараты	ингибиторы NF-κB; активаторы NRF2	Transcription factor NF kappa B inhibitor Transcription factor NF kappa B1 inhibitor Transcription factor NF kappa B2 inhibitor Transcription factor RelA inhibitor Transcription factor RelB inhibitor NF-E2-related factor 2 stimulant Poly(ADP-ribose) polymerase 1 inhibitor Inducible nitric oxide synthase inhibitor Cyclooxygenase 2 inhibitor Ribosomal protein S6 kinase inhibitor Insulin growth factor antagonist Insulin like growth factor 1 antagonist Insulin like growth factor 2 antagonist Insulin like growth factor 3 antagonist Insulin like growth factor 4 antagonist Insulin like growth factor 5 antagonist Insulin like growth factor 6 antagonist Hypoxia-inducible factor 1 alpha inhibitor
10	Оптимизация микробиоты кишечника	пребиотики, метабиотики и энтеросорбенты	-

Продолжение таблицы 6.5

№№	Механизмы действия потенциальных герпротекторов	Категория герпротекторов	Прогнозируемые PASS виды биологической активности
11	Антифибротические вещества	ингибиторы сигнальных путей, связанных с фиброзом; ингибиторы TGF- β →ALK5→p-Smad 2,3	Fibrosis treatment Transforming growth factor beta antagonist Transforming growth factor beta 1 antagonist Transforming growth factor beta 2 antagonist Transforming growth factor beta 3 antagonist TGF beta receptor type I kinase inhibitor SMAD3 inhibitor
12	Нейротрофические факторы	играют роль в развитии и сохранении структур как центральной, так и периферической нервной системы; миметики BDNF	Neurotrophic factor Neurotrophic factor enhancer TRKB agonist
13	Факторы, препятствующие нарушению барьерной функции	ингибиторы матричных металлопротеиназ, активаторы синтеза белков плотных контактов	Metalloproteinase-9 inhibitor
14	Иммуномодуляторы	факторы, способствующие регенерации тимуса и сохранения пула наивных Т-клеток	Estradiol 17 beta-dehydrogenase inhibitor Estradiol 17 beta-dehydrogenase 1 inhibitor Estradiol 17 beta-dehydrogenase 2 inhibitor Estradiol 17 beta-dehydrogenase 3 inhibitor 5-Alpha-reductase inhibitor 5-Alpha-reductase 1 inhibitor 5-Alpha-reductase 2 inhibitor Melatonin receptor agonist Melatonin receptor 1 agonist Melatonin receptor 2 agonist Melatonin receptor 3 agonist Melatonin receptor 4 agonist Melatonin receptor 5 agonist Janus tyrosine kinase 1 inhibitor Janus tyrosine kinase 2 inhibitor Janus tyrosine kinase 3 inhibitor Janus tyrosine kinase inhibitor Transcription factor STAT inhibitor Transcription factor STAT1 inhibitor Transcription factor STAT3 inhibitor Transcription factor STAT4 inhibitor Transcription factor STAT5 inhibitor Transcription factor STAT6 inhibitor

Информация о базе знаний SAR Base специализированной версии PASS GERO приведена в таблице 6.6.

Таблица 6.6 – Характеристика базы знаний специализированной версии PASS GERO

№	N	IAP	20-Fold IAP	Прогнозируемый PASS вид биологической активности
1	2435	0,9867	0,9866	5 Hydroxytryptamine 3 antagonist
2	91	0,9861	0,9854	5 Hydroxytryptamine 7 agonist
3	687	0,9961	0,9961	5-Alpha-reductase 1 inhibitor
4	642	0,9942	0,9942	5-Alpha-reductase 2 inhibitor
5	1738	0,9933	0,9931	5-Alpha-reductase inhibitor
6	394	0,9376	0,9337	AMP-activated protein kinase inhibitor
7	311	0,9341	0,9299	AMP-activated protein kinase, alpha-1 subunit inhibitor
8	43	0,9604	0,9414	AMP-activated protein kinase, alpha-2 subunit inhibitor
9	18	0,9005	0,8903	AMP-activated protein kinase, beta-1 subunit inhibitor
10	15	0,9421	0,9188	AMP-activated protein kinase, gamma-1 subunit inhibitor
11	315	0,9877	0,9879	Adenosine deaminase inhibitor
12	2772	0,9734	0,9734	Alpha 2 adrenoreceptor antagonist
13	6176	0,9929	0,9929	Angiotensin AT1 receptor antagonist
14	1625	0,9982	0,9983	Angiotensin AT1A receptor antagonist
15	1413	0,9984	0,9984	Angiotensin AT1B receptor antagonist
16	3286	0,9265	0,9255	Antiamyloidogenic
17	40	0,9702	0,9688	Antimutagenic
18	4992	0,9189	0,9188	Antioxidant
19	500	0,8287	0,8253	Autophagy inducer
20	799	0,9645	0,9637	Chelator
21	45	0,9867	0,9871	Chelator, Iron
22	7079	0,9624	0,9624	Cyclooxygenase 2 inhibitor
23	3232	0,9647	0,9646	DNA directed RNA polymerase inhibitor
24	704	0,9963	0,9963	Estradiol 17 beta-dehydrogenase 1 inhibitor
25	579	0,9939	0,9939	Estradiol 17 beta-dehydrogenase 2 inhibitor
26	302	0,9956	0,9956	Estradiol 17 beta-dehydrogenase 3 inhibitor
27	1232	0,9928	0,9929	Estradiol 17 beta-dehydrogenase inhibitor
28	4088	0,9274	0,9264	Fibrosis treatment
29	2641	0,9278	0,9276	Free radical scavenger
30	35	0,9562	0,9585	Histone acetyltransferase KAT2A inhibitor
31	97	0,9865	0,9867	Histone acetyltransferase KAT2B inhibitor
32	21	0,9553	0,9514	Histone acetyltransferase KAT5 inhibitor
33	243	0,9992	0,9992	Histone acetyltransferase KAT6A inhibitor
34	11	0,9651	0,9637	Histone acetyltransferase KAT7 inhibitor
35	41	0,9709	0,9714	Histone acetyltransferase PCAF inhibitor

Продолжение таблицы 6.6

№	N	IAP	20-Fold IAP	Прогнозируемый PASS вид биологической активности
36	84	0,9882	0,9882	Histone acetyltransferase RTT109 inhibitor
37	1100	0,9257	0,9252	Histone acetyltransferase inhibitor
38	399	0,9731	0,9736	Histone acetyltransferase p300 inhibitor
39	4997	0,9928	0,9928	Histone deacetylase 1 inhibitor
40	581	0,9951	0,9952	Histone deacetylase 10 inhibitor
41	656	0,9937	0,9938	Histone deacetylase 11 inhibitor
42	8	0,9998	0,9998	Histone deacetylase 1A inhibitor
43	42	1,0000	1,0000	Histone deacetylase 1B inhibitor
44	2138	0,9918	0,9918	Histone deacetylase 2 inhibitor
45	1744	0,9953	0,9953	Histone deacetylase 3 inhibitor
46	1110	0,9942	0,9942	Histone deacetylase 4 inhibitor
47	1879	0,9928	0,9929	Histone deacetylase 5 inhibitor
48	3455	0,9938	0,9939	Histone deacetylase 6 inhibitor
49	533	0,9917	0,9917	Histone deacetylase 7 inhibitor
50	1637	0,9916	0,9912	Histone deacetylase 8 inhibitor
51	501	0,9902	0,9902	Histone deacetylase 9 inhibitor
52	337	0,9516	0,9519	Histone deacetylase SIRT1 inhibitor
53	311	0,9794	0,9782	Histone deacetylase SIRT1 stimulant
54	586	0,9840	0,9842	Histone deacetylase SIRT2 inhibitor
55	5	0,9992	0,9992	Histone deacetylase SIRT2 stimulant
56	161	0,9794	0,9793	Histone deacetylase SIRT3 inhibitor
57	68	0,9935	0,9935	Histone deacetylase SIRT5 inhibitor
58	14	0,8693	0,8599	Histone deacetylase SIRT6 inhibitor
59	6219	0,9918	0,9916	Histone deacetylase class I inhibitor
60	5008	0,9930	0,9931	Histone deacetylase class II inhibitor
61	803	0,9644	0,9645	Histone deacetylase class III inhibitor
62	2566	0,9932	0,9932	Histone deacetylase class IIa inhibitor
63	3485	0,9938	0,9938	Histone deacetylase class IIb inhibitor
64	656	0,9937	0,9938	Histone deacetylase class IV inhibitor
65	10985	0,9826	0,9825	Histone deacetylase inhibitor
66	2125	0,9055	0,9051	Hypoxia-inducible factor 1 alpha inhibitor
67	1699	0,9773	0,9773	Inducible nitric oxide synthase inhibitor
68	3898	0,9774	0,9772	Insulin growth factor antagonist
69	3854	0,9777	0,9775	Insulin like growth factor 1 antagonist
70	3	0,9956	0,9962	Insulin like growth factor 2 antagonist
71	44	1,0000	1,0000	Insulin like growth factor 3 antagonist

Продолжение таблицы 6.6

№	N	IAP	20-Fold IAP	Прогнозируемый PASS вид биологической активности
72	6346	0,9919	0,9919	Janus tyrosine kinase 1 inhibitor
73	10871	0,9801	0,9800	Janus tyrosine kinase 2 inhibitor
74	8003	0,9840	0,9839	Janus tyrosine kinase 3 inhibitor
75	15102	0,9782	0,9781	Janus tyrosine kinase inhibitor
76	1157	0,9572	0,9570	Lipid peroxidase inhibitor
77	372	0,9940	0,9940	Melatonin receptor 1 agonist
78	188	0,9968	0,9966	Melatonin receptor 2 agonist
79	615	0,9942	0,9941	Melatonin receptor agonist
80	2975	0,9777	0,9776	Metalloproteinase-9 inhibitor
81	4	0,9464	0,9650	Mitochondrial electron transport inhibitor
82	507	0,9859	0,9861	Myc inhibitor
83	10	0,9580	0,9604	NF-E2-related factor 2 stimulant
84	524	0,9599	0,9593	Neurotrophic factor
85	77	0,9341	0,9333	Neurotrophic factor enhancer
86	115	0,8858	0,8871	Nuclear receptor coactivator 1 inhibitor
87	171	0,8243	0,8237	Nuclear receptor coactivator 3 inhibitor
88	3444	0,9850	0,9850	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist
89	11736	0,9889	0,9888	Phosphatidylinositol 3-kinase alpha inhibitor
90	2922	0,9874	0,9874	Phosphatidylinositol 3-kinase beta inhibitor
91	4994	0,9885	0,9884	Phosphatidylinositol 3-kinase delta inhibitor
92	6895	0,9862	0,9862	Phosphatidylinositol 3-kinase gamma inhibitor
93	18093	0,9838	0,9838	Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor
94	4885	0,9911	0,9911	Poly(ADP-ribose) polymerase 1 inhibitor
95	56	0,9207	0,9220	RAGE receptor antagonist
96	2327	0,9613	0,9612	Ribosomal protein S6 kinase inhibitor
97	29	0,8493	0,8465	SMAD3 inhibitor
98	2226	0,9963	0,9963	Sodium/glucose cotransporter 2 inhibitor
99	210	0,9965	0,9966	TGF beta receptor type I kinase inhibitor
100	59	0,9732	0,9661	TRKB agonist
101	11	0,9986	0,9987	Telomerase stimulant
102	1787	0,8980	0,8968	Transcription factor NF kappa B inhibitor
103	483	0,8934	0,8935	Transcription factor NF kappa B1 inhibitor
104	74	0,9915	0,9923	Transcription factor NF kappa B2 inhibitor
105	99	0,9758	0,9753	Transcription factor RelA inhibitor
106	1174	0,9076	0,9077	Transcription factor STAT inhibitor
107	26	0,8288	0,8328	Transcription factor STAT1 inhibitor

Продолжение таблицы 6.6

№	N	IAP	20-Fold IAP	Прогнозируемый PASS вид биологической активности
108	881	0,9140	0,9147	Transcription factor STAT3 inhibitor
109	47	0,8711	0,8708	Transcription factor STAT5 inhibitor
110	247	0,9522	0,9521	Transcription factor STAT6 inhibitor
111	2115	0,9868	0,9867	Transforming growth factor beta 1 antagonist
112	182	0,9912	0,9913	Transforming growth factor beta 2 antagonist
113	75	0,9619	0,9620	Transforming growth factor beta 3 antagonist
114	2367	0,9789	0,9789	Transforming growth factor beta antagonist
115	310	0,9615	0,9611	mTOR complex 1 inhibitor

N – количество соединений с данным видом активности, **IAP** – инвариантная точность прогноза при скользящем контроле с исключением по одному, **20-Fold IAP** – инвариантная точность прогноза при перекрестном контроле с разбиением выборки на 20 частей.

Представленные в таблице 6.6 данные свидетельствуют о том, что специализированная версия PASS GERO позволяет с хорошей точностью прогнозировать 115 механизмов геропротекторного действия. Значение средней инвариантной точности прогноза, полученной в ходе валидации построенных зависимостей при перекрестном контроле с разбиением выборки на 20 частей (20-Fold IAP) составляет 0,9659, что лишь немного уступает среднему значению IAP при скользящем контроле с исключением по одному (0,9665). Таким образом, построенные с использованием специализированной версии программы PASS GERO зависимости обладают высокой точностью и предсказательной способностью.

С целью ретроспективной валидации специализированной компьютерной программы PASS GERO мы выполнили прогноз спектров геропротекторной активности для референтных соединений, результаты которого при пороге $P_a > 0,1$ приведены в таблице 6.7.

Таблица 6.7 – Прогноз геропротекторной активности для референтных соединений с помощью PASS GERO.

Наименование препарата	Значения Ра и Рi, прогнозируемая активность
Ацетилсалициловая кислота, Acetylsalicylic acid	0,596 0,023 Transcription factor STAT1 inhibitor 0,549 0,032 Transcription factor NF kappa B inhibitor 0,523 0,015 SMAD3 inhibitor 0,456 0,074 Autophagy inducer 0,417 0,033 Transcription factor NF kappa B1 inhibitor 0,414 0,016 Transcription factor STAT3 inhibitor 0,404 0,027 Free radical scavenger 0,404 0,019 Transcription factor STAT inhibitor 0,401 0,015 NF-E2-related factor 2 stimulant 0,379 0,038 Antioxidant 0,365 0,018 Antimutagenic 0,356 0,020 Histone deacetylase SIRT6 inhibitor 0,354 0,015 Transcription factor STAT5 inhibitor 0,324 0,012 Neurotrophic factor enhancer 0,311 0,059 Hypoxia-inducible factor 1 alpha inhibitor 0,275 0,014 Chelator 0,264 0,023 Lipid peroxidase inhibitor 0,255 0,242 Nuclear receptor coactivator 3 inhibitor 0,234 0,130 Mitochondrial electron transport inhibitor 0,214 0,078 Antiamyloidogenic 0,156 0,319 Nuclear receptor coactivator 1 inhibitor 0,155 0,016 Histone acetyltransferase KAT5 inhibitor 0,153 0,006 Chelator, Iron 0,151 0,050 Cyclooxygenase 2 inhibitor 0,145 0,014 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist 0,143 0,018 Insulin like growth factor 2 antagonist 0,140 0,013 TRKB agonist 0,139 0,162 Histone acetyltransferase inhibitor 0,119 0,060 Transcription factor STAT6 inhibitor 0,115 0,091 Histone acetyltransferase KAT2A inhibitor 0,104 0,121 Neurotrophic factor
Аторвастатин, Atorvastatin	0,219 0,359 Transcription factor STAT1 inhibitor 0,201 0,189 Mitochondrial electron transport inhibitor 0,181 0,173 Transcription factor NF kappa B inhibitor 0,179 0,194 Histone deacetylase SIRT6 inhibitor 0,165 0,342 Transcription factor STAT5 inhibitor 0,110 0,225 RAGE receptor antagonist

Продолжение таблицы 6.7

Наименование препарата	Значения Ра и Рi, прогнозируемая активность
Куркумин, Curcumin	0,852 0,004 Free radical scavenger 0,801 0,004 Antioxidant 0,775 0,012 Transcription factor NF kappa B inhibitor 0,769 0,004 Antimutagenic 0,687 0,005 Antiamyloidogenic 0,684 0,004 Transcription factor NF kappa B1 inhibitor 0,654 0,024 Autophagy inducer 0,550 0,012 SMAD3 inhibitor 0,535 0,005 Transcription factor STAT3 inhibitor 0,524 0,007 Transcription factor STAT inhibitor 0,407 0,027 Hypoxia-inducible factor 1 alpha inhibitor 0,398 0,005 Histone acetyltransferase inhibitor 0,386 0,143 Nuclear receptor coactivator 3 inhibitor 0,386 0,010 Lipid peroxidase inhibitor 0,354 0,008 Chelator 0,335 0,030 NF-E2-related factor 2 stimulant 0,289 0,071 Mitochondrial electron transport inhibitor 0,282 0,003 Insulin like growth factor 2 antagonist 0,273 0,089 Transcription factor STAT5 inhibitor 0,271 0,096 Nuclear receptor coactivator 1 inhibitor 0,260 0,315 Transcription factor STAT1 inhibitor 0,258 0,033 Neurotrophic factor enhancer 0,214 0,005 Estradiol 17 beta-dehydrogenase inhibitor 0,207 0,013 DNA directed RNA polymerase inhibitor 0,193 0,031 Cyclooxygenase 2 inhibitor 0,181 0,004 Histone deacetylase SIRT2 stimulant 0,180 0,004 Chelator, Iron 0,155 0,007 Transcription factor RelA inhibitor 0,150 0,327 Histone deacetylase SIRT6 inhibitor 0,145 0,060 Neurotrophic factor 0,134 0,011 Histone acetyltransferase p300 inhibitor 0,121 0,046 Histone acetyltransferase KAT5 inhibitor 0,110 0,029 Inducible nitric-oxide synthase inhibitor
Дазатиниб, Dasatinib	0,168 0,294 Nuclear receptor coactivator 1 inhibitor 0,161 0,393 Nuclear receptor coactivator 3 inhibitor 0,155 0,402 Autophagy inducer 0,146 0,121 AMP-activated protein kinase inhibitor 0,143 0,139 AMP-activated protein kinase, alpha-1 subunit inhibitor 0,135 0,415 Histone deacetylase SIRT6 inhibitor 0,122 0,079 AMP-activated protein kinase, beta-1 subunit inhibitor 0,110 0,517 Mitochondrial electron transport inhibitor

Продолжение таблицы 6.7

Наименование препарата	Значения Ра и Рi, прогнозируемая активность
Физетин, Fisetin	0,935 0,002 Antimutagenic 0,890 0,003 Free radical scavenger 0,886 0,004 Antioxidant 0,777 0,002 SMAD3 inhibitor 0,758 0,014 Autophagy inducer 0,662 0,001 TRKB agonist 0,634 0,027 Nuclear receptor coactivator 3 inhibitor 0,630 0,024 Transcription factor NF kappa B inhibitor 0,626 0,006 Hypoxia-inducible factor 1 alpha inhibitor 0,625 0,003 NF-E2-related factor 2 stimulant 0,608 0,005 Transcription factor NF kappa B1 inhibitor 0,540 0,005 Lipid peroxidase inhibitor 0,520 0,060 Transcription factor STAT1 inhibitor 0,500 0,009 Mitochondrial electron transport inhibitor 0,500 0,001 Histone deacetylase SIRT2 stimulant 0,479 0,012 Antiamyloidogenic 0,476 0,010 Transcription factor STAT inhibitor 0,458 0,005 Chelator 0,430 0,004 Histone deacetylase SIRT1 stimulant 0,379 0,004 RAGE receptor antagonist 0,330 0,003 Estradiol 17 beta-dehydrogenase inhibitor 0,319 0,044 Transcription factor STAT3 inhibitor 0,301 0,017 Neurotrophic factor enhancer 0,236 0,005 Transcription factor STAT6 inhibitor 0,218 0,005 Insulin like growth factor 2 antagonist 0,217 0,003 Estradiol 17 beta-dehydrogenase 1 inhibitor 0,209 0,225 Transcription factor STAT5 inhibitor 0,201 0,005 Transcription factor RelA inhibitor 0,199 0,071 Histone acetyltransferase inhibitor 0,196 0,231 Nuclear receptor coactivator 1 inhibitor 0,194 0,031 Cyclooxygenase 2 inhibitor 0,142 0,063 Neurotrophic factor 0,136 0,004 Estradiol 17 beta-dehydrogenase 2 inhibitor 0,125 0,017 Chelator, Iron 0,115 0,559 Histone deacetylase SIRT6 inhibitor 0,101 0,084 Histone acetyltransferase KAT5 inhibitor
Метформин, Metformin	0,430 0,011 Histone deacetylase SIRT6 inhibitor 0,283 0,107 Transcription factor NF kappa B1 inhibitor 0,265 0,308 Transcription factor STAT1 inhibitor 0,238 0,212 SMAD3 inhibitor 0,209 0,093 NF-E2-related factor 2 stimulant 0,195 0,234 Nuclear receptor coactivator 1 inhibitor 0,170 0,012 Inducible nitric-oxide synthase inhibitor 0,161 0,056 RAGE receptor antagonist 0,158 0,070 Antimutagenic 0,148 0,424 Nuclear receptor coactivator 3 inhibitor 0,142 0,009 5 Hydroxytryptamine 3 antagonist 0,138 0,383 Mitochondrial electron transport inhibitor 0,104 0,011 Histone acetyltransferase KAT2B inhibitor 0,102 0,112 Histone deacetylase SIRT1 inhibitor

Продолжение таблицы 6.7

Наименование препарата	Значения Ра и Рi, прогнозируемая активность
Навитоклакс, Navitoclax	0,239 0,155 Transcription factor STAT5 inhibitor 0,116 0,551 Histone deacetylase SIRT6 inhibitor 0,108 0,511 Autophagy inducer
Никотинамид рибозид, Nicotinamide riboside	0,593 0,035 Autophagy inducer 0,469 0,085 Nuclear receptor coactivator 3 inhibitor 0,449 0,023 Transcription factor NF kappa B1 inhibitor 0,409 0,004 Histone deacetylase SIRT1 stimulant 0,339 0,071 Transcription factor NF kappa B inhibitor 0,332 0,004 Transcription factor STAT6 inhibitor 0,299 0,052 Transcription factor STAT5 inhibitor 0,248 0,088 Transcription factor STAT inhibitor 0,239 0,123 Mitochondrial electron transport inhibitor 0,228 0,233 SMAD3 inhibitor 0,194 0,116 Antioxidant 0,186 0,024 Histone deacetylase class III inhibitor 0,181 0,171 Hypoxia-inducible factor 1 alpha inhibitor 0,177 0,099 Neurotrophic factor enhancer 0,161 0,003 Adenosine deaminase inhibitor 0,149 0,331 Histone deacetylase SIRT6 inhibitor 0,148 0,009 Histone deacetylase SIRT2 inhibitor 0,146 0,147 Free radical scavenger 0,145 0,064 Histone deacetylase SIRT1 inhibitor 0,145 0,025 DNA directed RNA polymerase inhibitor 0,121 0,383 Nuclear receptor coactivator 1 inhibitor
Периндоприл, Perindopril	0,297 0,183 Autophagy inducer 0,276 0,009 Neurotrophic factor 0,238 0,073 Histone deacetylase SIRT6 inhibitor 0,218 0,156 Mitochondrial electron transport inhibitor 0,207 0,147 Transcription factor NF kappa B inhibitor 0,168 0,048 RAGE receptor antagonist 0,157 0,198 Transcription factor STAT3 inhibitor 0,128 0,057 Histone acetyltransferase KAT2A inhibitor 0,119 0,553 SMAD3 inhibitor 0,107 0,105 Histone deacetylase SIRT1 inhibitor 0,101 0,225 Free radical scavenger

Продолжение таблицы 6.7

Наименование препарата	Значения Ра и Рi, прогнозируемая активность
Кверцетин, Quercetin	0,958 0,001 Antimutagenic 0,924 0,003 Antioxidant 0,910 0,003 Free radical scavenger 0,827 0,008 Autophagy inducer 0,817 0,001 SMAD3 inhibitor 0,689 0,018 Transcription factor NF kappa B inhibitor 0,661 0,005 Hypoxia-inducible factor 1 alpha inhibitor 0,629 0,004 Transcription factor NF kappa B1 inhibitor 0,627 0,001 Histone deacetylase SIRT2 stimulant 0,606 0,035 Nuclear receptor coactivator 3 inhibitor 0,574 0,004 Lipid peroxidase inhibitor 0,570 0,004 NF-E2-related factor 2 stimulant 0,556 0,001 TRKB agonist 0,528 0,004 Chelator 0,510 0,010 Antiamyloidogenic 0,502 0,072 Transcription factor STAT1 inhibitor 0,469 0,013 Mitochondrial electron transport inhibitor 0,460 0,011 Transcription factor STAT inhibitor 0,454 0,004 Histone deacetylase SIRT1 stimulant 0,423 0,003 Estradiol 17 beta-dehydrogenase inhibitor 0,373 0,004 RAGE receptor antagonist 0,326 0,012 Neurotrophic factor enhancer 0,326 0,004 Transcription factor STAT6 inhibitor 0,305 0,002 Estradiol 17 beta-dehydrogenase 1 inhibitor 0,262 0,073 Transcription factor STAT3 inhibitor 0,239 0,004 Transcription factor RelA inhibitor 0,213 0,026 Cyclooxygenase 2 inhibitor 0,197 0,006 Insulin like growth factor 2 antagonist 0,190 0,004 Estradiol 17 beta-dehydrogenase 2 inhibitor 0,171 0,109 Histone acetyltransferase inhibitor 0,165 0,301 Nuclear receptor coactivator 1 inhibitor 0,160 0,358 Transcription factor STAT5 inhibitor 0,143 0,009 Chelator, Iron 0,124 0,084 Neurotrophic factor 0,102 0,663 Histone deacetylase SIRT6 inhibitor
Рапамицин, Rapamycin	0,980 0,001 mTOR complex 1 inhibitor 0,599 0,027 Transcription factor NF kappa B inhibitor 0,536 0,003 Neurotrophic factor 0,398 0,017 Fibrosis treatment 0,343 0,047 Hypoxia-inducible factor 1 alpha inhibitor 0,297 0,066 Mitochondrial electron transport inhibitor 0,131 0,454 Autophagy inducer

Продолжение таблицы 6.7

Наименование препарата	Значения Ра и Рi, прогнозируемая активность
Ресвератрол, Resveratrol	0,796 0,011 Autophagy inducer 0,775 0,003 Antimutagenic 0,757 0,004 Free radical scavenger 0,738 0,005 Antioxidant 0,654 0,005 SMAD3 inhibitor 0,639 0,026 Nuclear receptor coactivator 3 inhibitor 0,632 0,013 Transcription factor STAT1 inhibitor 0,595 0,006 Antiamyloidogenic 0,567 0,030 Transcription factor NF kappa B inhibitor 0,559 0,001 Histone deacetylase SIRT2 stimulant 0,557 0,007 Transcription factor NF kappa B1 inhibitor 0,503 0,005 NF-E2-related factor 2 stimulant 0,480 0,005 Chelator 0,470 0,006 Lipid peroxidase inhibitor 0,426 0,004 Histone deacetylase SIRT1 stimulant 0,382 0,024 Transcription factor STAT inhibitor 0,373 0,026 Transcription factor STAT3 inhibitor 0,366 0,040 Hypoxia-inducible factor 1 alpha inhibitor 0,349 0,032 Nuclear receptor coactivator 1 inhibitor 0,325 0,012 Neurotrophic factor enhancer 0,306 0,003 Insulin like growth factor 2 antagonist 0,279 0,079 Transcription factor STAT5 inhibitor 0,272 0,085 Mitochondrial electron transport inhibitor 0,238 0,031 Histone acetyltransferase inhibitor 0,221 0,004 Transcription factor RelA inhibitor 0,197 0,030 Cyclooxygenase 2 inhibitor 0,180 0,035 RAGE receptor antagonist 0,173 0,011 Transcription factor STAT6 inhibitor 0,172 0,222 Histone deacetylase SIRT6 inhibitor 0,162 0,046 Neurotrophic factor 0,153 0,006 Chelator, Iron 0,152 0,058 Histone deacetylase SIRT1 inhibitor 0,152 0,007 Estradiol 17 beta-dehydrogenase inhibitor 0,146 0,017 Inducible nitric-oxide synthase inhibitor 0,146 0,004 Estradiol 17 beta-dehydrogenase 2 inhibitor 0,144 0,022 Histone acetyltransferase KAT5 inhibitor 0,102 0,024 TRKB agonist 0,102 0,012 Histone acetyltransferase KAT2B inhibitor

Продолжение таблицы 6.7

Наименование препарата	Значения Ра и Рi, прогнозируемая активность
Спермидин, Spermidine	0,516 0,054 Autophagy inducer 0,507 0,010 Antimutagenic 0,489 0,007 Histone deacetylase SIRT6 inhibitor 0,476 0,005 Chelator 0,448 0,023 Transcription factor NF kappa B1 inhibitor 0,399 0,016 NF-E2-related factor 2 stimulant 0,384 0,024 Antiamyloidogenic 0,351 0,214 Transcription factor STAT1 inhibitor 0,348 0,005 Histone deacetylase SIRT1 inhibitor 0,324 0,004 Inducible nitric-oxide synthase inhibitor 0,307 0,109 SMAD3 inhibitor 0,303 0,063 Nuclear receptor coactivator 1 inhibitor 0,279 0,067 Transcription factor STAT inhibitor 0,271 0,230 Nuclear receptor coactivator 3 inhibitor 0,263 0,073 Transcription factor STAT3 inhibitor 0,236 0,011 Histone deacetylase class III inhibitor 0,234 0,125 Transcription factor NF kappa B inhibitor 0,224 0,015 RAGE receptor antagonist 0,218 0,066 AMP-activated protein kinase, alpha-1 subunit inhibitor 0,200 0,069 Histone acetyltransferase inhibitor 0,181 0,035 Neurotrophic factor 0,180 0,084 AMP-activated protein kinase inhibitor 0,163 0,005 Chelator, Iron 0,151 0,011 TRKB agonist 0,151 0,004 Histone acetyltransferase KAT2B inhibitor 0,147 0,024 Transcription factor STAT6 inhibitor 0,145 0,356 Mitochondrial electron transport inhibitor 0,145 0,143 Neurotrophic factor enhancer 0,129 0,175 Free radical scavenger 0,121 0,206 Antioxidant 0,119 0,016 Histone deacetylase SIRT2 inhibitor 0,112 0,006 Myc inhibitor 0,104 0,009 Histone deacetylase SIRT3 inhibitor 0,102 0,083 Histone acetyltransferase KAT5 inhibitor 0,102 0,013 Histone deacetylase SIRT5 inhibitor
Сульфوران, Sulforophane	0,883 0,000 NF-E2-related factor 2 stimulant 0,391 0,170 Transcription factor STAT1 inhibitor 0,369 0,004 Inducible nitric-oxide synthase inhibitor 0,345 0,047 Antioxidant 0,220 0,075 Antiamyloidogenic 0,193 0,154 Histone deacetylase SIRT6 inhibitor 0,152 0,434 SMAD3 inhibitor 0,148 0,213 Transcription factor STAT3 inhibitor 0,143 0,426 Autophagy inducer 0,133 0,268 Transcription factor STAT inhibitor 0,106 0,214 Free radical scavenger 0,104 0,363 Transcription factor NF kappa B1 inhibitor

Продолжение таблицы 6.7

Наименование препарата	Значения P_a и P_i , прогнозируемая активность
Торин 2, Torin 2	0,398 0,163 Transcription factor STAT1 inhibitor 0,361 0,022 Fibrosis treatment 0,303 0,035 AMP-activated protein kinase, alpha-1 subunit inhibitor 0,299 0,033 AMP-activated protein kinase inhibitor 0,225 0,187 Transcription factor STAT5 inhibitor 0,210 0,005 mTOR complex 1 inhibitor 0,207 0,298 Nuclear receptor coactivator 3 inhibitor 0,193 0,313 SMAD3 inhibitor 0,169 0,293 Nuclear receptor coactivator 1 inhibitor 0,167 0,009 Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor 0,157 0,054 Ribosomal protein S6 kinase inhibitor 0,155 0,009 Phosphatidylinositol 3-kinase alpha inhibitor 0,151 0,135 Histone acetyltransferase inhibitor 0,141 0,289 Transcription factor NF kappa B1 inhibitor 0,135 0,445 Autophagy inducer 0,128 0,251 Hypoxia-inducible factor 1 alpha inhibitor 0,117 0,100 AMP-activated protein kinase, beta-1 subunit inhibitor 0,109 0,212 Neurotrophic factor enhancer 0,107 0,012 Phosphatidylinositol 3-kinase beta inhibitor 0,101 0,672 Histone deacetylase SIRT6 inhibitor

Продолжение таблицы 6.7

Наименование препарата	Значения P_a и P_i , прогнозируемая активность
Уролитин А, Urolithin A	0,831 0,003 Antimutagenic 0,800 0,002 SMAD3 inhibitor 0,738 0,003 RAGE receptor antagonist 0,683 0,017 Nuclear receptor coactivator 3 inhibitor 0,680 0,005 Free radical scavenger 0,665 0,007 Antioxidant 0,619 0,025 Transcription factor NF kappa B inhibitor 0,614 0,018 Transcription factor STAT1 inhibitor 0,574 0,005 Transcription factor NF kappa B1 inhibitor 0,531 0,004 NF-E2-related factor 2 stimulant 0,469 0,013 Anti amyloidogenic 0,466 0,070 Autophagy inducer 0,457 0,004 Neurotrophic factor enhancer 0,431 0,023 Hypoxia-inducible factor 1 alpha inhibitor 0,346 0,034 Nuclear receptor coactivator 1 inhibitor 0,340 0,038 Transcription factor STAT inhibitor 0,320 0,052 Mitochondrial electron transport inhibitor 0,320 0,044 Transcription factor STAT3 inhibitor 0,295 0,004 Estradiol 17 beta-dehydrogenase inhibitor 0,282 0,021 Lipid peroxidase inhibitor 0,247 0,005 TRKB agonist 0,211 0,023 Chelator 0,209 0,027 Cyclooxygenase 2 inhibitor 0,206 0,005 Transcription factor RelA inhibitor 0,189 0,035 Histone deacetylase SIRT1 inhibitor 0,177 0,102 Histone acetyltransferase inhibitor 0,172 0,325 Transcription factor STAT5 inhibitor 0,159 0,013 Insulin like growth factor 2 antagonist 0,149 0,043 Histone deacetylase class III inhibitor 0,145 0,025 Transcription factor STAT6 inhibitor 0,143 0,363 Histone deacetylase SIRT6 inhibitor 0,141 0,004 Estradiol 17 beta-dehydrogenase 1 inhibitor 0,139 0,005 Histone deacetylase SIRT2 stimulant 0,133 0,048 Histone acetyltransferase KAT2A inhibitor 0,131 0,004 Estradiol 17 beta-dehydrogenase 3 inhibitor 0,117 0,100 AMP-activated protein kinase, beta-1 subunit inhibitor 0,114 0,025 Chelator, Iron 0,100 0,086 Histone acetyltransferase KAT5 inhibitor
Вилдаглиптин, Vildagliptin	0,159 0,278 Histone deacetylase SIRT6 inhibitor 0,153 0,430 SMAD3 inhibitor 0,130 0,076 Neurotrophic factor 0,117 0,480 Mitochondrial electron transport inhibitor

P_a и P_i – оценки вероятностей проявления (P_a) и отсутствия (P_i) данного вида активности. Результаты прогноза упорядочены по убыванию разности $P_a - P_i$.

Как видно из представленных в таблице 6.7 данных, для каждого из 17 референтных соединений прогнозируется определенное число механизмов геропротекторного действия. При этом имеют место значительные качественные и количественные различия, что объясняется как высокой сложностью и

мультитаргетной природой геропротекторного действия, так и многообразием механизмов действия референтных соединений.

По-видимому, при поиске новых геропротекторов среди разрешенных к медицинскому применению лекарственных препаратов (репозиционирование лекарств) отбор должен осуществляться с учетом возможно большей широты прогнозируемых спектров активности и повышенных расчетных значений вероятности наличия активности (Pa).

6.5. Заключение к Разделу 6

Работы по п.1.6 ПГ в соответствии с пп.3.6, 4.6 и 5.6 ТЗ выполнены в полном объеме. За отчетный период сформированы наборы данных по известным геропротекторам, построены модели зависимостей «структура – геропротекторная активность» на основе методов машинного обучения, проведена их валидация.

Обучающая выборка, подготовленная на основе информации из базы данных DrugAge в комбинации со случайным образом выбранными условно неактивными соединениями из базы данных PubChem, позволила с использованием методов машинного обучения, реализованных в программе PASS, построить модели зависимостей для прогнозирования геропротекторной активности для модельных организмов, включая *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rattus norvegicus* и др. Средняя точность прогноза при скользящем контроле с исключением по одному IAP = 0,903, а при перекрестном контроле с разбиением выборки на 20 частей IAP = 0,902. Аналогичные оценки для обобщенной активности «Geroprotector (All studies)» (удлинение продолжительности жизни хотя бы для одного вида модельных животных) составили 0,874 и 0,875, соответственно. Таким образом, полученные модели (Q)SAR обладают высокой точностью и предсказательной способностью. Они могут использоваться для виртуального скрининга соединений, обладающих геропротекторной активностью по отношению к 11 видам модельных организмов.

На основе данных из публикации [326] подготовлена обучающая выборка, содержащая информацию о 2342 соединениях, исследованных на сенолитическую активность. Активность измеряли при двух концентрациях, 10 мкМ и 1 мкМ. В первом случае было найдено 45 активных веществ, во втором - только 6.

Классификационные модели были построены с помощью программы Sarmath с использованием выборки соединений, сенолитическая активность которых была определена при 10 мкМ. Для этой модели сбалансированная точность составила 0,66, а значение AUC – 0,70. При ретроспективной валидации на независимой тестовой выборке, содержащей 268 не входящих в обучающую выборку соединений, были правильно классифицированы все 25 известных сенолитиков. Прогноз активности для референтных соединений с применением данной модели был положительным для 5 из 8 известных сенолитиков. Таким образом, построенная нами модель (Q)SAR зависимости «структура – сенолитическая активность» может использоваться для отбора структур, потенциально обладающих сенолитической активностью, путем виртуального скрининга баз данных коммерчески доступных образцов.

На основе сопоставления рассматриваемых в литературе механизмов действия потенциальных геропротекторов [373] с прогнозируемыми PASS 2024 видами биологической активности реализована специализированная версия программы PASS GERO. Эта программа позволяет с высокой точностью прогнозировать 115 механизмов геропротекторного действия (IAP=0,967; 20-Fold IAP = 0,966). PASS GERO целесообразно использовать при поиске новых геропротекторов среди разрешенных к медицинскому применению лекарственных препаратов; при этом отбор наиболее перспективных «кандидатов» должен осуществляться с учетом возможно большей широты прогнозируемых спектров активности и высоких оценок вероятности наличия активности.

Предполагается, что комбинированное применение трех описанных выше подходов повысит надежность отбора потенциальных геропротекторов при виртуальном скрининге больших баз данных.

Также целесообразно продолжить работу над развитием обучающих выборок, как с учетом необходимости их пополнения новой информацией по потенциальным геропротекторам, так и принимая во внимание эволюцию представлений о геропротекции в целом.

Работы по п.1.6 ПГ выполнены в полном объеме в соответствии с пп.3.6, 4.6 и 5.6 ТЗ.

7. СБОР БИОМАТЕРИАЛА (И СОПУТСТВУЮЩЕЙ ДЕТАЛЬНОЙ КЛИНИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ) 900 ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП: 18-44 ГОДА (МОЛОДОЙ ВОЗРАСТ), 45-59 ЛЕТ (СРЕДНИЙ ВОЗРАСТ), 60-74 ГОДА (ПОЖИЛОЙ ВОЗРАСТ), 75-90 ЛЕТ (СТАРЧЕСКИЙ ВОЗРАСТ), БОЛЕЕ 90 ЛЕТ - ДОЛГОЖИТЕЛИ И ПЕРЕДАЧА ОБРАЗЦОВ В ГОЛОВНУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА (ЧАСТЬ 1)

Работы по п.1.7 ПГ выполнялись Соисполнителем - ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России), обособленное структурное подразделение Российский-геронтологический научно-клинический центр (ОСП РГНКЦ) по Договору № 11К/223 от 16 августа 2024, заключенному в рамках текущего проекта.

7.1. Формирование коллекции биоматериала

Целью работ по п.1.7 ПГ являлось: формирование коллекции биоматериала для выявления молекулярных основ возраст-зависимых процессов в организме человека и разработки системы определения биологического возраста.

В соответствии с целью были поставлены и решены следующие задачи:

1. Выполнен анализ литературы по тематике НИР, выбраны оптимальные параметры включения/исключения биологических образцов для формирования коллекции биоматериала, которые позволяют получить результаты, необходимые для разработки системы определения биологического возраста.
2. Сделан анализ существующих методов и подходов в области разработки систем определения биологического возраста, обосновывающий выбор возрастных групп для включения биологических образцов в первую часть коллекции биоматериала.
3. Разработан необходимый перечень показателей и состав сопутствующей детальной клинической информации для передаваемых образцов (включая клинико-антропометрическую и социо-демографическую характеристику доноров биоматериала в виде таблицы).

4. Собраны и переданы в Головную организацию образцы, составляющие первую часть коллекции биоматериала людей разных возрастных групп, и сопутствующая детальная клиническая информация участников исследования (включая клинико-антропометрическую и социо-демографическую характеристику доноров биоматериала в виде таблицы).
5. Проведен критический анализ открытых литературных источников и баз данных с целью формирования предварительной панели протеомных маркеров.
6. Разработана предварительная панель протеомных маркеров на основе открытых литературных источников и баз данных.

Согласно п 3.7. ТЗ в результате выполнения работ должен быть получен результат «Коллекция биоматериала и собрана сопутствующая детальная клиническая информация людей разных возрастных групп (Часть 1)»

Ниже коротко приведены сведения о составе работ Соисполнителя и отчетных материалах с описанием работ и полученных результатов согласно п 4.7 ТЗ.

Сбор биоматериала (и сопутствующей детальной клинической информации) здоровых людей разных возрастных групп: 18-44 года (молодой возраст), 45-59 лет (средний возраст), 60-74 года (пожилой возраст), 75-90 лет (старческий возраст), более 90 лет - долгожители и передача образцов в головную организацию для проведения масс-спектрометрического анализа включает:

1. Работы «сбор первой части коллекции биоматериала (и сопутствующей детальной клинической информации) — не менее 150 здоровых людей из трех когорт (молодые, 18-25 лет; среднего возраста, 45-55 лет; и старческого возраста, от 75 лет), для проведения первого этапа протеомного анализа на втором году реализации проекта».

На основании анализа научной и научно-технической литературы были сформированы:

- критерии включения и невключения участников в исследование;
- перечень требований к сбору биоматериала;
- перечень показателей для анализа и состав сопутствующей клинической и социо-демографической информации для сбора и передчи в Головную организацию.

1.1. Критерии включения/исключения участников.

Критерии включения:

- Письменное информированное согласие на участие в исследовании.
- Возраст старше 18 лет.

Критерии невключения (исключения):

- Отказ от участия в исследовании или предоставления информированного согласия.

- Наличие инфекционных заболеваний (гепатит С, гепатит В, включая носительство HBsAg, ВИЧ-инфекции). Инфекционные заболевания, особенно хронические вирусные инфекции, такие как гепатиты и ВИЧ, могут значительно ускорять старение за счет хронического воспаления и иммунного стресса (воспалительное старение). Эти состояния могут приводить к ускоренному старению тканей, органов и систем (например, печени при гепатите), искажают оценку биологического возраста и мешают адекватной интерпретации данных.

- Наличие острого заболевания или состояния, обострения хронического воспалительного заболевания, либо хирургического вмешательства в течение последнего месяца до включения в исследование. Острые состояния и обострения воспалительных процессов создают резкий всплеск воспаления и оксидативного стресса в организме, что временно ускоряет процессы старения в тканях и системах, таких как сердечно-сосудистая или иммунная. Это может нарушить оценку биомаркеров старения и повлиять на результаты исследования.

- Отсутствие ремиссии онкологического заболевания или поддерживающая противоопухолевая терапия менее чем за три месяца до включения. Онкологические заболевания и их лечение (например, химиотерапия) связаны с интенсивным стрессом на клеточном и органном уровне и ускорением процессов старения. Противоопухолевая терапия может приводить к повреждению ДНК, угнетению клеточной пролиферации и хроническому воспалению, что нарушает оценку биологического возраста.

- Выраженные когнитивные или сенсорные нарушения и психиатрические заболевания, препятствующие контакту с исследуемым. Психиатрические и когнитивные расстройства затрудняют проведение корректной оценки и соблюдение участниками условий протокола исследования. Кроме того, такие состояния, как депрессия и хронический стресс, могут сами по себе ускорять

старение через механизмы дисрегуляции оси гипоталамус-гипофиз-надпочечники и увеличивать системное воспаление.

- Тяжёлые формы хронических неинфекционных заболеваний (жизнеугрожающие нарушения сердечного ритма, нестабильная стенокардия, хроническая сердечная недостаточность 3-4 ФК, хроническая болезнь почек С3б-С5, сахарный диабет 1 типа, сахарный диабет 2 типа с терминальными стадиями осложнений, системные заболевания соединительной ткани, остеоартроз IV ФК, а также ОНМК, ОИМ, низкоэнергетические переломы в анамнезе). Хронические тяжелые заболевания, такие как сердечная недостаточность и сахарный диабет 1 типа, часто являются моделями ускоренного старения. Например, сахарный диабет 1 типа связан с усиленной гликацией белков, которая ускоряет повреждение тканей и способствует преждевременному старению сосудов. Эти состояния значительно изменяют базовые биомаркеры старения, что усложняет интерпретацию влияния вмешательств на биологический возраст.

- Беременность, период грудного вскармливания. Беременность и лактация связаны с серьезной гормональной перестройкой и повышенными метаболическими затратами, что может исказить оценку биологических процессов старения, включая изменения уровня воспалительных маркеров и гормональных показателей.

- Любые другие факторы, которые, по мнению исследователя, могут препятствовать включению участника в исследование.

1.2. Обследование участников, сбор и передача биоматериала.

В рамках визита участников исследования, подходящих по критериям включения/невключения было проведено анкетирование, антропометрические измерения, ряд тестов для оценки физического и когнитивного статуса, а также забор образцов биоматериала, которые в последующем будут использованы для оценки протеомных биомаркеров.

Одним из ключевых этапов визита был забор образцов биологического материала, в частности венозной крови и выделение плазмы крови, для дальнейшего анализа биомаркеров старения.

2. Работы «Ответственное хранение биоматериала в биобанке до передачи в головную организацию».

Забор крови осуществлялся специально обученным медицинским персоналом в соответствии с СОП (Приложение В), включая использование вакуумных систем забора, стерильных игл и транспортных пробирок с антикоагулянтом К2-ЭДТА. Особое внимание уделялось преаналитическому этапу: время суток и состояние натошак, чтобы минимизировать вариабельность показателей.

Краткое описание процедуры: образцы крови забирали в вакуумные пластиковые пробирки с К2-ЭДТА. Сразу после забора крови проводили процедуру получения плазмы. Для этого пробирки с кровью центрифугировали при 3000 об/мин в течении 10 минут. С помощью дозатора аликвоты плазмы распределяли по пробиркам эппендорф в количестве от 1 до 1,5 мл. После приготовления аликвот пробирки замораживали при температуре -80оС для длительного хранения.

До передачи в Головную организацию, все образцы собирали и хранили в биобанке в соответствии с международными требованиями и практикам ISBER (Международного общества биологических и экологических хранилищ).

В результате была сформирована коллекция биоматериала, включавшая образцы 150 человек разных возрастных групп. Образцы были переданы в биобанк Головной организации в два этапа, в строгом соответствии с календарным планом работ. Транспортировка образцов осуществлялась с соблюдением холодовой цепи и утвержденных логистических протоколов. Была исключена разморозка или частичная разморозка биоматериала на всех этапах транспортировки от исполнителя в головную организацию. Передача биоматериала фиксировалась составлением актов приема-передачи образцов (Приложения Г и Д).

3. Работы «создание предварительной панели протеомных маркеров (AP-маркеров) на основе открытых литературных источников и баз данных описаны в Разделе 5 отчета «КНП.46-Отчет_Соисполнитель РГНКЦ_этап1-2024. pdf».

В данной работе применен гибридный метод поиска потенциальных биомаркеров, которые могут быть включены в панель, содержащую не только данные отдельных исследований и мета-анализов, но данные различных платформ и проектов, изучающих процессы старения на различных уровнях реализации генетической информации.

На платформах и проектах (Human Ageing Genomic Resources, KEGG, STRING, Aging Atlas, Human Aging and Longevity Landscape, The Human Protein Atlas, UniProt)

отбиралась информация, касающаяся возраст-ассоциированных заболеваний, биологических процессов, связанных со старением. Таким образом обеспечивался широкий подход к формированию панели протеомных биомаркеров. В некоторых случаях отсутствовала информация о представленности или концентрации белков в плазме. Тогда белки отбирались по принципу “guilt by association”. Для этого использовалась кластеризация по биологическим процессам по базе Gene Ontology (GO) либо анализ белок-белковых взаимодействий анализируемого белка с известным белком, ассоциированным с процессом старения.

Особенно ценными источниками данных оказались публикации, упоминаемые на платформах и в проектах, так как такие исследования были заранее отобраны специалистами в данной области. Для каждой из таких публикаций был проведен отдельный анализ представленной информации. Для формирования предварительной панели протеомных биомаркеров использовались только биомаркеры, которые были отобраны авторами данных работ, как наиболее представленные, имеющие высокие значения концентраций в плазме крови.

Мета-анализы, содержащие информацию о протеомных биомаркерах, отбирались по ключевым словам (proteome, aging, proteome markers, aging-related diseases), по наличию информации о количестве участников исследования, методе количественной оценки белков в плазме крови и количестве отобранных авторами биомаркеров. В мета-анализах также, как правило, содержались дополнительные материалы, в которых были представлены избыточные списки белков, не всегда являющихся значимыми по причине особенностей дизайна эксперимента. Из них отбирались только высокопредставленные (по значениям в таблицах) белки и белки с высокими концентрациями (пороговые значения также указывались самими авторами). Первую группу мета-анализов составили те, информация из которых является основой баз данных протеомных маркеров (всего 19). В дополнение к ним, в рамках НИР было проанализировано 9 мета-анализов. В общей сложности в них входит информация о почти 106000 человек в возрастном диапазоне от 1 года до 103 лет. Проанализировано около 12000 белков. Отдельную группу интереса составляют гены, ассоциированные с процессами старения. Учитывая сложность в формировании панелей биомаркеров, обнаружить новые белки достаточно сложно, поэтому в предварительную панель также были включены и гены, белковые

продукты которых с высокой вероятностью (упоминание в нескольких источниках) могут быть представлены плазме крови.

Согласно п 5.7 ТЗ работы «Сбор биоматериала (и сопутствующей детальной клинической информации) 900 здоровых людей разных возрастных групп: 18-44 года (молодой возраст), 45-59 лет (средний возраст), 60-74 года (пожилой возраст), 75-90 лет (старческий возраст), более 90 лет - долгожители и передача образцов в головную организацию для проведения масс-спектрометрического анализа» должны соответствовать требованиям:

1. «Сбор биоматериала должен выполняться согласно требованиям законодательства, под контролем квалифицированного персонала, с соблюдением требований безопасности к выполнению данного вида работ, биоматериал должен депонироваться в биобанк для обеспечения надежного криохранения с использованием морозильных камер». Требование выполнено (Приложение В)
2. «Образцы должны быть подготовлены для передачи в специальных условиях с соблюдением температурного режима. Образцы должны храниться с использованием лабораторного пластика (пробирок), устойчивого к заморозке, с применением штативов для хранения биоматериала. Сопутствующая клиническая информация передается в виде предварительно подготовленной базы данных с использованием любого подходящего программного обеспечения (Excel, Access или их аналогов);». Требование выполнено, см. Приложение В.
3. «Передача биоматериала должна выполняться согласно требованиям безопасности, при участии специально обученного и квалифицированного персонала;» Требование выполнено, см. Приложение В.
4. «Биоматериал должен транспортироваться с соблюдением температурного режима не ниже -20С с применением либо морозильного оборудования для транспортировки, либо хладагентов». Требование выполнено, см. Приложение В.
5. «должна быть исключена разморозка или частичная разморозка биоматериала на всех этапах транспортировки от исполнителя в головную организацию» Требование выполнено, в результате транспортировки с соблюдением холодовой цепи образцы предоставлены в замороженном виде, см. Приложения Г и Д.

Согласно п.6.1.3 и 6.1.4 ТЗ должны быть разработаны документы:

1. Акт о создании коллекции биоматериала с метаданными (Приложения Г и Д);
2. Акт приема-передачи образцов биоматериала Приложение Е.

7.2. Размещение образцов в биобанке ИБМХ и сопроводительной информации в системе «Биовитрина»

Биологические образцы в рамках проекта от Банка биологических образцов Института изучения старения РГНКЦ имени Н.И. Пирогова двумя партиями. Первая партия в количестве 100 образцов была получена 26 сентября 2024 г. Вторая партия в количестве 50 образцов была получена 19 ноября 2024 г.

Транспортировка образцов осуществлялась с сохранением холодовой цепи в транспортном термоконтейнере с хладоэлементами. Образцы были в замороженном состоянии. После алиquotирования биологических образцов производили их регистрацию с использованием специального программного обеспечения «Samples Inventory Management Software» с последующим импортированием данных на информационно-цифровую платформу «Биовитрина».

Каждый образец сопровождался аннотированными данными, которые свободно доступны на платформе «Биовитрина» по адресу <https://bb.ibmc.msk.ru/Main/Home>. Каждый образец содержит следующую информацию: barcode, ID донора, тип биоматериала, пол, возраст, рост, вес, ИМТ, доступный объем, клинический партнер.

Для просмотра данных в каталоге образцов необходимо выбрать группу «Условно здоровые добровольцы» (см рисунок 7.1 а). Для быстрого поиска первой партии в фильтре тип патологии выбрать – Партия 1. (см рисунок 7.1 б). Для заказа всех 100 образцов выбрать – Добавить все образцы в корзину (см рисунок 7.1 в). Далее перейти в корзину и указать необходимый объем ко всем выбранным образцам, затем подтвердить заказ нажатием кнопки внизу страницы заказа – Оформить заказ (см рисунок 7.1 г). Для быстрого поиска второй партии в фильтре тип патологии выбрать - Партия 2.

Остальные шаги аналогичны алгоритму, описанному для Партии 1.

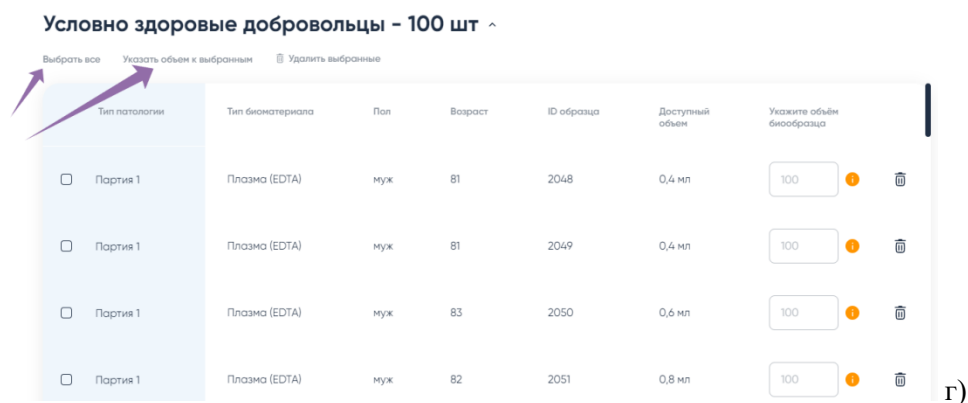
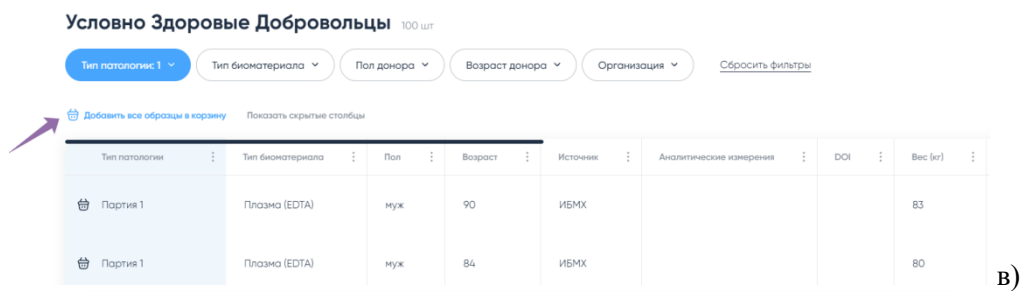
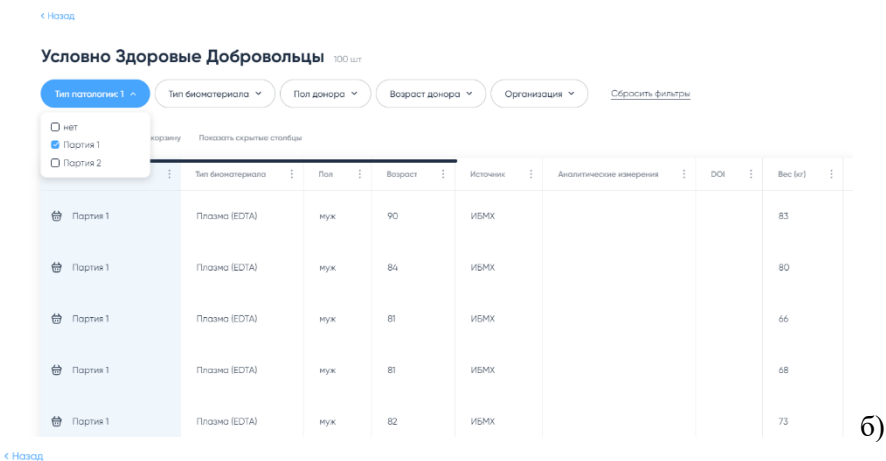
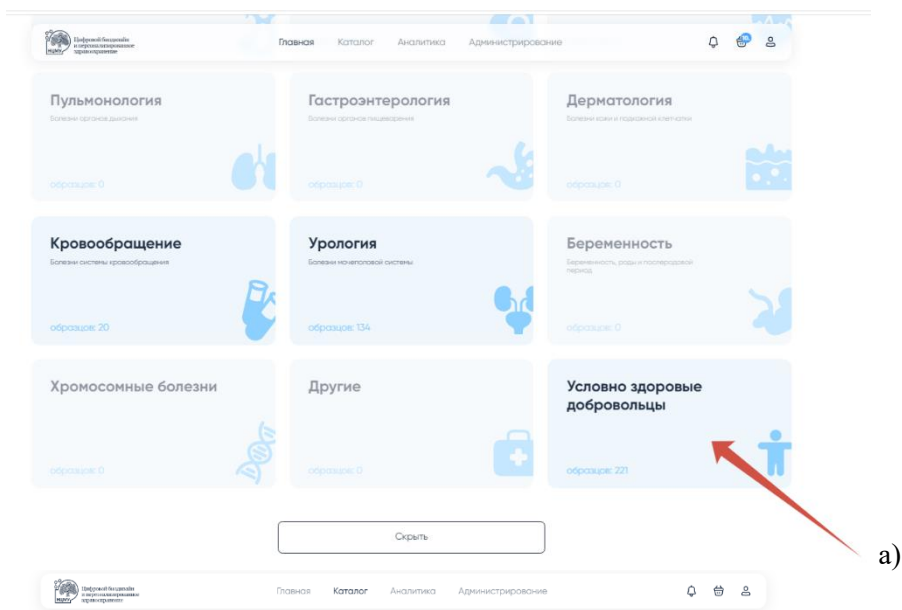


Рисунок 7.1 – Скриншоты страниц информационно-цифровой платформы «Биовитрина»

8. ПРОВЕДЕНИЕ ПАНОРАМНОГО ПРОТЕОМНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ 50% ОБРАЗЦОВ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ УЛЬТРАКОРОТКИХ ГРАДИЕНТОВ

8.1. Разработка протокола роботизированной пробоподготовки образцов для протеомного анализа в формате 96 луночного планшета

Подготовка образцов к масс-спектрометрическому анализу включает в себя множество этапов. При выполнении этого процесса вручную существует высокая вероятность ошибки, которая может негативно отразиться на аналитической точности результатов. Пробоподготовка с использованием роботизированной станции обеспечивает высокую точность и значительно повышает производительность методики. Тщательная разработка протокола, подбор условий инкубации, реагентов, учет особенностей биологического материала может увеличить воспроизводимость методики и снизить вероятность ошибки на этапе подготовки образца. Исходя из этого первоначально был разработан протокол роботизированной подготовки образцов для протеомного анализа в формате 96-луночного планшета, представленный в виде Приложение Ж «Протокол роботизированной пробоподготовки образцов для проведения анализа в формате 96 луночного планшета» с прилагаемым видеофайлом в формате .mp4. В соответствии с п. 4.8. ТЗ данный роботизированный способ пробоподготовки, включает в себя стадии солюбилизации и экстракции белков образца (пп. 8-9 Протокола), восстановление и алкилирование (пп. 10-12 Протокола) и расщепление белков трипсином в растворе (пп. 13-20 Протокола). Разработанный протокол может быть применим для широкого спектра биологических образцов, прежде всего, для образцов биологических жидкостей человека, включая сыворотку и плазму крови.

8.2. Разработка протокола для ультракоротких методов панорамного протеомного анализа

Следующим этапом работ стала разработка метода протеомного анализа с использованием ультракоротких градиентов хроматографического разделения белков. Часть образцов (N=25), которая включала в себя 2 группы добровольцев: 1) в возрасте от 63 до 85 лет (N=13) и 2) в возрасте от 19 до 25 лет (N=12), была отобрана для проведения стандартного протеомного анализа с использованием обычной

длительности градиента хроматографического градиента разделения полученной после гидролиза трипсином пептидной смеси, составляющей 90 минут. В данном случае масс-спектрометрический анализ осуществлялся в режиме DDA (Data Dependent Acquisition) с применением панорамного сканирования с изоляцией родительских ионов, их дальнейшей фрагментацией и анализом дочерних ионов для определения структуры пептида. В результате такого стандартного протеомного анализа было достоверно (с обнаружением не менее двух пептидов на белок) идентифицировано 172 белка. Полученное количество и состав идентифицированных белков использовали далее в качестве списка сравнения результатов идентификации белков при разработке протокола панорамного анализа с использованием ультракоротких градиентов. Также методы пробоподготовки, анализа и биоинформационной обработки были апробированы на модельной системе, как описано в публикации, подготовленной в рамках проекта [374].

Для элиминации эффекта уменьшения количества идентифицированных белков при уменьшении градиента хроматографического разделения, неизбежного для панорамного анализа в режиме DDA, при разработке протокола была использована другая современная стратегия получения масс-спектрометрических данных - режим DIA (Data-Independent Acquisition). В методе DIA ионы-предшественники выделяются в заранее определенные окна изоляции и фрагментируются; все фрагментированные ионы в каждом окне затем анализируются на масс-спектрометре высокого разрешения. То есть в режиме DIA вместо того, чтобы выбирать наиболее представленные ионы предшественников (то есть пептиды с определенным соотношением массы и заряда) для дальнейшего анализа в зависимости от данных (как происходит при режиме DDA), масс-спектрометр настраивается на циклическое прохождение через заранее определенный набор окон выделения предшественников и последовательно фрагментирует все предшественники в интересующем диапазоне масс. Данный масс-спектрометрический подход приобретает популярность в последние годы, поскольку развитие инструментария и программного обеспечения для анализа получаемых данных позволило усилить такие преимущества DIA, как высокая глубина и полнота протеомных данных наряду со значительным улучшением количественной оценки содержания белков в образцах по сравнению со

стандартным панорамным анализом [375].

Первоначально с использованием того же самого набора из 25 образцов крови здоровых добровольцев был проведен панорамный протеомный анализ в режиме DIA с градиентом хроматографического разделения 45 минут, и в результате было получено 306 достоверно идентифицированных белков. Далее в ходе разработки методики проводили анализ с использованием более коротких градиентов на небольшом количестве образцов плазмы крови (N=3) с использованием масс-спектрометра высокого разрешения OrbiTrap. При этом анализ с ультракоротким градиентом также проводили на масс-спектрометре высокого разрешения Q-TOF. В таблице 8.1 приведены данные по результатам протеомного анализа плазмы крови человека с использованием разных по длительности хроматографических градиентов и с использованием двух типов масс-спектрометрических детекторов высокого разрешения.

Таблица 8.1 – Длительность градиента, используемого для хроматографического разделения пептидов при панорамном протеомном анализе в режиме DIA и результаты идентификации белков при помощи разных масс-спектрометров высокого разрешения

Длительность градиента	Количество образцов в анализе	Количество достоверно идентифицированных белков, OrbiTrap	Количество достоверно идентифицированных белков, Q-TOF
Короткий (45 мин)	25	306	-
Короткий (30 мин)	3	275	-
Ультракороткий (12-15 минут)	3	186	150

Как видно из таблицы 8.1 применение даже ультракороткого градиента при панорамном протеомном анализе в режиме DIA позволяет получить сопоставимое количество достоверно идентифицированных белков по сравнению с панорамным анализом в режиме DDA. Поэтому далее был разработан протокол для ультракоротких методов панорамного протеомного анализа, который применим с массового скрининга белков биологических образцов за ограниченное время анализа.

Таким образом, разработанный метод панорамного протеомного анализа образцов крови позволяет проводить протеомное исследование на масс-спектрометре высокого разрешения типа OrbiTrap в двух технических повторах с

длительностью хроматографического градиента не более 15 минут, что соответствует п. 5.8 ТЗ. Данный метод представлен в виде Приложения И «Протокол для ультракоротких методов панорамного протеомного анализа».

8.3. Разработка протокола биоинформатической обработки данных панорамного протеомного анализа

Разработку протокола биоинформатической обработки данных панорамного протеомного анализа с использованием ультракоротких градиентов хроматографического разделения проводили на основе общедоступного программного пакета DIA-NN, который использует глубокие нейронные сети и новые стратегии количественной оценки и коррекции сигнала для обработки протеомных данных, полученных в режиме DIA. DIA-NN повышает эффективность идентификации и количественной оценки при обычном применении DIA в протеомике и особенно эффективен при высокопроизводительном анализе с использованием масс-спектрометров высокого разрешения, поскольку он достаточно быстро работает и обеспечивает глубокое и уверенное покрытие протеома при использовании в сочетании с быстрыми хроматографическими методами [376].

Разработанный подход биоинформатической обработки данных панорамного протеомного анализа с использованием ультракоротких градиентов хроматографического разделения основан на двух способах анализа масс-спектрометрических данных как с использованием «спектральной библиотеки» - набора известных спектров и времен удерживания для выбранных пептидов, так и в режиме «без библиотеки» с помощью поиска по базе данных последовательностей. Данный протокол представлен в виде Приложения К «Протокол биоинформатической обработки данных панорамного протеомного анализа».

8.4. Заключение к Разделу 8

В ходе работ согласно п.1.8 ПГ проведен панорамный протеомный анализ 50% (N=75) от переданных на анализ образцов крови здоровых доноров при помощи хромато-масс-спектрометра высокого разрешения типа Orbitrap в двух технических повторях с длительностью хроматографического градиента не более 15 минут, что

соответствует п. 5.8 ТЗ. В соответствии с п.6.1.5 ТЗ были разработаны протоколы роботизированной пробоподготовки образцов для протеомного анализа в формате 96 луночного планшета, протокол для ультракоротких методов панорамного протеомного анализа и протокол биоинформатической обработки данных панорамного протеомного анализа. Для 25 образцов (более 10% от 150 образцов – общего количества образцов крови здоровых доноров) протеомный анализ включал в себя роботизированную пробоподготовку с использованием разработанного Протокола для солюбилизации белков образца и их расщепления трипсином в растворе (согласно п.4.8 ТЗ).

Работы по п.1.8 ПГ выполнены в полном объеме в соответствии с пп. 3.8, 4.8 и 5.8 ТЗ.

По результатам работы подготовлена публикация Ivanov, S.M.; Zgoda, V.G.; Isakova, V.A.; Trukhanova, L.S.; Poroikov, V.V.; Shtil, A.A. Proteomic Analysis Identifies Multiple Mechanisms of 5-Fluorouracil-Induced Gut Mucositis in Mice. *Cancers* **2024**, *16*, 4025. <https://doi.org/10.3390/cancers16234025> (Публикация №5 в составе пакета отчетной документации).

9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ БЕЛКОВ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ АНАЛИЗА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ДОНОРОВ РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП

Целью работ по п.1.9.ПГ являлось определение перечня белков, перспективных для анализа в плазме крови доноров различных возрастных групп. Знания о различных темпах старения органов и тканей имеют важное значение для кластеризации индивидов и выявления источников возрастной дисфункции, лежащих в основе возникновения заболеваний.

Старение имеет свои индивидуальные темпы у каждой ткани, органа [318,377] и каждого человека [378], а зависимость биомаркеров старения от возраста часто носит нелинейный характер, что подчеркивает необходимость их периодической комплексной оценки в течение всей жизни [379]. Статус старения оценивается не хронологическим возрастом, а биологическим - количественным показателем индивидуальной скорости старения. Отличия в темпах старения органов у отдельно взятых людей [380] и разница в моделях показывают, что для конкретного человека может быть несколько часов старения, характерных для каждой ткани или органа. Например, возраст печени предсказывает течение неалкогольной жировой болезни печени, а смертность, вызванную сердечными заболеваниями, лучше предсказывает сердечно-сосудистый возраст по сравнению с возрастом печени и почек [316].

Основными признаками старения на сегодня принято считать целую группу взаимосвязанных факторов (например, геномную нестабильность, истощение теломер, эпигенетические изменения, потерю протеостаза, нарушение макроаутофагии или регуляции восприятия питательных веществ, митохондриальную дисфункцию, истощение стволовых клеток, измененную межклеточную коммуникацию, хроническое воспаление и дисбактериоз [193]), а также повреждение внеклеточного матрикса [381] и целостности физиологических барьеров [382]. Часть из этих факторов неоднозначно характеризуют биологический возраст. Например, длина теломер имеет низкую корреляцию с хронологическим возрастом ($R = 0,07$), что предполагает ограничения использования данного фактора для оценки биологического возраста [383]. Не вызывает сомнения востребованность механистических часов старения, которые отражают факторы повреждения, как для целей профилактической медицины, так и для клинических исследований новых

геропротекторных интервенций.

Протеомное старение имеет связь с основными хроническими заболеваниями, включая заболевания сердца, печени, почек и легких, диабет, нейродегенерацию и рак [112]. Кровь является одним из легкодоступных типов биологического материала, отражающего изменения белкового профиля различных тканей и органов [384], в том числе, при старении отдельных органов. В этой работе плазма крови выбрана ввиду ее хорошей изученности, а также доступности масс-спектрометрических данных и референсных значений концентраций белков у здорового человека [385,386].

В исследовании потенциала использования профиля белков плазмы для прогнозирования возраста достигнуты определенные успехи. Так, профиль циркулирующих белков плазмы может быть использован для точного прогнозирования хронологического возраста, а также антропометрических показателей [110]. Исследования часов старения также охватывают поиск прогнозируемого возраста смерти [114], риск смертности [111] и изучение долголетия [119,122]. Интересным для изучения старения вопросом остается различия в этом процессе у мужчин и женщин. В исследовании продолжительности жизни 2019 года показано, что 2/3 найденных белков (895 из 1379), изменяющихся с возрастом, также изменяются с полом [115].

Несмотря на накопленный исследователями опыт в области изучения старения, важным аспектом нахождения универсальных биомаркеров старения является их применимость в разных популяциях людей [387]. Таким образом, крайне важным фактором будет проверка предлагаемых биомаркеров в разных странах, по половому признаку, по этнической принадлежности и по другим демографическим факторам.

Для нахождения перечня белков, важных для диагностики заболеваний, связанных с возрастными изменениями, в этой части работы мы сконцентрировались на поиске наиболее универсальных маркеров, найденных в нескольких исследованиях на разных популяциях, охватывающих образцы сыворотки и плазмы людей в возрасте от 10 до 110 лет. В перспективе сформированный перечень может стать основой создания масс-спектрометрического набора для количественной оценки представленности

выбранных белков в плазме крови человека и определения биологического возраста. Для количественной оценки потенциальных универсальных биомаркеров старения мы предлагаем использовать таргетные методы, такие как мониторинг выбранных/множественных реакций (selected/multiple reaction monitoring, SRM/MRM) с использованием синтезированных изотопно-меченных пептидных стандартов. Этот метод позволяет не только детектировать белки в биоматериале, но и получить абсолютную количественную оценку их содержания, что является важным фактором для дальнейшего применения списков в медицине [385].

9.1. Материалы и методы

Согласно п 4.9. ПГ Определение перечня белков, важных для диагностики социально значимых заболеваний и/или заболеваний, связанных с возрастными изменениями, должно включать анализ литературы и данных публичных репозиториев.

После тщательного анализа литературных источников и баз данных, приведенных в отчете Соисполнителя (см. Раздел 7), проведен отбор белков, ассоциированных со старением и развитием возраст-зависимых заболеваний, которые могут быть обнаружены с использованием масс-спектрометрического метода в плазме крови человека (Рисунок 9.1).

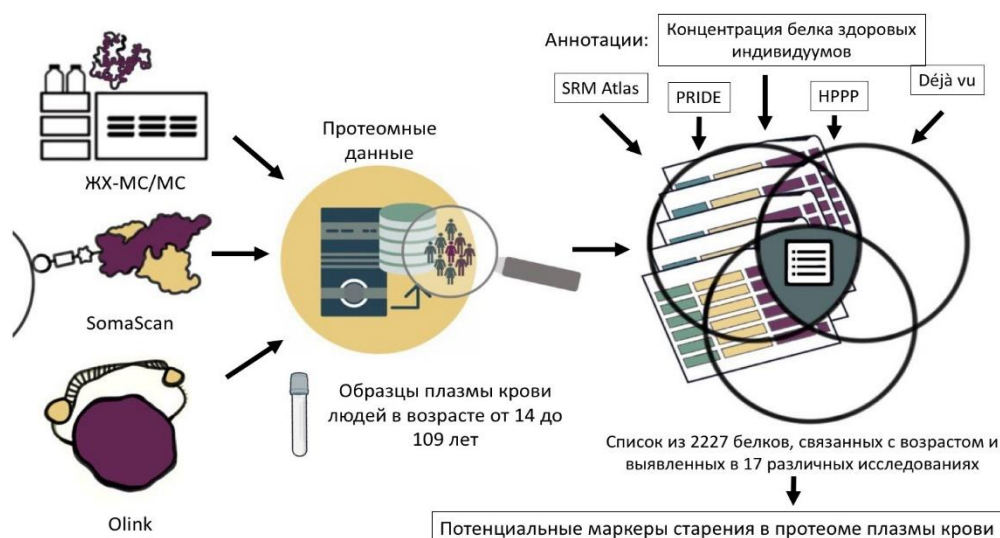


Рисунок 9.1 – Отбор ассоциированных со старением и развитием возраст-зависимых заболеваний белков, которые могут быть обнаружены с использованием масс-спектрометрического метода в плазме крови человека. Адаптировано из [30]

Выбор публикаций для анализа производился по запросу “*proteomics aging clock*” с помощью базы данных PubMed [388]. Из отобранных работ загружали перечни белков, найденные в сыворотке или плазме крови и показывающих связь со старением.

На основе загруженных перечней формировали общий список белков с указанием количества экспериментов в протеомных базах данных PRIDE [389] и SRMAtlas [390], полученных для различных тканей и биологических жидкостей человека, а также данных о количественном содержании белка в плазме крови здорового человека (на основе публикации [385]). Для каждого белка рассчитывали его частоту встречаемости в наборах данных, ассоциированных со старением и развитием возраст-зависимых заболеваний. Результаты представлены в по ссылке <https://www.ibmcm.sk.ru/articles/075-15-2024-643-12-07-2024>. Ранжирование белков проводили на основе частоты встречаемости и дополнительных параметров, таких, как вероятность масс-спектрометрического обнаружения в плазме крови по данным протеомных репозиториях. Дополнительно отобранные белки характеризовали перечнем протеотипических пептидов (согласно SRMAtlas [390]) для оценки пригодности использования для панели оценки биологического возраста методом направленного мониторинга множественных реакций (SRM).

Полученный перечень идентификаторов белков картировали на метаболические пути человека для получения биологических аннотаций с помощью инструмента “KEGG Mapper” [391], доступного по ссылке [<https://www.genome.jp/kegg/mapper/>]. Также белки были дополнительно охарактеризованы в терминах GeneOntology (Released 2024-06-17) с помощью PANTHER Overrepresentation Test (Released 20240807) [392].

Для оценки возможности детекции белков методами масс-спектрометрии в плазме крови человека сравнивали полученный перечень со списком из 4390 белков, детектированных в рамках Human Plasma Proteome Project ([https://hupo.org/Human-Plasma-Proteome-Project-\(HPPP\)](https://hupo.org/Human-Plasma-Proteome-Project-(HPPP))) [393]. Белки загружали напрямую со страницы проекта

(https://db.systemsbioology.net/sbeams/cgi/PeptideAtlas/GetProteins?atlas_build_id=559&organism_id=2&redundancy_constraint=4&presence_level_constraint=1&action=QUERY). Для выявления наименее специфичных для развития старения белков,

полученный список идентификаторов сравнивали с хит-парадом наиболее часто детектируемых белков из публикации Petrak et al., [394]. Исходная статья содержала названия групп белков (например, кератины, актины и т.п.). Для получения перечня идентификаторов белков, относящихся к каждой группе, вручную проводили поиск по ее названию с помощью встроенного поискового движка UniProt. Для оценки клинической значимости белков сравнивали их со списком белков, одобренных FDA для клинических исследований [395].

9.2. Результаты и обсуждение

9.2.1. Протеомные часы старения

Мы отобрали 17 работ, выполненных за последнее десятилетие (Приложение Л). Так как старение — пожизненный процесс [396], в анализ были включены исследования, содержащие информацию о возраст-ассоциированных белках широкой группы индивидуумов от 14 до 109 лет. Три исследования были выполнены с использованием технологии Olink [110–112], пять работ - на платформе SOMAscan [113–117], шесть исследований включали результаты масс-спектрометрического анализа [118–123].

Три работы из 17 включали анализ данных нескольких источников (Coenen et al. - интеграция информации шести исследований с использованием платформы SOMAscan [34] и два исследования результатов, полученных различными протеомными методами [124,125]. Последние две работы включали не только анализ сыворотки или плазмы, но и другие биологические материалы (печень, латеральную широкую мышцу бедра, слезную жидкость, слюну, дермальные фибробласты, эпителиальную ткань толстой кишки, спинномозговую жидкость, мочу, лобную кору и др.). Эти данные были выбраны с целью показать, что характерные для определенных тканей возраст-ассоциированные белки могут быть детектированы и в плазме.

Основными протеомными методами изучения старения в настоящий момент являются технологии Olink, SOMAscan, а также масс-спектрометрия. Технология Olink [397] заключается в том, что пары антител, меченные ДНК-олигонуклеотидами, связывают целевой антиген в растворе, обеспечивая гибридизацию и удлинение с помощью ДНК-полимеразы. Этот вновь созданный

фрагмент штрих-кода ДНК амплифицируется с помощью ПЦР. SomaScan [398] - метод, основанный на использовании аптамеров (молекулы ДНК/РНК). Эта платформа позволяет измерять нативные белки в сложных матрицах путем преобразования доступных сайтов связывания на отдельных белках в соответствующую концентрацию реагента, которая затем количественно оценивается путем гибридизации с микрочипами.

Согласно статистике исследований старения на основании ресурса Pubmed, из более чем 6000 публикаций менее чем 2% исследований выполнены с использованием технологий Olink и SOMAScan. Масс-спектрометрические подходы использовались в 27% исследований, из них в более чем 160 работах исследовалась плазма крови. Остальные работы выполнялись иммуноферментными методами (например, ELISA). Есть основания полагать, что пока не будет накоплено достаточное количество экспериментов с использованием новых методов, масс-спектрометрические данные, и в особенности SRM, будут оптимальной основой для оценки протеомного профиля [385].

9.2.2. Наиболее часто встречающиеся белки, ассоциированные со старением и развитием возраст-зависимых заболеваний

Всего в анализ вошли 2227 белков. При сравнение списков, полученных в работах, общими для двух и более наборов данных оказались 892 белка. Тщательный анализ литературных источников для поиска маркеров старения, неохваченных тремя основными современными методами, выявил 17 белков, выделенных в приложении Е жирным шрифтом (Идентификаторы Uniprot *P15692, P02778, P17931, Q07325, P00738, P04275, P10451, P05231, Q8NEV9, P09603, P04085, P01127, O00626, Q9UEF7, P29965, Q9NSA1, Q8IVG9*), три из которых не были найдены по результатам нашего анализа, но добавлены в список результатов мета-анализа. Первый из них, CD40 ligand (*P29965*), один из важных маркеров инфламмейджинга [399,400], является потенциально детектируемым масс-спектрометрическими методами, так как для него можно получить данные о количестве MS-экспериментов, найденных в базах PRIDE и SRMatlas. Два белка долголетия, fibroblast growth factor 21 (FGF-21, *Q9NSA1*) и humanin (*Q8IVG9*), имеют определенные сложности для детекции. Детектировать *Humanin*, белок долголетия [401], (*Q8IVG9*) масс-спектрометрическими методами невозможно из-за его

короткой (24 аминокислотных остатка) последовательности, непригодной для классических протеаз (трипсин, хемотрипсин). Количественное обнаружение биомаркера FGF-21, еще одного биомаркера долголетия [402,403] на уровне субнанограмм на мл в сыворотке человека обычно достигается с использованием нанопоточной жидкостной хроматографии/тандемной масс-спектрометрии (ЖХ/МС/МС), вместе с тем, такой анализ может иметь ограниченную воспроизводимость и нестабильность сигнала МС, что затрудняет его использование в качестве надежного аналитического метода для рутинных клинических применений [404].

Для получения биологической аннотации был выполнен анализ обогащения полученного списка белков по категориям базы данных GeneOntology (GO). Результаты анализа показали, что обогащение полного списка белков ($n = 2227$) категориями GO “Биологические процессы” было связано с регуляцией врожденного иммунитета, а именно позитивной регуляции хемотаксиса естественных киллеров ($\text{FDR } q\text{-value} = 1.78 \cdot 10^{-4}$), а основной функцией являлось связывание хемокинового рецептора CCR1 ($\text{FDR } q\text{-value} = 3.9 \cdot 10^{-4}$). С точки зрения локализации, эти белки с высокой достоверностью ($\text{FDR } q\text{-value} = 9.51 \cdot 10^{-3}$) были связаны с сигнальным рецептором комплекса плазматической мембраны.

Далее для оценки значимости вклада каждого белка мы измерили частоту его встречаемости в наборах данных, ассоциированных со старением и развитием возраст-зависимых заболеваний. Для восьми и более наборов данных общими оказались 20 белков. Среди них наибольшее количество пересечений найдено для *Pleiotrophin* (P21246) и *Macrophage metalloelastase* (P39900) и *Natriuretic peptides B* (P16860) (11 работ из 17). Три белка, *Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6* (P25445), *Growth/differentiation factor 15* (Q99988) и *Vascular endothelial growth factor A, long form* (P15692), были общими для 10 наборов данных. Результаты доступны по ссылке <https://www.ibmc.msk.ru/articles/075-15-2024-643-12-07-2024>.

Белки, представленные в большом количестве наборов данных, вовлечены во множество функций и имеют связь с основными хроническими заболеваниями. Экспрессия *плейотрофина* (PTN, P21246), одного из основных кандидатов в маркеры старения, снижается с возрастом в нервных стволовых и прогениторных клетках. У мышей, лишенных PTN, наблюдается нарушение нейрогенеза,

сопровождающееся плохой памятью и снижением способности к обучению. Повышенная экспрессия PTN у стареющих мышей восстанавливает нейрогенез и устраняет соответствующие проблемы с памятью [405]. На модельных организмах показано, что мухи, несущие мутации в гомологичных плейотрофину генах, живут меньше, а повышение экспрессии любого из этих генов продлевает продолжительность жизни [406].

Макрофагальная металлоэластаза (MMP12), представленная в 11 наборах данных из 17, отвечает за регуляцию роста жировой ткани, чувствительность к инсулину и может опосредовать выработку оксида азота во время воспаления [407]. Показано, что генетический вариант в локусе MMP12 связан с атеросклерозом крупных артерий [408].

Натрийуретический пептид В все чаще признается в качестве прогностического маркера у пациентов с острым коронарным синдромом [409]. Согласно литературным источникам, натрийуретические пептиды обеспечивают многообещающий механизм действия при лечении застойной сердечной недостаточности на основе их вазодилатирующих и диуретических свойств, а также эффективного ингибирования ренин-ангиотензин-альдостероновой системы [410].

Старение сопровождается изменениями нервно-мышечных, иммунологических и эндокринных функций, которые могут привести к снижению мышечной и костной массы и слабости у пожилых людей [411].

Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6 (FAS) опосредует атрофию скелетных мышц, вызванную $\text{TNF}\alpha$, у мышей во время старения [412]. У мышей с нокаутированным геном Fas наблюдается сокращение продолжительности жизни, а также тяжелое аутоиммунное и аллергическое воспаление [413]. Фактор дифференцировки роста 15, рассматривающийся в работе Hong et al. как модулятор метаболизма костной и мышечной тканей [414], показывает связь со старением в 10 наборах данных из 17. Также в экспериментах с модельными животными показано, что трансгенные мыши с повышенной экспрессией человеческого GDF15 живут дольше и имеют улучшенную чувствительность к инсулину [415].

9.2.3. Формирование панели белков для количественного МС-анализа

Согласно п .5.9.ТЗ для составления перечня белков должны быть проведены работы по оценке возможности детекции белков с использованием масс-

спектрометрического детектора. Перечень белков, связанных со старением, сравнили со списком белков, полученным в результате мета-анализа данных количественного масс-спектрометрического анализа - SRM-скрининга плазмы крови здоровых людей [385]. Преимущества сравнения с этим списком заключались в том, что в них содержались данные о стабильной характеристике протеома здорового человека, то есть белках, обнаруженных как минимум в 70% проанализированных образцов и имеющих низкий межиндивидуальный показатель количественной вариабельности ($CV < 40\%$).

Результаты представлены по ссылке <https://www.ibmcm.sk.ru/articles/075-15-2024-643-12-07-2024>. Общим для двух списков оказались 167 белков. Анализ обогащения элементами *GeneOntology* этой группы показал, что с точки зрения локализации эти белки в основном были связаны как с комплектом компонента C1 комплемента ($FDR\ q\text{-value} = 2.27 \cdot 10^{-5}$). Основными биологическими процессами были негативная регуляция активации комплемента по лектиновому пути ($FDR\ q\text{-value} = 3.98 \cdot 10^{-3}$) и негативная регуляция окисления липопротеинов плазмы ($FDR\ q\text{-value} = 3.95 \cdot 10^{-3}$). Основной функцией являлось связывание рецепторов липопротеиновых частиц ($FDR\ q\text{-value} = 8.41 \cdot 10^{-7}$).

Сформированный в данной работе перечень белков, ассоциированных со старением ($n=2227$), картировали на списки (1) белков, детектированных в рамках крупной международной инициативы по созданию каталога белков плазмы крови человека (Human Plasma Proteome Project, <https://peptideatlas.org/hupo/hppp/>), [393] - на Рисунке 9.2 перечень обозначен как HPPP, $n=4390$. Данный список свидетельствует о том, что белок не является внутриклеточным, а содержится в плазме крови, (2) список наиболее часто встречающихся белков, описанных в качестве биологических маркеров различных патологий, изучаемых протеомными методами (см. [394] [18442176], данный перечень обозначен, как *Déjà vu*, $n=582$, (3) перечень белков, одобренных FDA к применению в качестве биомаркеров (обозначен как белки, одобренные FDA), $n=111$.

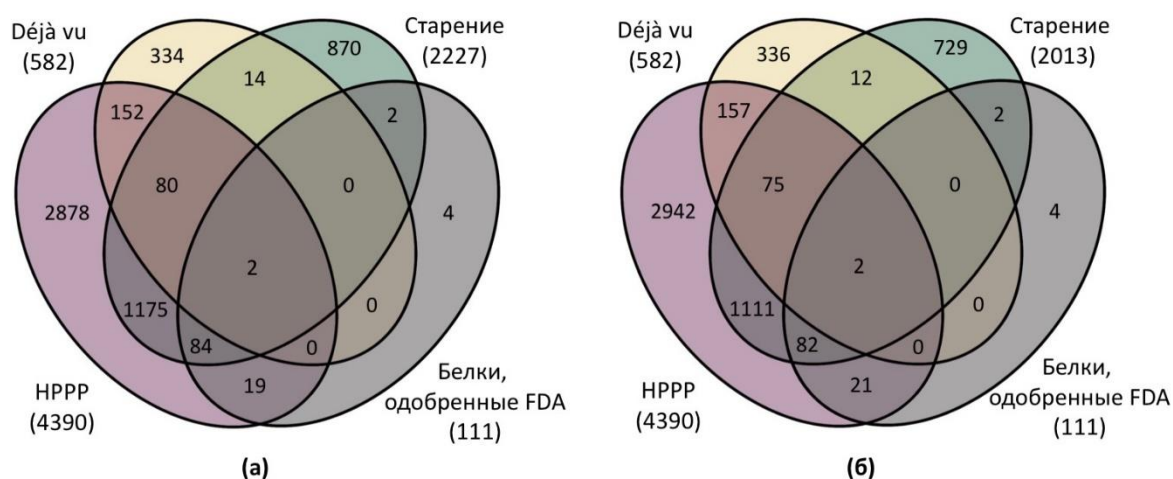


Рисунок 9.2 – Диаграммы Венна, отражающие (а) пересечение полного списка белков, ассоциированных со старением с перечнями белков, одобренных FDA [395], детектированных в рамках HPPP [393] и попавших в хит-парад наиболее часто детектируемых белков (Déjà vu, [394]). (б) пересечение списка белков, ассоциированных со старением и детектированных масс-спектрометрическими методами, с перечнями белков, одобренных FDA [395], детектированных в рамках HPPP [393] и попавших в хит-парад наиболее часто детектируемых белков (Déjà vu, [394]). Адаптировано из [30]

Получено, что около 40% белков, ассоциированных со старением, не встречаются ни в одном из анализируемых наборов данных. Большинство из этих белков могут быть зарегистрированы масс-спектрометрическими методами, однако возможность их детекции в плазме не подтверждена (см. Рисунок 9.2 (б)). Скорее всего, данный перечень содержит белки, связанные со специфическими признаками старения, а не системные маркеры возраст-зависимых заболеваний.

Интересно, что перечень белков, одобренных FDA для применения в диагностики, почти полностью вошел в список белков, ассоциированных со старением. Это может объясняться тем, что в качестве биомаркеров предложено использовать индикаторы системных нарушений в молекулярных каскадах, которые также приводят к увеличению биологического возраста. Только 35% белков (n=1493), формирующих протеомную карту плазмы крови человека, оказались ассоциированы со старением. Такой показатель, вероятно, связан с тем, что плазма крови не является главным биологическим материалом для оценки биологического возраста.

Перечень белков, чаще всего идентифицируемых в протеомных экспериментах в качестве дифференциально-экспрессируемых при заболеваниях,

может быть обусловлен высокой представленностью (копийностью) этих белков – аналитические методы регистрируют все время те же белки в силу их доступности [416]. Следствием этого является существенно пересекающийся перечень дифференциально-экспрессируемых белков при различных заболеваниях, то есть – данный перечень скорее представляет собой набор негативных примеров – белков, которые не являются специфичными для конкретной патологии маркерами. Данный список почти наполовину пересекается со списком ассоциированных со старением белков, вероятно, потому, что старение можно назвать причиной заболеваний, что и обуславливает общий список белков-маркеров. Это означает, что высококопийные белки, чаще всего изменяющие свой уровень при различных патологиях, могут быть предложены для включения в панель белков для оценки системных нарушений, в том числе, старения и возраст-зависимых заболеваний. В конечном итоге, это глубокий философский вопрос – являются ли болезни следствием старения или старение – отражением и результатом заболеваний. Возможно, целесообразно использовать именно такие неспецифичные белки для оценки взаимосвязи между изменением содержания белков и биологическим возрастом.

В качестве примера в этой работе мы предлагаем вариант фильтрации полного перечня белков, ассоциированных со старением (n=2227) и формирования кандидатных белков в панель для детекции методом SRM (Таблица 9.1).

В первую очередь, сортировка была произведена по частоте встречаемости в наборах данных. Согласно следующему критерию, были отобраны белки, имеющие данные о средней концентрации в плазме здоровых людей и имеющих небольшую межиндивидуальную вариабельность [385]. После фильтрации в список вошли 16 кандидатов (см. Таблицу 9.1), которые встречались в шести и более наборах данных и имели данные о 10 и более MS-экспериментов, найденных в базах PRIDE и SRMatlas. Также в список вошли четыре белка (*Vascular endothelial growth factor A*, *Galectin-3* и *C-X-C motif chemokine 9* и *10*), не имеющие данных о концентрациях, но представляющих большой исследовательский интерес в качестве маркеров старения и хорошо изученных другими протеомными методами [399,400,417]. Полученный список белков-кандидатов для исследования старения в плазме крови, сопоставлен с данными проекта “Déjà vu in proteomics” [394]. Как оказалось, всего один неспецифичный белок (*Plasminogen*), имел пересечение с двумя списками.

Альбумин, также обозначенный в таблице 9.1 как неспецифичный, часто не попадает в итоговые списки ввиду деплеции при пробоподготовке. Тем не менее, на наш взгляд это один из потенциальных кандидатов для включения в протеомную панель оценки биологического возраста.

Список из 20 выбранных белков картирован с помощью инструмента KEGG для поиска метаболических путей, связанных с процессами старения. Представляющими наибольший интерес белками из полученной таблицы оказались маркер инфламейджинга VEGFA (P15692) [399,400], задействованный во множестве сигнальных путей, канцерогенезе, атеросклерозе и ревматоидном артрите. Три белка, *coagulation factor X* (P00742), *mannan-binding lectin serine protease 1* (P48740) и *complement component C9* (P02748), были вовлечены в каскады комплемента и свертывания крови. Хемокины *CXCL9* (Q07325) и *CXCL10* (P02778) найдены вовлеченными во взаимодействие с вирусными белками и имели связь с сигнальным путем Toll-подобного рецептора. Еще одним белком, представляющим интерес в списке, был фибронектин, поскольку накопление повреждений в белках внеклеточного матрикса является важным признаком старения [383]. Для более комплексной характеристики изменений мы предлагаем обратить внимание на отбор тех белков, которые встречаются в разных путях.

Для оценки пригодности использования для панели оценки биологического возраста методом мониторинга выбранных реакций (SRM) каждый белок Таблицы 9.1 характеризовали перечнем протеотипических пептидов с помощью SRMAtlas [390].

Таблица 9.1 – Список возраст-ассоциированных белков, предлагаемых для детекции методом SRM. Количество пересечений - отражает частоту встречаемости в 17 исследованных наборах данных; MS-данные - суммарное количество MS-экспериментов, полученное по базам PRIDE и SRMatlas; Концентрация, нмоль/л - средняя концентрация белка в плазме здорового человека, измеренная методом SRM [385]; звездочками (*) обозначены белки - маркеры старения, жирным шрифтом выделены неспецифические для процесса старения белки. Адаптировано из [30]

№	Идентификатор Uniprot ID	Название гена	Название белка	Количество пересечений (из 17 наборов данных)	МС-данные	Концентрация, нмоль/л
1	P15692*	VEGFA	Фактор роста эндотелия сосудов А	10	598	n/a
2	P01034	CST3	Цистатин-С	9	334	34,7
3	P14151	SELL	L-селектин	8	878	76,0
4	P01011	SERPINA3	α 1-антихимотрипсин	8	714	5270,0
5	P02765	AHSG	Альфа-2-HS-гликопротеин	8	544	1982,7
6	P18065	IGFBP2	Белок 2, связывающий инсулиноподобный фактор роста	7	553	8,5
7	P02751	FINC	Фибронектин	7	395	1252,0
8	P00742	F10	Фактор свертывания крови X	7	330	170,3
9	P02778*	CXCL10	Хемокин 10 с мотивом C-X-C	7	239	n/a
10	P08697	A2AP	Альфа-2-антиплазмин	7	68	875,4
11	P01031	CO5	Комплемент C5	6	702	150,8
12	P02679	FIBG	Гамма-цепь фибриногена	6	588	5384,0
13	P02768	ALB	Альбумин	6	583	1101000,0
14	P17931*	LGALS3	Галектин-3	6	408	n/a
15	P02748	C9	Компонент комплемента C9	6	368	259,0
16	O14791	APOL1	Аполипопротеин L1	6	355	692,5
17	P05155	IC1	Ингибитор протеазы плазмы C1	6	344	399,5
18	P00747	PLMN	Плазминоген	6	267	661,5
19	P48740	MASP1	Маннозо-ассоциированная сериновая протеаза 1	6	123	89,9
20	Q07325*	CXCL9	Хемокин 9 с мотивом C-X-C	6	12	n/a

Стоит отметить, что итоговая таблица может быть отсортирована по другому принципу, что позволит самим исследователями сделать выбор, использовать ли для панели хорошо- или плохо изученные таргетными масс-спектрометрическими методами белки, обращать ли внимание на данные межиндивидуальной

вариабельности или частоту встречаемости в наборах данных.

9.3. Заключение к Разделу 9

На основании мета-анализа протеомных исследований плазмы крови человека создан список, который может лечь в основу создания масс-спектрометрического набора для количественной оценки представленности выбранных белков в плазме крови человека и определения биологического возраста. Сопоставление с количественными данными протеома здорового человека позволило выявить возраст-ассоциированные белки с небольшой межиндивидуальной вариабельностью у условно здоровых людей и подтвердить их участие в иммунных и воспалительных процессах, а также в липидном обмене.

Картирование полученного перечня на текущий уровень знаний позволяет реализовывать разные подходы к формированию диагностической панели. Первый путь – использовать хорошо детектируемые в плазме крови, для которых большинство исследований на разных когортах показывают связь с возраст-зависимыми заболеваниями. Использование неспецифичных белков, которые часто детектируются при различных заболеваниях, может быть полезным для изучения старения как системного процесса. Эти белки могут отражать общие нарушения в организме, характерные для старения. В этом случае для количественной оценки масс-спектрометрическими методами желательно в панель включать белки-участники как можно большего числа различных метаболических путей, для увеличения охвата молекулярного каскада, подверженного изменениям. Стоит учитывать также стоимость и сложность измерений, чтобы не перегружать панель. В перспективе может быть установлены корреляции между количественным содержанием белка и биологическим возрастом [418].

Другой возможный путь формирования панели – это измерение разных механистических биомаркеров старения, которые ещё не входили в когортные исследования, но связаны с процессами старения (например, распадом внеклеточного матрикса, генетической нестабильностью, митохондриальной дисфункцией).

Найденные кандидаты в биомаркеры старения могут обладать универсальностью, так как их наличие подтверждено в нескольких исследованиях на разных популяциях в образцах сыворотки и плазмы людей обоих полов широкой

возрастной группы. В перспективе сформированный перечень может быть полезен для создания рутинного анализа крови, который легко масштабировать для управления здоровьем более крупных групп населения.

Таким образом, в полном соответствии с планом-графиком были проведены необходимые исследования и получены следующие результаты:

1. Согласно п. 4.9. ТЗ, на основании анализа литературы и данных публичных репозиториев определен перечень из 2227 белков, важных для диагностики заболеваний, связанных с возрастными изменениями. Впервые показано, что среди потенциальных белков-маркеров старения выявляются часто обнаруживаемые белки - неспецифичные маркеры системных нарушений и белки, одобренные FDA в качестве пригодных для использования в клинической практике.

2. Согласно п. 5.9. ТЗ проведены работы по оценке возможности детекции белков с использованием масс-спектрометрического детектора. Для 2013 белков получены данные МС-экспериментов, найденные в базах PRIDE и SRMatlas. Разработан вариант фильтрации полученного списка белков, ассоциированных со старением и формирования 20 кандидатов в панель для детекции методом SRM.

Согласно п.3.9 ТЗ в результате проведения работ по п.1.9 ПГ должен быть получен перечень, состоящий из не менее 50 белков, важных для диагностики социально значимых заболеваний и/или заболеваний, связанных с возрастными изменениями. В результате проведенных работ определен перечень из более чем двух тысяч белков, но предложен вариант фильтрации, предлагающий первые 20 кандидатов в панель для возможности количественной детекции с помощью масс-спектрометрии.

По результатам работы подготовлены публикации:

Kliuchnikova AA, Ilgisonis EV, Archakov AI, Ponomarenko EA, Moskalev AA. Proteomic Markers of Aging and Longevity: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25(23):12634. <https://doi.org/10.3390/ijms252312634>. (Публикация № 4 в составе пакета отчетной документации).

Sarygina, E.; Kliuchnikova, A.; Tarbeeva, S.; Ilgisonis, E.; Ponomarenko, E. Model Organisms in Aging Research: Evolution of Database Annotation and Ortholog Discovery. *Genes* **2025**, *16*, 8. <https://doi.org/10.3390/genes16010008>. (Публикация № 12 в составе пакета отчетной документации).

10. ПОЛУЧЕНИЕ ПЕПТИДНЫХ СТАНДАРТОВ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОГО МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ

Согласно п.4.10 ТЗ должно быть получено не менее 30-ти пептидных стандартов для направленного МС-профилирования, при этом должно быть предусмотрено присоединение одного изотопно-меченного аминокислотного остатка. Ниже приведено описание работ по п 1.10ПГ в соответствии с пп. 3.10, 4.10, 5.10 ТЗ.

Метод направленного протеомного анализа на основе мониторинга выбранных реакций (selected reaction monitoring, SRM) с использованием синтетических изотопно меченых пептидов (SIS) считается “золотым стандартом” для количественных масс-спектрометрических измерений. Это обусловлено высокой специфичностью и чувствительностью, которая достигается за счёт технических характеристик тройного квадрупольного масс-спектрометра – основного инструмента для проведения анализа в режиме SRM [419]. Изоляция определенных прекурсорных ионов в первом квадруполе и соответствующих им дочерних ионов в третьем квадруполе позволяет достигнуть высокой чувствительности. Учитывая низкое разрешение квадрупольных масс-анализаторов для анализа сложных смесей, в качестве внутренних стандартов используют синтетические пептиды, меченные стабильными изотопами. Синтетические пептидные стандарты, которые в известной концентрации добавляют в смесь нативных пептидов образца имеют аналогичную нативному пептиду аминокислотную последовательность, но в их состав входят аминокислотные остатки лизина или аргинина с тяжелыми изотопами углерода (^{13}C) и азота (^{15}N). Таким образом, SIS стандарты, являясь уникальными пептидами для исследуемого белка, имеют аналогичные природным пептидам физико-химические и хроматографические свойства, а отношение массы к заряду (m/z) отличается от нативного пептида на 8 или 10 а.е.м., если изотопную метку несет лизин (K) или аргинин (R), соответственно. Это позволяет с большой точностью определить концентрацию нативного пептида, и соответственно, белка, к которому он принадлежит.

10.1.Методика

Синтез и очистка пептидных стандартов

Синтез пептидных стандартов осуществляли по протоколу твердофазного пептидного синтеза на автоматическом пептидном синтезаторе Overture (Protein Technologies, Inc.) с использованием 9-флуоренилметилоксикарбонил (Fmoc)-защищенных по α -аминогруппам производных аминокислот. Для синтеза изотопсодержащих пептидов в качестве твердой фазы использовали смолу с предварительно присоединённой изотопно-меченой аминокислотой аргинин Fmoc-Arg(Pbf)-OH- $^{13}\text{C}_6$, 99%; $^{15}\text{N}_4$, 99%, или лизин Fmoc-Lys (Boc)-OH - $^{13}\text{C}_6$, 99%; $^{15}\text{N}_2$, 99%, (Cambridge Isotope Laboratories)

Для конденсации Fmoc-аминокислот использовали O-(1H-6-хлорбензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурионий гексафторофосфат (HCTU) в присутствии 2,4,6-триметилпиридина (TMP). В реакции присоединения использовали 5-ти кратный избыток Fmoc-аминокислот по отношению к емкости носителя.

Удаление защитных Fmoc-групп с первой аминокислоты на носителе и с растущей пептидной цепи проводили 20%-ным раствором 4-метилпиперидина в N,N-диметилформамиде.

Снятие пептида с твердой фазы и одновременное деблокирование боковых групп осуществляли в смеси трифторуксусная кислота : 3,6-диокса-1,8-октандитиол : триизопропилсилан : анизол : вода в объемном соотношении 183:5:2:5:5 в течение 2 часов. По окончании инкубации смесь отбирали и в полученный раствор добавляли охлажденную смесь метил-трет-бутиловый : петролейный эфир (1:2 об/об). Полученную суспензию охлаждали 30 мин при -20°C и затем центрифугировали 10 мин, при 3000 об/мин. Полученный осадок высушивали в центробежном концентраторе, а затем растворяли в 200 мкл 50% раствора ацетонитрила в воде для очистки.

Полученные пептиды очищали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографической станции Agilent ChemStation 1200 series с использованием масс-спектрометра Agilent 6100 Series Quadrupole LC/MS, Очистку пептидов проводили на колонке Zorbax 300 Extend-C18, диаметр частиц 5 мкм, 9,4x250 мм («Agilent Technologies», США) в градиенте ацетонитрила, Градиент

формировали подвижными фазами А (0,1% трифторуксусной и муравьиной кислоты в воде) и В (80% раствор ацетонитрила, 0,1% - муравьиной кислоты и 0,08% - трифторуксусной кислоты) при скорости потока 2 мл/ мин.

Сбор фракций, содержащих целевой пептид осуществляется автоматически, по регистрации масс-спектрометром m/z пептида, указанного в методе, при превышении интенсивности данного сигнала установленного порогового уровня.

Хромато-масс-спектрометрический анализ пептидных стандартов

Согласно п. 5.10 ТЗ степень чистоты пептида после очистки, определённая с помощью ВЭЖХ должна составлять не менее 90%. Степень чистоты пептидных стандартов после очистки определяли при помощи хромато-масс-спектрометрического анализа на хроматографической станции Agilent ChemStation 1200 series сопряженной с масс-спектрометром Agilent - 1100 series LC/MSD Trap XCT Ultra. Анализ пептидов проводили на колонке Zorbax 300 Extend-C18, диаметр частиц 5 мкм, 150 мм×4,6мм («Agilent Technologies», США) в градиенте ацетонитрила. Градиент формировали подвижными фазами А (0,1% трифторуксусной и муравьиной кислоты в воде) и В (80% раствор ацетонитрила, 0,1% - муравьиной кислоты и 0,08% - трифторуксусной кислоты) при скорости потока 1 мл/ мин.

Аналитическую колонку промывали 2%подвижной фазой В в течение 0,5 мин после чего линейно увеличивали концентрацию подвижной фазы В до 60% в течение 5мин, после чего в течение 0,5 мин увеличивали концентрацию подвижной фазы В до 100 %, далее в течение 4 мин промывали аналитическую колонку 100% подвижной фазой В, после чего в течение 1 мин уменьшали концентрацию подвижной фазы В до 2% и далее в течение 4 мин аналитическую колонку промывали подвижной 2% фазой В, таким образом, уравнивая колонку.

10.2.Результаты

Результаты определения чистоты пептидов приведены в Таблице 10.1. Как видно из таблицы чистота пептидов соответствовала требованиям ТЗ.

Таблица 10.1 – Синтетические изотопно меченые внутренние пептидные стандарты (*Isotopically labeled internal standard, SIS*), используемые для количественного SRM анализа

Маркировка пептида в синтезе	Аминокислотная последовательность пептида*	ID белка	Степень чистоты, %	Концентрация пептида пМ/мкл	Количество пептида, мкг
03_A1	IALGGLFPASNLR	P04278	99,9	170,4	247,4
03_A2	VPTGGVEEGLLER	P01880	99,9	73,3	100,1
03_A6	NFPSPVDAAFR	P02790	99,3	40,7	100,2
03_B9	YLTNTESTR	P06276	95,4	155,6	187,9
03_D4	YAATSQVLLPSK	P01871	99,0	48,7	125,2
03_E10	FQSVFTVTR	P02747	95,9	198,1	216,8
03_E8	NIQSLEVIGK	P02775	99,9	180,6	200,2
03_G1	TEGDGVYTLNNEK	P00738	96,9	69,8	101,1
03_G8	LLDSLPSDTR	P05155	99,9	150,6	169,7
04_B9	LSSGLVTAALYGR	P43251	99,9	99,0	130,5
04_C4	SNALDIIFQTDLTGQK	P09871	95,4	103,1	182,7
04_C5	VPGTSTSATLTGLTR	P02751	98,7	28,8	127,2
04_G7	LEQGENVFLQATDK	P02746	98,5	44,3	141,8
04_H9	AIGYLNTGYQR	P01023	99,9	83,8	106,0
06_A11	LQGTLPVEAR	P01031	95,6	436,5	477,4
06_B11	DGAGDVAFVK	P02787	98,3	55,7	109,8
07_B4	ANRPFLVFIR	P01008	99,9	761,9	473,4
07_G4	STGSWSTLK	P00751	99,1	1473,5	478,7
07_H2	GPSVFPLAPCSR	P01861	99,7	233,9	290,2
08_F3	ATNYNAGDR	P61626	99,1	380,9	377,6
82_1_C4	GSESGIFTNTK	P02671	98,4	464,2	266,6
82_2_A1	LSGLLDLALGK	P04745	98,3	164,4	182,1
82_2_A2	ATEHLSTLSEK	P02647	99,9	188,0	230,1
82_2_C1	TGISPLALIK	P04114	96,8	722,6	368,8
82_2_C3	IVVVTAGVR	P07195	99,9	132,2	122,1
07_H3	FSGTWYAMAK	P02753	99,9	520,2	304,2
03_A9	NALALFVLPK	P05543	95,3	164,6	180,0
03_C10	TPLTATLSK	P01876	95,9	414,3	389,2
03_C4	GPSVFPLAPSSK	P01857	99,1	461,9	226,9
03_D12	FDPSLTQR	P08697	99,7	150,3	146,4
03_E5	HSIFTPETNPR	P00747	96,1	79,8	104,5
03_G9	VEHSDLSFSK	P61769	96,4	121,1	140,0
03_H12	FSVVYAK	P02765	95,3	258,0	211,9
03_H9	SALVLQYLR	P00740	98,6	45,2	145,5
04_A5	DASGATFTWTPSSGK	P01877	99,3	340,7	172,7
04_B5	DNENVVNEYSSELEK	P02675	98,7	259,0	460,2
04_B7	LVAYYTLIGASGQR	P01024	99,9	65,4	199,0
04_D5	YVGGQEHFAHLLILR	P02763	99,9	158,1	278,7
04_E7	DSTYLSSTLTLSK	P01834	99,9	115,5	174,5
04_F8	GAYPLSIEPIGVR	P00450	98,7	97,2	134,3
04_H8	YEASILTHDSSIR	P02679	99,9	81,6	122,6

Продолжение таблицы 10.1

Маркировка пептида в синтезе	Аминокислотная последовательность пептида*	ID белка	Степень чистоты, %	Концентрация пептида пМ/мкл	Количество пептида, мкг
06_F6	AADDTWEPFASG K	P02766	99,9	317,0	444,7
07_A2	YLS ¹³ DHSFLVSQGD R	P04275	98,9	318,0	259,8
07_A3	ALQDQLVLVA A K	P01019	97,6	154,4	197,1
07_A4	LSITGTYDL K	P01009	99,9	943,6	351,8
08_B2	GWVTDGFSS L K	P02656	99,9	84,5	101,7
10_A05	GTYSTTVT G R	P08519	98,4	348,3	366,6
82_1_D2	ALDFAVGEY N K	P01034	99,9	147,2	181,8
82_2_D1	VYFAGF P R	P07225	98,2	218,6	211,2

Примечание: *- жирным шрифтом выделена аминокислота, содержащая тяжелые атомы углерода C¹³ и азота N¹⁵.

Определение концентрации пептидов при помощи аминокислотного анализа

Согласно п. 5.10 ТЗ определение концентрации синтезированных пептидов должно осуществляться при помощи аминокислотного анализа. В соответствии с требованием ТЗ расчет молярной концентрации пептида осуществляли исходя из молярных концентраций аминокислот, входящих в пептид. Молярные концентрации аминокислот определяли с помощью количественного хроматографического анализа ортофталевых производных аминокислот, используя стандартные образцы аминокислот.

Для проведения измерений раствор пептида (50 мкл) помещали в ампулу и выпаривали досуха, после чего добавляли 100 мкл соляной кислоты в концентрации 6 моль/л и запаивали ампулу в вакууме. Далее проводили кислотный гидролиз в течение 24 часов при температуре 110°C. После чего ампулу вскрывали, раствор, содержащий аминокислоты после гидролиза пептида, выпаривали досуха в центрифужном концентраторе Eppendorf Concentrator 5301, а к сухому остатку добавляли 50 мкл воды, и далее проводили количественный хроматографический анализ.

Количественный хроматографический анализ ортофталевых производных аминокислот проводили на хроматографической станции Agilent ChemStation 1200 series с флуоресцентным детектором с использованием колонки ZORBAX Eclipse AAA (5мкм; 4,6 x 150 мм) и следующих элюентов: Раствор А (40мМ фосфатный буфер, pH = 7,8), раствор В 80% ацетонитрила в воде, Для дериватизации аминокислот перед хроматографическим анализом использовали следующие

реагенты: Боратный буфер, (pH = 10,2), раствор ортофталевого альдегида.

Для количественного определения молярной концентрации аминокислот в растворе проводили измерение площадей под пиками флуоресценции на хроматограммах аминокислот анализируемого образца пептида и стандартного образца, содержащего анализируемые аминокислоты в известной концентрации. Исходя из полученных результатов измерений концентраций аминокислот и данных об аминокислотном составе пептидов, вычисляли молярную концентрацию целевых пептидов.

10.3. Заключение к Разделу 10

Согласно п.1.10 ПГ получены пептидные стандарты для направленного масс-спектрометрического профилирования. Для этого проведен синтез и очистка более 30 ((N=49) пептидных стандартов с присоединением одного изотопно-меченого аминокислотного остатка (согласно п. 4.10 ТЗ). В соответствии с п.5.10 ТЗ степень чистоты определялась при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии, как описано выше в разделе «Методика», и составляет от 95,3 до 99,9 %, определение концентрации синтезированных пептидов осуществлялось при помощи аминокислотного анализа, как описано выше в разделе «Методика», а количество каждого синтезированного пептидного стандарта составляет не менее 100 мкг и находятся в диапазоне от 100,1 до 478,7 мкг. Согласно п.3.10 ТЗ хроматограммы, подтверждающие чистоту стандартов, и результаты измерения концентрации стандартов приведены на рисунках 1-49 в Приложении Н и в таблице 10.1. Таким образом, работы выполнены в полном объеме и в соответствии с ПГ и ТЗ. По результатам работ составлен прилагаемый к настоящему отчету документ - Акт получения (синтеза) пептидных стандартов для направленного масс-спектрометрического профилирования (Приложение М).

11. РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА АНАЛИЗА КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ

Полученные в результате работ по п.101 ПГ пептиды далее использовали для разработки протокола анализа молярной концентрации белков человека в биологическом материале человека, включая плазму крови, методом направленного масс-спектрометрического анализа. Диапазон измерений молярной концентрации белков биологических образцов человека составляет от 10^{-12} М до 10^{-9} М. Масс-спектрометрический анализ выполняется методом динамического мониторинга множественных реакций формирования фрагментных ионов уникальных пептидов (Dynamic Multiple Reaction Monitoring) при помощи хромато-масс-спектрометра типа тройной квадруполь с хроматографическим разделением.

Метод измерений базируется на высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. Перед проведением хромато-масс-спектрометрического анализа молярной концентрации белков, кодируемых генами человека, осуществляется предварительная экстракция белка из биологического образца. Затем в исследуемый образец добавляют образец сравнения — меченные стабильными изотопами пептидные стандарты с известной концентрацией. Эндогенные пептиды образца регистрируются в первом квадруполе Q1 масс-спектрометра как родительский ион с зарядовым состоянием $z=2+$, $3+$. Меченные стабильными изотопами пептидные стандарты (образец сравнения), которые имеют идентичный эндогенным аминокислотный состав за исключением атомов стабильных изотопов, которые отличаются по массе (лизин и аргинин), регистрируются как родительский ион с зарядовым состоянием $z=2+$, $3+$. Масс-спектрометрические измерения позволяют определить соотношение интенсивностей пиков дочерних ионов (ионов-кванторов) эндогенных пептидов и пептидных стандартов, меченных стабильными изотопами.

Далее молярную концентрацию эндогенных пептидов в исследуемом образце определяют с использованием калибровочной кривой, которая показывает взаимосвязь между соотношением площадей пиков иона-квантора эндогенных пептидов и меченных стабильными изотопами пептидных стандартов и молярной концентрацией эндогенных пептидов в калибровочном растворе.

Протокол может быть применен для исследования биологических жидкостей,

включая плазму крови, и клеточного материала человека на предмет наличия белков, кодируемых генами человека. В методике фактически происходит детекция и измерение концентрации не белков, а продуктов их гидролиза – пептидов. Принято считать, что концентрация пептидов полностью совпадает с концентрацией белка, которому он принадлежит.

11.1.Заключение к Разделу 11

В соответствии с п.1.11 ПГ разработан протокол анализа концентрации белков в плазме крови человека, предназначенный для проведения измерений с использованием хромато-масс-спектрометра типа тройной квадруполь с хроматографическим разделением (согласно п.4.11 ТЗ). Разработанный протокол представлен в виде прилагаемого к настоящему отчёту о НИР документа Приложение О «Протокол анализа концентрации белков в плазме крови методом направленного масс-спектрометрического анализ».

12. НАПРАВЛЕННЫЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НЕ МЕНЕЕ 15% ОБРАЗЦОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЛЮДЕЙ РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП В СООТВЕТСТВИИ С РАЗРАБОТАННЫМ ПРОТОКОЛОМ

В последние десятилетия для выявления механизмов старения, значительное внимание уделяется изучению протеома плазмы крови [34]. Циркулирующие белки являются привлекательными мишенями для изучения, являясь конечными эффекторами физиологических путей. Они адаптируются под воздействием возраста, влияя на метаболизм и иммунный ответ организма, что обуславливает изменения в белковом профиле. Понимание этих различий может помочь в разработке новых подходов к диагностике и лечению возраст-зависимых заболеваний.

Одной из актуальных и эффективных стратегий для абсолютной количественной оценки панелей белков является метод направленной протеомики, который может помочь выявить ключевые закономерности в изменениях экспрессии белков. Направленная или таргетная масс-спектрометрия привлекает внимание благодаря своей высокой чувствительности, селективности и способности к мультиплексному анализу, что позволяет количественно характеризовать белковые анализы. Метод мониторинга множественных реакций (MRM) основан на регистрации сигналов от протеотипических пептидов, которые выступают в роли уникальных меток для каждого выбранного белка. Высокая чувствительность MRM позволяет анализировать диагностически значимые белки в цельной плазме крови, где диапазон концентраций может превышать 10 порядков [107].

Несмотря на наличие внушительного объема данных, полученного с помощью направленной масс-спектрометрии, основная их часть относится к биологическому материалу, полученному от пациентов с различными заболеваниями. В то же время представление о количественном и качественном составе протеома здоровых людей разных возрастов, включая пожилых, остается неполным.

Целью работы по п.12 пГ было проведение направленного масс-спектрометрического анализа в режиме мониторинга множественных реакций (MRM/SIS) плазмы крови плазмы крови людей различных возрастных групп.

12.1. Методика направленного масс-спектрометрического анализа в режиме мониторинга множественных реакций (MRM/SIS)

12.1.1. Биологический материал

Образцы плазмы крови человека были предоставлены Биобанком ИБМХ см подраздел 7.2. Кровь была получена от 12 добровольцев в возрасте от 63 до 85 лет и от 12 добровольцев в возрасте от 19 до 25 лет.

12.1.2. Пробоподготовка к масс-спектрометрическому анализу

Исходную плазму крови в объеме 2,5 мкл разводили в 8 раз раствором, содержащим 50 mM триэтиламмония бикарбонат (ТЕАБ, pH 8.5). Для восстановления и алкилирования дисульфидных связей к образцам добавляли раствор, содержащий 0,5 M трис(2-карбоксиэтил) фосфин (TCEP, Thermo Fisher Scientific, США) и 400 mM хлорацетамид (САА, Sigma-Aldrich), до конечной концентрации 40 и 60 mM, соответственно. Образцы инкубировали при температуре 80°C в течение 40 мин.

Для проведения гидролитического расщепления белка к образцам добавляли раствор трипсина (Promega, США) с концентрацией 0,2 мкг/мкл в соотношении масса трипсина к массе общего белка 1:50. Пробы инкубировали в течение ночи. По окончании инкубации к реакционной смеси добавляли муравьиную кислоту до конечной концентрации 5% с последующим центрифугированием со скоростью 14000 g в течение 20 мин при комнатной температуре. Супернатант высушивали в вакуумном концентраторе Concentrator 5301 (Eppendorf, Германия) при температуре 45°C. После полного высыхания образцы растворяли в растворе 0,1% муравьиной кислоты и добавляли изотопно-меченные синтетические пептидные стандарты SIS.

12.1.3. Твердофазный синтез изотопно-меченных пептидных стандартов

Твердофазный синтез пептидов проводили с использованием синтезатора Overture — Robotic Peptide Library Synthesizer (Protein Technologies, Великобритания), как описано ранее [420]. В синтезе пептидов использовали изотопно-меченные лизин (Fmoc-Lys(Boc)-OH-¹³C₆,¹⁵N₂) и аргинин (Fmoc-Arg(Pbf)-OH-¹³C₆,¹⁵N₄)(Cambridge Isotope Laboratories, США) (см также Раздел 10)

12.1.4. Направленный масс-спектрометрический анализ образцов плазмы крови людей различных возрастных групп в соответствии с разработанным протоколом

Хроматографическое разделение пептидов проводили с помощью системы Agilent 1200 series (“Agilent Technologies”, США), сопряженной с тройным квадрупольным масс-анализатором TSQ Quantiva (“Thermo Scientific”, США). Образец объемом 3 мкл, содержащий 7,5 мкг нативных пептидов и стандарты SIS, разделяли с использованием аналитической колонки ZORBAX SB-C18 (150×0,5 мм, диаметр частиц 5 мкм, “Agilent Technologies”, США). Скорость потока составляла 20 мкл/мин. Градиент формировали раствором В (80% ацетонитрил в 0,1% муравьиной кислоте) и раствором А (0,1% муравьиная кислота) (Таблица 12.1).

Таблица 12.1 – Градиент, используемый для хроматографического разделения пептидов

Время, мин	Раствор А, %	Раствор В, %
1	95	5
5	95	5
35	40	60
36	1	99
41	1	99
42	95	5
50	95	5

Масс-спектрометрический анализ осуществляли в режиме динамического мониторинга множественных реакций (dMRM), используя следующие настройки МС детектора: напряжение на капилляре составляло 4000 В, скорость осушающего газа (азот) составляла 7 л/мин, скорость аксиального газа (азот) составляла 5 л/мин, температура капилляра – 350 °С, окно изоляции для первого и третьего квадрупольных окон – 0,7 Да, время цикла сканирования – 1,2 сек, давление газа (аргон) в ячейке соударения – 1,5 мТорр. Окно времени удерживания на колонке обращенной фазы составляло 1,8 мин для каждого прекурсорного иона. Для MRM анализа целевых белков применялось по 2-4 транзиции на прекурсор. Для количественной оценки в ПО Skyline использовались все мониторируемые транзиции.

Согласно п 4.12 и 5.11 ТЗ анализ образцов включал измерения на МС типа тройной квадруполь по разработанному протоколу мониторинга множественных реакций. Перед постановкой серии образцов была осуществлена калибровка тройного квадрупольного масс-анализатора TSQ Quantiva. После калибровки и перед началом анализа был выполнен 1 вкол пустой пробы и 1 вкол смеси пептидных стандартов в 0,1% муравьиной кислоте. Измерения всех образцов проводились одной серией. Между экспериментальными образцами, осуществлялся вкол пустой пробы, представляющей собой раствор 0.1% муравьиной кислоты в воде, в таком же объеме и при таких же условиях, как и экспериментальные образцы. По окончании анализа серии образцов был выполнен вкол смеси пептидных стандартов в 0,1% муравьиной кислоте.

12.1.5. Биоинформатический анализ

Согласно п 5.11 ТЗ идентификация белков по полученным спектрам должна проводиться в подходящем программном обеспечении. В соответствии с требованиями ТЗ обработку результатов проводили в программном обеспечении Skyline MacCoss Lab Software (версия 4.1.0) для сравнения хроматографических профилей эндогенного пептида и соответствующего стандарта SIS. Соотношение площадей под пиком для эндогенного пептида и соответствующего стандарта SIS рассчитывалось в Skyline в автоматическом режиме. Для определения количества белка соотношение, рассчитанное в Skyline, умножали на известное содержание каждого стандарта SIS.

12.2. Результаты направленного масс-спектрометрического анализа в режиме мониторинга множественных реакций (MRM/SIS)

В ходе исследования было зарегистрировано и определено содержание 49 FDA-одобренных белков, минимум в пяти образцах, (Рисунок 12.1).

На рисунке 12.1 видно, что диапазон содержания детектированных белков в образцах плазмы крови добровольцев двух возрастных групп охватывают более пяти порядков. Список детектированных белков и их концентрация в каждом образце представлены в таблицах 12.2 (группа старшего возраста) и 12.3 (группа младшего возраста). Согласно п 3.12 ПГ получен перечень белков с указанием концентрации в каждом образце и первичные данные MRM были загружены в репозиторий Peptide

Atlas через PASSEL и доступны по идентификатору (код эксперимента) PASS05901 (Username: PASS05901, Password: MU244ch).

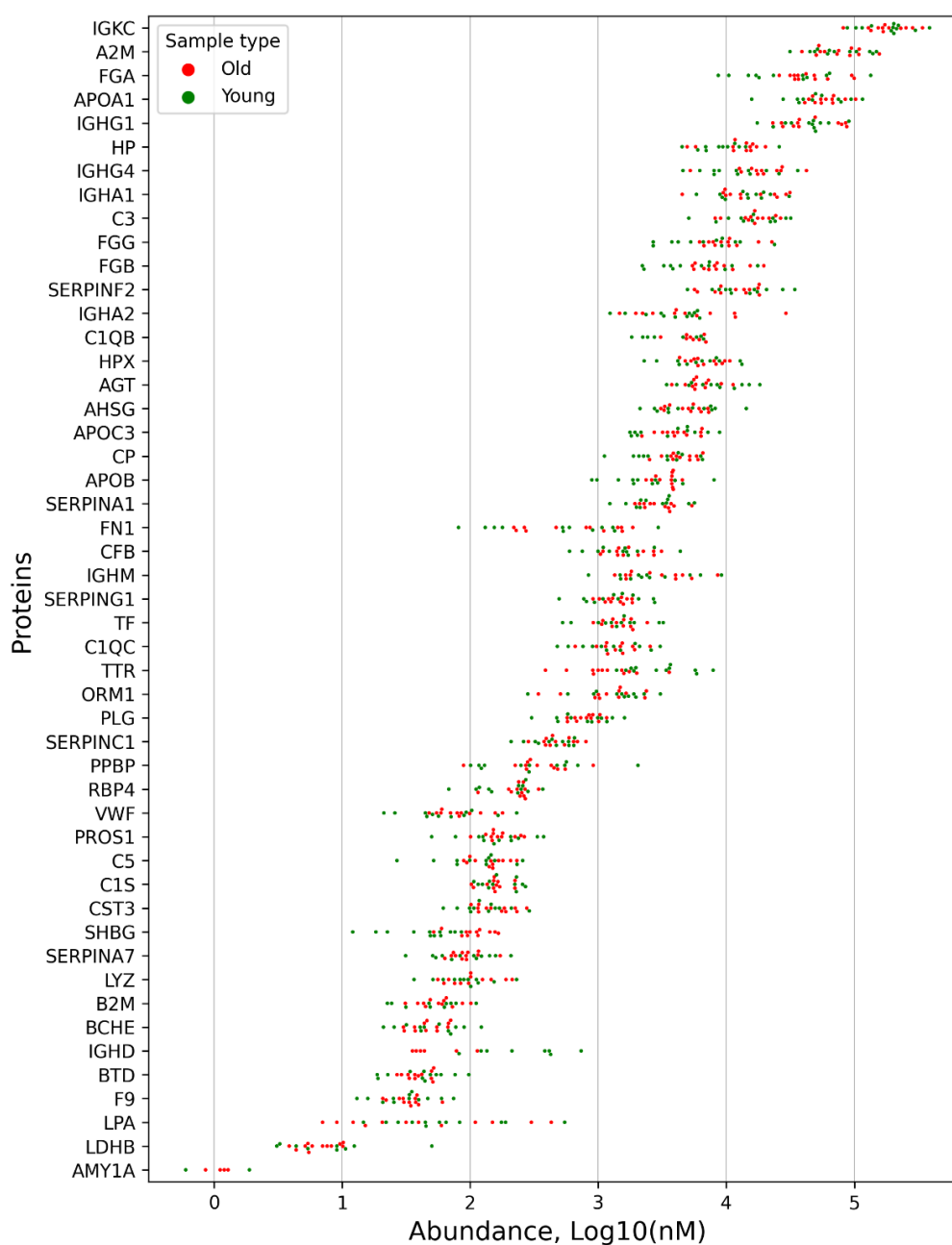


Рисунок 12.1 – Диапазон концентраций белков, измеренных в результате направленного масс-спектрометрического анализа в образцах плазмы крови добровольцев двух возрастных групп

Таблица 12.2 – Результаты направленного масс-спектрометрического анализа образцов плазмы крови людей группы старшего возраста, в соответствии с разработанным протоколом. H/O – сигнал от пептида не детектировался

Аминокислотная последовательность пептида	Uniprot ID Protein name	Идентификационный номер пациента											
		989	996	997	1100	1102	1149	1152	1158	722	1038	636	766
		Концентрация пептида в образце, нМ											
DSTYLSSTLTLSK	P01834 IGKC	166303.7	81889.3	253357.3	153610.3	173194.3	340934.1	230635.3	285267.4	168021.4	134758.7	186150.9	128673.4
AIGYLNTGYQR	P01023 A2MG	94889.8	58635.3	75551.7	92279.3	109179.8	156829.4	73356.7	108475.7	52804.3	50446.3	54221.7	38940.7
GSESGIFTNTK	P02671 FIBA	61903.3	25929.9	41936.1	31522.7	49417.7	36328.3	34273.3	95499.9	36662.6	33984	99765.4	48692.1
ATEHLSTLSEK	P02647 APOA1	47246.1	55178.6	102472.7	54691.3	85040.6	67083	68829.4	67833	44085.9	41028	60018.4	49333.7
GPSVFPLAPSSK	P01857 IGHG1	36137.9	23095.4	79657	36930.7	87319.5	85507.6	49462.5	74874	26969	27655.9	37172.1	33515.5
TEGDGVYTLNNEK	P00738 HPT	20237.3	11703	11392	15355.5	4947.2	17239.6	14369.5	14358.2	11280.2	5764	16092.7	15553.7
GPSVFPLAPCSR	P01861 IGHG4	18889.3	5235.2	12659.7	13081.1	15761.8	19533	27304.3	26726.8	42283.9	17595	24840.8	17183
TPLTATLSK	P01876 IGHA1	18517.7	9463.7	12998.1	12922.3	9917.6	31424.1	29298.9	23837.1	10740.9	9784.3	24933	4527.4
LVAYYTLIGASGQR	P01024 CO3	16667.1	9028.3	19267.7	15536.1	8183.6	26544.4	14907	16679.6	24332.1	14113.7	21578.6	17595
YEASILTHDSSIR	P02679 FIBG	12090.5	6181.9	10492.2	8163.4	10597.2	9106	7296.3	17847.6	7894.4	6692.4	22699.6	10332.7
DNENVVNEYSSELEK	P02675 FIBB	11218.3	5436	8104.7	6696.9	9620.6	8478	7315.3	19638.9	5706.9	5579.1	15377.1	8348.1
FDPSLTQR	P08697 A2AP	8174.8	9076.1	18125.7	14240.3	17689.4	15189.2	13769.5	18072	5951.7	5647.9	11858.8	9056.7
DASGATFTWTPSSGK	P01877 IGHA2	7483.5	4062.3	5888.7	2219.8	3953.4	11614.1	1965.6	29240.8	2667.2	4761.6	11768.1	1467.7
LEQGENVFLQATDK	P02746 C1QB	6155.1	3070.1	6725	4895.1	5513.7	6927.7	4880.9	5239.6	H/O	H/O	H/O	H/O
NFPSPVDAAFR	P02790 HEMO	5996.6	4781.1	9288.1	8034.3	9737.4	10655.6	6644.6	8324.2	5617.3	4318.6	6009.1	5303.8
ALQDQLVLVAAK	P01019 ANGT	5582.1	4786.5	9130.1	6850.3	5777.5	11305.5	7254.5	5689	5450.4	3752.2	6959.8	5858.2

Продолжение таблицы 12.2

Аминокислотная последовательность пептида	Uniprot ID Protein name	Идентификационный номер пациента											
		989	996	997	1100	1102	1149	1152	1158	722	1038	636	766
		Концентрация пептида в образце, нМ											
FSVYAK	P02765 FETUA	5294.7	3305.1	7288.9	6130.4	7182.5	6353.5	5530.9	4554.6	3616.5	3269.9	5064.2	3084.4
GWVTDGFSSLK	P02656 APOC3	3938.9	2737.8	6330.4	3183.1	4905.7	3849.1	4680.9	6455.3	3474.2	2190.3	4163.7	6346.6
GAYPLSIEPIGVR	P00450 CERU	3861.8	3117.9	5182.5	5184	6562.8	6013.8	4077	5857.7	3697.2	2517.4	4336.7	3834.3
TGISPLALIK	P04114 APOB	3854.6	2612.6	3762.4	2363.6	3728.6	4534.3	3754.7	3784.3	3849	2812.7	3018.4	3810
LSITGTYDLK	P01009 A1AT	2728.8	2545.3	3908.9	3617.7	3539.8	5390.1	3327.7	3707.2	2279.1	2103.9	2312.3	1934
VPGTSTSATLTGLTR	P02751 FINC	1859.7	228.6	272.8	264.9	1103.6	469	804.9	1518.6	861.9	219.3	1538.7	1420.1
STGSWSTLK	P00751 CFAB	1445.3	1088.4	2707.9	2250.4	2051.4	3118	1727.4	2722.3	1419.3	1040.1	1397.8	1568.5
YAATSQVLLPSK	P01871 IGHM	1345.2	3139	8571.4	4018	4029.9	5374.6	2528	1649.3	4553.7	1636.9	1779	1813.8
LLDSLPSDTR	P05155 IC1	1293.4	1019.1	1570.3	1254.6	1834.2	1676.7	1488.7	1844.7	1133.1	910.2	1518.3	1202.9
DGAGDVAFVK	P02787 TRFE	1282.5	1085.6	1806.4	1581.6	2414.8	1859.7	1568.7	1791.9	1064.1	914.8	1387.5	1299.8
FQSVFTVTR	P02747 C1QC	1163.3	660.5	2543.4	1488.1	1857.2	1923.8	1360.7	1539.9	1552.9	1143.3	1183.4	968.8
AADDTWEPFASGK	P02766 TTHY	997.1	1073.4	3584.1	1527.7	1998.4	1748.4	1584.3	1178.5	564.8	387.2	918.7	907.3
YVGGQEHAHLLILR	P02763 A1AG1	944.2	506.8	1454.2	1484.5	340.8	2315.1	1023.9	1003.1	1650.3	1160	1447.7	2376.3
HSIFTPETNPR	P00747 PLMN	678.4	574.7	1030.8	808.8	1163.2	878.6	907.3	845.5	658.3	571.1	1007.9	729.6
ANRPFLVFIR	P01008 ANT3	388.3	284.7	641.7	439.2	421.1	688.2	463.8	392.5	801.6	545.7	591.7	377.6
NIQSLEVIGK	P02775 CXCL7	275.1	280.7	913.7	88.7	429.4	333.4	552.4	451.3	224.6	482.6	271.3	294.9
FSGTWYAMAK	P02753 RET4	199.6	115	209.3	239.3	260.4	232.7	269.6	262.7	342.2	253.2	244.9	268
YLSHDSFLVSQGDR	P04275 VWF	178.9	47.7	85	60	99	79.1	59.1	156.9	82	54.6	120.5	70.2
VYFAGFPR	P07225 PROS	151.4	132.3	151.7	179.3	224	264.8	163.5	248.7	148.5	100.6	176.3	146.1
LQGTLPVEAR	P01031 CO5	149.8	99.4	166.5	140.7	180	231.3	145.2	206.8	94.1	89	150.2	109.5

Продолжение таблицы 12.2

Аминокислотная последовательность пептида	Uniprot ID Protein nam	Идентификационный номер пациента											
		989	996	997	1100	1102	1149	1152	1158	722	1038	636	766
		Концентрация пептида в образце, нМ											
SNALDIIFQTDLTGQK	P09871 C1S	135.7	102	223.9	156.3	106	223.6	152.8	164.7	170	160.2	154.1	152.3
ALDFAVGEYNK	P01034 CYTC	133.9	116.2	189.9	184.8	225	231.5	176.1	276.6	114.8	101.5	145	116.6
IALGGLLPASNLR	P04278 SHBG	93.2	166.1	112.3	156.2	118.5	142.3	114.9	95.2	86.1	99.6	59.7	51.9
NALALFVLPK	P05543 THBG	86.3	63.4	114.9	116.1	76.8	171.6	71.1	86.7	95.8	92.8	93.5	73.9
ATNYNAGDR	P61626 LYSC	84.2	67.9	97.2	212.7	101	145.8	124.7	190.2	55.9	75.6	100.9	62.3
VEHSDLSFSK	P61769 B2MG	48.8	44.8	60.3	86.9	62.2	65.1	72.6	101.2	31.1	43.3	56.6	38.9
YLTNTESTR	P06276 CHLE	45.1	37.2	67.6	45.9	54.9	66.9	55.1	43.8	30.1	36.8	70.4	30.5
VPTGGVEEGLLER	P01880 IGHD	43.9	H/O	113.7	H/O	H/O	37.9	H/O	35.4	H/O	H/O	40.9	78.1
LSSGLVTAALYGR	P43251 BTD	36.9	29.1	51.9	33.4	51.1	49.7	49.9	41.8	37	26.8	32.7	39.3
SALVLQYLR	P00740 FA9	30.3	20.7	37.5	37.2	27.9	60.7	34.4	38.4	33.4	22	39.5	29.9
GTYSTTVTGR	P08519 APOA	20.6	15.2	429.7	300.2	7	149.1	109.6	31.5	39.5	59.6	12.2	9.1
IVVVTAGVR	P07195 LDHB	7.6	4.4	9.6	5.1	5.5	10.1	7	10.2	3.9	5.4	8.2	5.8
LSGLLDLALGK	P04745 AMY1	1.2	H/O	H/O	0.9	1.1	H/O	1.3	H/O	H/O	H/O	H/O	H/O

Таблица 12.3 – Результаты направленного масс-спектрометрического анализа образцов плазмы крови людей группы младшего возраста, в соответствии с разработанным протоколом. H/O – сигнал от пептида не детектировался

Аминокислотная последовательность пептида	Uniprot ID Protein name	Идентификационный номер пациента											
		576	620	666	670	776	1123	1151	1128	813	922	569	1115
		Концентрация пептида в образце, нМ											
DSTYLSSTLTLSK	P01834 IGKC	115068.9	203597.6	213660.9	386751.4	299932.3	203495.6	88088.6	194150.6	136220.6	102911.6	200736.4	220839.9
AIGYLNTGYQR	P01023 A2MG	69727.9	61869.1	92277.3	148824	132022.3	139626	31467.1	63779.7	49014.5	51583.4	45015.9	103812.2
GSESGIFTNTK	P02671 FIBA	14881.7	17081.6	134271	64029.9	60614.6	42697.3	10455.4	18018.9	23347.7	8657.6	39486	39903.4
ATEHLSTLSEK	P02647 APOA1	35968.7	37004.6	75073.3	94365.9	115868.6	78684	15793.3	49791	39903.9	27804.4	47033.6	55690.7
GPSVFPLAPSSK	P01857 IGHG1	28960.6	48456.6	47018.7	90672.3	63012.9	47927.7	17443.3	54336.9	32264.4	23253.3	44197.5	49780.5
TEGDGVYTLNNEK	P00738 HPT	8741.1	11660.1	14166.1	9400.1	25914	5989.7	4517.2	0	6907.5	6962.8	12605.6	10247.5
GPSVFPLAPCSR	P01861 IGHG4	6212.8	20572.5	14912.3	36153.5	25814.9	12255.5	4585.9	8026.4	8805.8	8028.3	15347.7	11974.2
TPLTATLSK	P01876 IGHA1	13498.3	14584.7	31001.1	22125.4	19565.1	18816.4	5846.1	9831.4	9292.7	8919	17110.3	14814.4
LVAYYTLIGASGQR	P01024 CO3	10398.9	13071	16311	29220.9	31881.4	23153.6	5094.4	13632.9	15963.9	8318.1	22113.9	24073.3
YEASILTHDSSIR	P02679 FIBG	4209.9	3757.8	23818.2	12831.8	11770.5	9300.6	2687.5	5276.2	6615	2687.4	9215.9	8379
DNENVVNEYSSELEK	P02675 FIBB	3827.1	3250.7	17598.4	11087.6	9789.4	7313.1	2211	4376.1	3677.6	2277	6404.6	7377
FDPSLTQR	P08697 A2AP	9894.5	10937.1	16558	27605.4	34293.5	20638.9	4975.4	17461.6	8796.6	7759.6	10722.6	15290
DASGATFTWTPSSGK	P01877 IGHA2	3994.6	2363.1	5145.2	5643.9	6201.7	5414	1235.9	1622.4	3098.4	3249	4939.8	5961.4
LEQGENVFLQATDK	P02746 C1QB	2429.7	2747	4594	6345	6644.7	5858.1	1826.1	2225.9	H/O	H/O	H/O	H/O
NFPSPVDAAFR	P02790 HEMO	4284.8	4941.2	7467.9	12842.8	13239.9	8846.2	2284.2	6469	4185.5	2858.2	5800.5	8366.7
ALQDQLVLVAAK	P01019 ANGT	5107.9	6554.1	8907.4	15103.5	18292.6	13265	3423.6	8487.3	5350.1	4103.5	7603.2	11546.2

Продолжение таблицы 12.3

Аминокислотная последовательность пептида	Uniprot ID Protein name	Идентификационный номер пациента											
		576	620	666	670	776	1123	1151	1128	813	922	569	1115
		Концентрация пептида в образце, нМ											
FSVVYAK	P02765 FETUA	2750.3	3538.9	7706.8	6702.4	14334.5	8195.1	2120.5	5456.7	3518.7	2885.4	4198.8	7561.9
GWVTDGFSSLK	P02656 APOC3	1811.8	2156	4966.8	5687.3	8864.5	7191.9	1934.9	2021.4	3482.4	1768.3	4189.3	4964.3
GAYPLSIEPIGVR	P00450 CERU	2449.3	2259.5	4094.5	6516.8	6318.8	4525.2	1117.3	3445.2	2078.2	1883.1	3480.4	4216.4
TGISPLALIK	P04114 APOB	1435.7	1861.7	2644.7	4573.7	8022.4	3980.1	891	1888.3	2033.6	976.7	2796	2910.4
LSITGTYDLK	P01009 A1AT	2122.1	2150.1	3489	5641.2	5095.5	3409.8	1232.3	3577.5	1985.1	1644.1	2359.8	3186.4
VPGTSTSATLTGLTR	P02751 FINC	130.9	527.1	2941.6	904.6	1343.2	1301.7	178.5	154.3	533.1	81	594.9	1069.5
STGSWSTLK	P00751 CFAB	1094.3	1220.5	1666.9	4374.7	2741.7	1561.3	596.6	2025.1	995.8	750.7	1619.2	1714.1
YAATSQVLLPSK	P01871 IGHM	2064.2	2519.2	3324.3	9174.9	6290.8	5213.1	838.9	1791.6	2181	1497.1	1481	2397.2
LLDSLPSDTR	P05155 IC1	1089.7	935.1	1865.9	2701.8	2756.8	2065	494.8	1541.1	771.2	808.8	1321.4	1429.1
DGAGDVAFAVK	P02787 TRFE	1002.4	1143	1591.8	2988.9	3220.5	1909.4	527.1	1771.2	1265.5	613.2	1391.9	1515.1
FQSVFTVTR	P02747 C1QC	760.3	1320.3	1939.6	2589	3047.5	2103.7	478.7	1058.1	902.7	582.7	1161.3	1492.1
AADDTWEPFASGK	P02766 TTHY	1967.4	3591.3	5727.4	2838.5	7895	5869.7	3659.2	3391.8	1391.3	1895.8	1644.5	1805.7
YVGGQEHAHLLILR	P02763 A1AG1	578.7	1398.1	1528.2	3056.1	2281.8	1968.3	281.7	967.5	1723.4	922.1	1896.1	1601.1
HSIFTPETNPR	P00747 PLMN	578.3	612.8	1167.8	1289.2	1604.5	1059.6	301.8	823.9	483.8	474	890.9	990.7
ANRPFLVFIR	P01008 ANT3	341.5	321.9	644.7	470.8	586.5	652.4	261	435.4	412.7	208.5	527.2	590.9
NIQSLEVIGK	P02775 CXCL7	249	129.4	117	122.1	290.1	692.1	100.7	547.7	2041.7	476.6	288	563.6
FSGTWYAMAK	P02753 RET4	117.8	146.9	239	257.7	368.6	235.7	68.1	139.9	271.7	111.1	249.9	282.6
YLSHSHFLVSQGDR	P04275 VWF	56.6	44.7	230.7	102.9	165	89.5	21.2	70.9	50.7	25.8	45.9	93
VYFAGFPR	P07225 PROS	125.5	116.7	209.1	334.5	374.4	237.9	50	167.9	127.8	76.8	153.3	207.1

Продолжение таблицы 12.3

Аминокислотная последовательность пептида	Uniprot ID Protein name	Идентификационный номер пациента											
		576	620	666	670	776	1123	1151	1128	813	922	569	1115
		Концентрация пептида в образце, нМ											
LQGTLPVEAR	P01031 CO5	99.1	78.9	133.2	256.9	232.2	145.6	51.8	133.6	79	26.8	139.6	155.4
SNALDIIFQTDLTGQK	P09871 C1S	115.3	141.3	160.4	256.3	270.3	229.4	106.7	139.5	124.5	150.2	223.2	229.9
ALDFAVGEYNK	P01034 CYTC	106.9	98.7	139.2	209.7	289.5	169.1	61.6	145.6	100.9	79.1	117.6	156.9
IALGGLLPASNLR	P04278 SHBG	52.5	18.3	76	85.3	58.9	58	12.1	70.1	36.3	22.5	48.3	48.9
NALALFVLPK	P05543 THBG	60.5	71.7	141.8	157.8	208	122.4	31.3	111.8	53.9	50.9	83.3	106.7
ATNYNAGDR	P61626 LYSC	61.5	96.3	111.8	153.7	230.2	89.1	36.4	101	75.4	51.2	83.3	115.4
VEHSDLSFSK	P61769 B2MG	31.5	24.3	65	77.4	111.3	62.8	22.5	48.7	47.7	0	70.7	0
YLTNTESTR	P06276 CHLE	31.7	41.3	77.1	57.2	122.1	89.6	21	70.4	40.6	25.5	43.7	67.5
VPTGGVEEGLLER	P01880 IGHD	135	H/O	382.5	414.3	81.8	211.7	121.5	H/O	424.9	H/O	H/O	735.1
LSSGLVTAALYGR	P43251 BTD	19	33.9	43.5	76.2	97.5	44.3	18.8	59.1	42.3	22.7	48.9	54.3
SALVLQYLR	P00740 FA9	20.7	25.4	33.5	59.7	74.1	46.6	13	33.3	25.1	15.9	35	39.6
GYSTTVTGR	P08519 APOA	175.3	22	64.8	188.9	35.2	546.8	57.5	44.7	27.3	14.7	45.2	82.7
IVVVTAGVR	P07195 LDHB	5.4	3.3	9.1	12.4	50.1	10.6	3.1	9.1	4.4	H/O	H/O	H/O
LSGLLDLALGK	P04745 AMY1	H/O	0.6	H/O	1.9	H/O	H/O	H/O	H/O	H/O	H/O	H/O	H/O

Для определения различий двух возрастных групп, мы провели сравнительный анализ содержания детектированных белков. В результате анализа было выявлено значимое (p -value < 0.05 , T-test) различие в содержании белков SHBG (FC = 2,2, содержание выше в образцах плазмы крови, полученной от добровольцев старшей возрастной группы), транстиретина (TTR) (FC = 2,5, содержание выше в образцах плазмы крови, полученной от добровольцев младшей возрастной группы), и иммуноглобулина IGHD (FC = 5,3, содержание выше в образцах плазмы крови, полученной от добровольцев младшей возрастной группы) (Рисунок 12.2). Также наблюдалась тенденция к повышенному содержанию иммуноглобулина IGHA2 в образцах плазмы крови, полученной от добровольцев старшей возрастной группы.

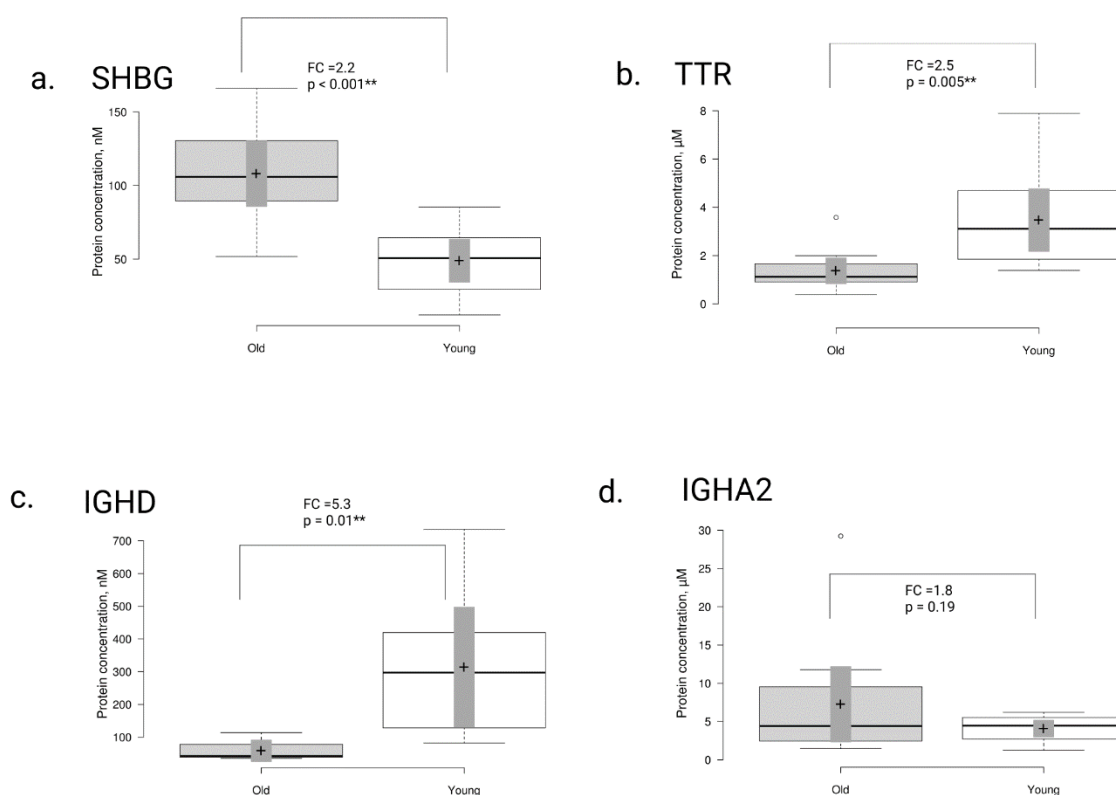


Рисунок 12.2 – Диаграммы размаха («ящик с усами»), для белков SHBG, TTR, IGHD и IGHA2, содержание которых отличалось более, чем в 2 раза, в образцах плазмы крови добровольцев двух возрастных групп (Old – возрастная группа старшего возраста, Young – возрастная группа младшего возраста)

На рисунке 12.3 представлены хроматограммы экстрагированного ионного тока, полученные в результате MRM/SIS анализа для иммуноглобулина IGHG1 и фактора свертывания крови IX.

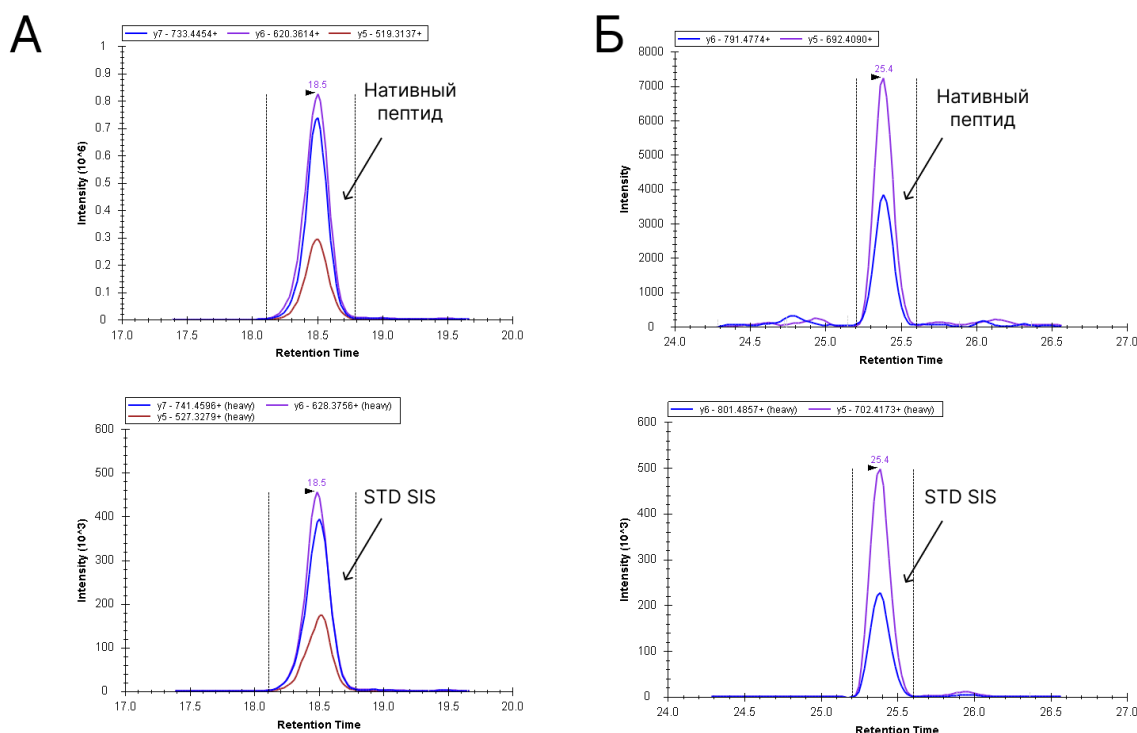


Рисунок 12.3 – Хроматограммы экстрагированного ионного тока, полученные в результате MRM/SIS анализа (А) для иммуноглобулина IGHG1 (IGHG1, пептид GPSVFPLAPSSK) и (Б) для фактора свертывания крови IX (FA9, пептид SALVLQYLR). По оси ОХ – время удерживания, по оси ОУ – интенсивность сигнала. Верхняя панель – сигнал от нативного прекурсора, нижняя панель – сигнал от прекурсора синтетического стандарта SIS

В результате MRM/SIS анализа содержание белка IGHG1 (IGHG1, пептид GPSVFPLAPSSK) и фактора свертывания крови IX (FA9, пептид SALVLQYLR) в плазме крови составило $47,7 \pm 22,97$ мкМ и $34,8 \pm 13,90$ нМ, соответственно. Время удерживания на колонке обращенной фазы совпадает для всех мониторируемых транзиций, в результате на хроматограмме экстрагированного ионного тока регистрируется четкий хроматографический пик, как для SIS стандарта, так и для нативного пептида. Кроме того, для синтетического пептида и его природного аналога наблюдается похожий паттерн фрагментации.

12.3. Заключение к разделу 12

Согласно п.1.12 ПГ проведен направленный масс-спектрометрический анализ более 15% (N= 24) образцов плазмы крови людей различных возрастных групп в соответствии с разработанным Протоколом, который согласно п.4.12 и п.5.11 ТЗ

включал в себя применение хромато-масс-спектрометрии на масс-спектрометре типа тройной квадруполь по разработанному методу мониторинга множественных реакций, измерение в одном техническом повторе количественного содержания пептидов, соответствующих синтезированным стандартам для белков в каждом из представленных образцов и идентификацию белков по полученным спектрам, которая проводилась в подходящем программном обеспечении. В результате работ получен перечень детектированных белков с указанием их концентрация в каждом образце. Первичные данные MRM для перечня белков согласно п.3.12 ТЗ загружены в репозиторий PeptideAtlas через PASSEL и доступны по идентификатору (код эксперимента) PASS05901 (Username: PASS05901, Password: MU244ch).

13. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ МЕТАБОЛИТОВ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ АНАЛИЗА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ДОНОРОВ РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП, ДОСТУПНЫХ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ РАЗНЫМИ МЕТАБОЛОМНЫМИ ПОДХОДАМИ

Согласно п.4.13 ТЗ работы по п. 1.13 ПГ должны включать анализ литературы и данных метаболомных репозиториюв. В подразделах 13.1 и 13.12 описаны результаты анализа литературных источников, в подразделе 13.4 описаны результаты анализов баз данных – репозиториюв метаболомных данных.

13.1.Получение научного задела для создания метаболических часов на основе прямой масс-спектрометрии

Научные исследования в области геронтологии требуют использования объективных критериев оценки возраста и состояния организма. Такие критерии позволяют показать эффективность антиэйджинговой лекарственной терапии и иных интервенций, включая специализированные диеты, физиотерапию, физические упражнения. Биологические часы на основе метаболических данных (метаболические часы) являются многопараметрической характеристикой состояния организма, напрямую связанной с его молекулярным фенотипом. Поэтому, ожидаемая точность и высокая информативность метаболических часов делает их разработку и применение в данном проекте обоснованной и актуальной задачей. В связи с этим было проведено поисковое исследование возможности использования накопленных на сегодня метаболических данных для создания метаболических часов.

Известно, что частота многих заболеваний увеличивается с возрастом и приводит к мультиморбидности, характеризующейся наличием одновременно множества заболеваний в пожилом возрасте. Этот феномен тесно связан с системными метаболическими изменениями, поэтому наиболее подходящим способом их детекции и изучения является метаболомика. Использование накопленных метаболомных данных может дать представление о силе связи старения и болезней на системном уровне и предоставить основу для создания метаболических часов. С целью сравнения метаболических изменений, связанных со старением человека, и метаболических изменений при различных патологических

состояниях, опубликованные результаты метаболомных исследований старения человека были сопоставлены с данными об изменениях метаболитов, собранными в базе данных метаболома человека с помощью анализа обогащения наборов метаболитов (MSEA) и комбинаторного анализа. Было обнаружено, что старение человека и патологические состояния ассоциированы с изменениями в одних и тех же метаболических путях с вероятностью 99,96%. Эти данные показывают высокую идентичность процессов старения и развития заболеваний на метаболическом уровне и позволяют выделить совокупность метаболических путей, отражающих возрастные изменения, тесно связанные со здоровьем. На основе этих путей был составлен метаболический метапуть, изменения в котором одновременно ассоциированы со здоровьем и возрастом.

В метапуть вошли следующие метаболические пути: «биосинтез аргинина», «биосинтез валина, лейцина и изолейцина», «обмен аланина, аспартата и глутамата», «обмен бутаноата», «обмен глиоксилата и дикарбоксилата», «биосинтез фенилаланина, тирозина и триптофана». Обогащение метапути как метаболитами, связанными со старением, так и метаболитами, связанными с патологическими состояниями, было одинаково высоким (p -значение $3,6 \times 10^{-12}$ и $1,3 \times 10^{-10}$, соответственно). Таким образом, выраженная связь старения и патологических состояний была подкреплена статистически достоверным доказательством на метаболомном уровне, что также позволило выделить связанное с возрастом и здоровьем место в метаболизме человека.

На основе метаболитов, входящих в метапуть, также была выдвинута гипотеза, что здоровое старение можно рассматривать как старение без существенных нарушений в энергетической составляющей метаболизма.

Практическое применение выявленного метапути имеет огромный потенциал. Анализ обогащения метапути отклоняющимися от нормы метаболитами с помощью MSEA, который широко используется в метаболомике, позволяет получить метрику возрастных и связанных со здоровьем изменений в организме, что, по сути, является основой для разработки метаболических часов. Подобные метаболические часы позволяют проводить геронтологические исследования с использованием объективной метрики возраста и состояния организма человека, а также оценивать эффективность антиэйджинговых интервенций, в том числе с применением такого

фосфолипидного препарата как Витафосфолип® (См. Раздел 4 подраздел 4.2).

13.2. Особенности изменений метаболома человека в ходе процессов, ассоциированных со старением

Ключевой особенностью геронтологических исследований является комплексная природа старения, обусловленная одновременным влиянием множества факторов, как внутренних, так и внешних. Учет этих факторов необходим не только на этапах дизайна эксперимента, но и при интерпретации получаемых данных. Старение сопровождается множеством возрастзависимых заболеваний, интенсивность проявлений которых зависит от индивидуальных особенностей испытуемого. В контексте омиксных исследований в области геронтологии, изменения в регуляторных путях, ассоциированные с возрастзависимыми заболеваниями в значительной степени усложняют выявление изменений, связанных в первую очередь со старением организма, а не с проявлением какой-либо из патологий.

Наибольший интерес с точки зрения оценки фенотипического профиля представляют исследования изменения метаболома, ассоциированные со старением. Многообразие малых молекул (Human Metabolome database содержит более 200 000 записей [421]), участвующих в регуляторных путях человека и число самих регуляторных путей (более 13 000 реакций только для 4000 соединений [422]), обуславливает потребность в детальном изучении метаболомного профиля исследуемых образцов биологических жидкостей или тканей. В последние десятилетия с развитием аналитического инструментария появилась возможность проведения ненаправленных метаболомных исследований, целью которых является получение максимально информативного массива данных, описывающего компонентный состав образца. В связи с этим был накоплен массив работ, направленных на изучение изменений в метаболомном профиле больших выборок испытуемых, в том числе в контексте лонгитудинальных исследований. Применительно к старению, имеющиеся данные метаболомного профилирования, основанные на работах, проводившихся в последние два десятилетия, позволяет выявить общие тенденции в протекании этого феномена, в том числе в отрыве от сопутствующих патологий.

В работе [423] авторы проанализировали множество наборов данных, взятых из исследований, посвященных изучению изменений метаболома, сопряженного со старением. В выборку попали как данные из открытых метаболомных баз экспериментальных данных, так и баз, интегрированных с банками биообразцов, таких как: UK Biobank (500 000 участников), программа Trans-Omics for Precision Medicine (более 60 000 образцов) и Consortium of Metabolomics Studies (COMETS). Авторы объединяли разные по структуре данные, полученные преимущественно с использованием хромато-масс-спектрометрии и спектроскопии ядерно-магнитного резонанса (ЯМР), причем как в направленном, так и в ненаправленном вариантах. По результатам метаанализа было выявлено семь групп процессов, а также ассоциированных с ними регуляторных путей и метаболитов, изменения в которых в явном виде проявляются в ходе старения: изменения в уровне некоторых классов липидов, снижение уровня некоторых стероидных гормонов, изменения в регуляторных путях, связанных с работой мочевыделительной системы, изменение в уровне ряда аминокислот, влияние диеты, окислительный стресс и воспалительные процессы.

В случае липидного профиля, рассмотренные выборки демонстрируют повышение концентраций триглицеридов, жирных кислот и холестерина, при этом наблюдается некоторая задержка в случае женской половины выборки, обусловленная гормональной защитой, проявляющейся до наступления менопаузы. Эти изменения подчеркивают важность мониторинга липидного профиля у пожилых людей и возможности его коррекции с помощью диеты, физической активности и фармакологических препаратов.

Для большинства проанализированных данных общие тенденции наблюдаются в снижениях концентраций андрогенов, эстрогенов, прегненолонов, а также дегидроэпиандростерон-сульфата (DHEA-S). У женщин после наступления менопаузы гормональные изменения особенно выражены. Снижение уровня эстрогенов и прогестерона сопровождается увеличением воспалительных процессов, а также нарушением метаболических путей, таких как цикл трикарбоновых кислот и метаболизм мочевины. Падение уровня DHEA-S связано с увеличением риска остеопороза, сердечно-сосудистых заболеваний, саркопении и когнитивных нарушений.

Функции мочевыводящей системы неизбежно ухудшаются с возрастом, что проявляется в снижении скорости клубочковой фильтрации и способности почек поддерживать гомеостаз организма. Это приводит к повышению уровней креатинина и мочевины в крови, что указывает на снижение эффективности экскреции. Другим выявленным маркером возрастных изменений почечной функции является уровень триметиламин-N-оксида (ТМАО), метаболита, образующегося из компонентов пищи, включая рыбу и мясо. Повышение уровня ТМАО связано не только с ухудшением функции почек, но и с развитием сердечно-сосудистых заболеваний, что делает его важным индикатором для мониторинга в пожилом возрасте.

Уровень большинства аминокислот, включая лейцин, изолейцин и валин, в плазме увеличивается. Это может быть связано с усилением катаболизма белков, вызванным снижением эффективности их переработки и утилизации в стареющем организме. С другой стороны, уровень триптофана уменьшается, что вероятно связано с нарушением серотонинового пути и изменениями в когнитивных функциях, так как триптофан служит прекурсором серотонина, важного нейромедиатора.

Часть выявленных закономерностей в динамике концентраций метаболитов были ассоциированы с возрастными изменениями в диете: к примеру, увеличение уровня кофеина, снижение уровня параксантина, изменения в содержании креатина, креатинина и триметиламинооксида, сопряженные с уменьшением доли мясных и рыбных продуктов в диете, а также снижение уровня гидроксибензоата вследствие меньшей доли фруктов в рационе.

Изменения в регуляторных путях, связанных с протеканием окислительного стресса выражаются в снижении концентраций ацилкарнитинов, глутатиона и его производных, а также росте концентраций сфинголипидов. Воспалительные процессы ассоциированы с изменениями в содержании метаболитов, связанных с системой цитохрома P450, кинуреновой кислоты, а также снижением концентраций лизофосфолипидов.

13.3. Метаболомные маркеры заболеваний, ассоциированных со старением

Основными сложностями при составлении метаболомного портрета

“здорового старения” являются упомянутые выше возрастзависимые заболевания, проявления которых в значительной степени могут влиять на регуляторные пути человека. В связи с этим при формировании перечней целевых метаболитов, ассоциированных с процессами старения, отдельно следует выделять соединения, изменения в содержаниях которых ассоциированы с возрастзависимыми заболеваниями. К ним относят патологии сердечно-сосудистой системы, нейродегенеративные заболевания, онкологические заболевания, болезни костей, а также некоторые болезни эндокринной системы. Учитывая социальную значимость упомянутых заболеваний, к настоящему моменту накоплен большой массив экспериментальных данных по исследованию многих типов возрастзависимых заболеваний. Среди накопленных данных есть как результаты метаболомных исследований, так и многомерные массивы, отражающие несколько омикс-слоев передачи генетической информации. В таблице 13.1 приведены ключевые маркеры заболеваний, выявленные по результатам метаболомного профилирования.

Таблица 13.1 – Метаболомные маркеры возрастзависимых заболеваний, выявленные по результатам литературного поиска

Соединения	Патология	Комментарий	Ссылка
Фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламины, сфингомиелины, керамиды, лизофосфатидилхолины, лизофосфатидилэтаноламины, холестерилвые эфиры, триацилглицериды, диацилглицериды, плазмалогены, сульфатиды, ганглиозиды, фосфатидилсерины, фосфатидилинозитолы, фосфатидные кислоты, кардиолипины	Болезнь Альцгеймера	По результатам мультиомного анализа геном-модифицированных мышей были выявлены 133 липидных маркера протекания болезни Альцгеймера. Описательная способность отобранного набора соединений была проверена в ходе анализа образцов плазмы стратифицированной выборки здоровых и больных альцгеймером пациентов. Значительные изменения наблюдались в случае соединений в регуляторных путях связанных с метаболизмом холестерина и фосфолипидов.	[424]
Церамид (d18:1/16:0), Церамид (d18:1/18:0), Церамид (d18:1/20:0), Церамид (d18:1/22:0), Церамид (d18:1/24:0), Церамид (d18:1/24:1), Сфингомиелин (d18:1/16:0), Сфингомиелин (d18:1/18:0), Сфингомиелин (d18:1/20:0), Сфингомиелин (d18:1/22:0), Сфингомиелин (d18:1/24:0), Сфингомиелин (d18:1/24:1), Дигидроцерамид (d18:0/16:0), Дигидроцерамид (d18:0/18:0), Дигидроцерамид (d18:0/24:0), Сфингозин-1-фосфат (S1P), Глюкозилцерамид (d18:1/16:0), Лактозилцерамид (d18:1/16:0)	Болезнь Альцгеймера	Наибольший вклад в изменение липидома в ходе протекания болезни Альцгеймера вносят метаболиты, участники регуляторных путей связанных с сфингозин-фосфатом.	[425]

Продолжение таблицы 13.1

Соединения	Патология	Комментарий	Ссылка
Олеамид	Болезнь Альцгеймера	Значения концентраций олеамида вносили наибольший вклад в описательную способность классификационной модели для дифференцирования пациентов с диагностированным альцгеймером, против пациентов с легкими. На примере анализа везикул из микроглии мышей показаны различия в содержании олеамида между простимулированными и нестимулированными культурами.	[426]
Холестерин, PE (38:0/38:1), lysoPE 2:4, NAPE (16:0/18:0/20:4)	Болезнь Альцгеймера	Среди выявленных маркеров, только для холестерина наблюдалось снижение концентрации в случае образцов пациентов с диагностированной болезнью Альцгеймера.	[427]
Кинуренин, аргинин, цитруллин, метионин, аспарагин, серин, триптофан, гомосерин, саркозин, 4-гидрокси-пролин, цистеин, тирозин, кинуреновая кислота, орнитин	Остеопороз	По сравнению со здоровыми людьми, уровни 14 аминокислот в сыворотке крови пациентов с остеопорозом значительно изменились. Кинуренин, аргинин, цитруллин, метионин и их комбинации являются потенциальными биомаркерами для диагностики остеопороза..	[428]
Глицин, лейцин, изолейцин, тирозин, холин, таурин, валин, метионин, цитруллин, карнитин, гипоксантин, пролин, 3-метил-2-оксвалериановая кислота, изовалерилкарнитин, изовалерил глицин, гомоаргинин, гипоксантин, 2-аминогептаноат, додекановая кислота, LPC(18:0)	Остеопороз	Метанализ 16 работ, посвященных изменениям в метаболическом профиле пациентов, больных остеопорозом	[429]
Гистидин, триптофан, симметричный диметиларгинин (SDMA), N-метил-1-гистидин, путресцин, сульфоксид метионина, 5-гидроксилизин, кинуренин	Сердечная недостаточность	Направленное исследование (83 целевых метаболита) на выборке в 1700 пациентов.	[430]
LPC(18:0), LPA(18:1), LPG(18:1), LPI(20:3), PE(O-30:0), PG(40:7), SM(d34:0), SM(d34:1), CerP(d34:1), PA(38:7), PA(40:6), PA(40:9), LPE(18:2), PG(38:5), PG(38:4), PG(O-38:8), PG(36:7), PG(40:8), PGP(38:5), PGP(40:8), PI(40:7), N-стеароил глютамин, гептаноилкарнитин, сульфат холестерина	Атеросклероз	Авторы, по результатам анализа образцов тканей больных мышей, выявили набор маркеров, ассоциированных с протеканием заболевания. После чего оценили эффективность выбранного набора данных для оценки риска заболеваний сердечно-сосудистой системы по результатам анализа образцов плазмы пациентов с диагностированным заболеванием ССС.	[431]

Продолжение таблицы 13.1

Соединения	Патология	Комментарий	Ссылка
3-гидроксикинуруенин, дигидрооротат, UDP, цис-аконитат, тирозин, фенилаланин, глюкоза, креатин, креатинин, глутамин, глутамат, кинуруенин, оксаминовая кислота, церамид, сфингомиелин	Глиобластома	В исследовании приняли участие 21 пациент с недавно диагностированной глиобластомой, клинические исходы которых были классифицированы как благоприятные (PFS $\geq$ 9 месяцев) или неблагоприятные (PFS < 9 месяцев). Цель работы заключалась в выявлении метаболических и липидных биомаркеров в плазме и слюне, которые могли бы служить минимально инвазивными прогностическими инструментами для мониторинга прогрессирования заболевания и ответа на терапию.	[432]
Пируват, 5-гидроксиметилурацил, аргинил-пролин, фосфатидилсерин (38:9), 3-О-сульфогалактозилцерамид (42:1), 3-оксодеканоил-КоА, N-ацилфосфатидилэтаноламин (NAPE)	Глиобластома	В исследовании участвовали 24 пациента с глиобластомой (ГБ) и 50 здоровых добровольцев в контрольной группе. Основной целью работы было выявление метаболических биомаркеров в плазме крови для лучшего понимания биохимических изменений, связанных с глиобластомой, а также разработки новых инструментов для диагностики, мониторинга прогрессии и оценки эффективности лечения. Анализ проводился с использованием масс-спектрометрии, чтобы определить уникальные метаболиты, характеризующие различия между пациентами с ГБ и здоровыми участниками.	[433]
Оксалат, гликолят, глицин, глицериновая кислота, аминомалоновая кислота, креатинин, аланин, фосфат, пролин, серин, треонин, малат, пироглутамат, пирофосфорная кислота, аспарагин, глутамин, орнитин, лизин, пальмитиновая кислота, мио-инозитол, монопальмитин, арахидоновая кислота	Аденокарцинома	В исследовании приняли участие 1083 человека, включая 670 пациентов с аденокарциномой легкого (LUAD), 135 пациентов с доброкачественными узелками легких (BLN) и 278 здоровых участников в контрольной группе. Целью работы было выявление метаболических маркеров в плазме крови, связанных с прогрессией аденокарциномы легкого, для улучшения диагностики, оценки риска и прогнозирования заболевания. Анализ проводился с использованием газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (GC/MS), а также машинного обучения для создания моделей, позволяющих различать группы пациентов.	[434]

Продолжение таблицы 13.1

Соединения	Патология	Комментарий	Ссылка
L-лейцин, L-лизин, 4-ацетамидомасляная кислота, ацетат, L-пролин, ацетоацетат, 3-гидроксипируват, L-глутамат, пируват, L-цистин, глутатион, L-аспарагин, этаноламин, L-гистидин, L-тирозин, мио-инозитол, глицерин	Рак щитовидной железы	В исследовании приняли участие 55 участников, разделенные на три группы: 20 пациентов с папиллярным раком щитовидной железы (РТС), 16 пациентов с многоузловым зобом (MNG) и 19 здоровых добровольцев. Целью работы было использование нецелевого метаболомного анализа на основе спектроскопии ядерного магнитного резонанса (NMR) для выявления метаболитических биомаркеров, которые позволяют отличать РТС от здорового состояния и MNG.	[435]
Лактат, β-гидроксипируват, ацетоацетат, пируват, глутамат, манноза, таурин, гипотаурин, аланин, аспартат, глицин, сукцинат, треонин, глюкоза, инозитол, аспарагин, пролин, фенилаланин, тирозин, тетрадецилоилкарнитин, пальмитоилкарнитин, пиперамид	Рак груди	В исследовании участвовали пациенты с различными стадиями рака молочной железы, включая ранние и метастатические формы, а также здоровые участники для сравнения. Исследование включало анализ образцов тканей, плазмы и других биологических жидкостей с использованием современных методов метаболомики и липидомики для изучения специфических метаболитических изменений, связанных с раком молочной железы.	[436]
Пироглутаминовая кислота, гидрокситигециклин, себациновая кислота, L-триптофан, 3-гидроксимасляная кислота, 9,12,13-TrHOME, валин, 13-OxoODE	Колоректальный рак	Авторы, по результатам анализа образцов плазмы пациентов из стратифицированной выборки в 2000 человек выявили ряд соединений маркеров, вовлеченных в протекание колоректального рака.	[437]

13.4. Базы данных, содержащих информацию о метаболитах и других биомолекулах, связанных со старением

В последние годы было создано множество баз данных, содержащих информацию о метаболитах и других биомолекулах, связанных со старением (таблица 13.2). Некоторые из этих баз данных сосредоточены исключительно на человеке, другие охватывают широкий спектр организмов. Например, база данных MetaboAge специализируется на данных о возрастных изменениях метаболомного профиля исключительно у человека, предоставляя ценную информацию о метаболитах и их роли в процессах старения. Аналогично, HALL (Human Ageing Genomic Resources) содержит данные только о человеке, но сосредотачивается на различных уровнях передачи информации (геномный, транскриптомный, протеомный, метаболомный и др.). HALL является уникальным и ценным

инструментом, который заполняет значительный пробел в исследованиях, связанных со старением и долголетием. Все данные в HALL собираются вручную из литературы и извлекаются из существующих баз данных, что делает его надежным источником многомерных наборов данных.

Другие базы данных, такие как Aging Atlas и AgeAnnoMO не специализируются только на человеке. Aging Atlas интегрирует информацию на различных омикс-уровнях: от геномики до метаболомики, что позволяет исследовать общие механизмы старения между видами. AgeAnnoMO, в свою очередь, аннотирует мультиомные данные для разных организмов, предоставляя возможности для анализа эволюционных аспектов и межвидовых сравнений.

Отдельно стоит упомянуть Human Metabolome Database (HMDB) как один из наиболее полных и широко используемых источников информации о человеческом метаболоме. Для некоторых метаболитов, представленных в данной базе, можно найти информацию о возрастных изменениях со ссылкой на соответствующие публикации. Хотя база данных напрямую не специализируется на изучении старения, она активно применяется в исследованиях возрастных изменений благодаря своей обширной аннотации метаболитов и доступу к данным о метаболических путях.

Таблица 13.2 – Базы омиксных данных, ассоциированных со старением

База данных	Омиксные уровни	Последнее обновление	Ссылка
MetaboAge DB	Метаболом	2020	[438]
HALL	Геном, транскриптом, протеом, метаболом, микробиом	2023	[439]
Aging Atlas	Геном, эпигеном, транскриптом, метаболом, протеом	2024	[440]
AgeAnnoMO	Геном, эпигеном, транскриптом, метаболом, протеом, микробиом	2024	[441]
Human Metabolome Database	Метаболом	2022	[421]

13.5. Формирование перечня метаболитов, перспективных для анализа в плазме крови доноров разных возрастных групп

Согласно п 5.12 ТЗ для составления перечня перспективных метаболитов, должны быть проведены работы по унификации наименования низкомолекулярных

соединений (из-за существования не менее четырех систем зачастую конфликтующих обозначений).

Критичным аспектом формирования баз данных целевых соединений является выбор системы наименований, от которой в итоге будет зависеть пайплайн применения инструментальных методов для определения тех или иных групп соединений. Общепринятая практика в контексте анализа образцов тканей и биологических жидкостей человека предполагает использование структурных идентификаторов (таких как InChI, InChIKey и SMILES) и идентификаторов из баз данных малых органических соединений (Pubchem, SPIDER, HMDB). Вторым вариантом позволяет напрямую обращаться к упомянутым базам данных с целью получения дополнительной информации: физико-химических свойств, экспериментальных характеристик, а также ассоциированных регуляторных путей. Однако несовершенство инструментов для обращения к большинству глобальных баз данных, а также возможность существования дубликатов или вовсе отсутствие записи о соединении не позволяет использовать этот тип идентификаторов для формирования баз с целью их использования для составления инструментальных методов. Использование структурных идентификаторов, напротив, сохраняет критическую информацию о структуре соединения, позволяет проводить расчет теоретических физико-химических параметров и проводить поиск по базам данных [442]. В рамках настоящей работы, для унификации предлагается использовать идентификаторы InChIKey в связи с простотой их записи, конвертации и использования их при обращении к библиотекам малых органических молекул.

13.6. Заключение к Разделу 13

Согласно п 1.13 ПГ и в соответствии с пп 3.13, 4.13 и 5.12 ТЗ сформирован перечень метаболитов, ассоциированных с протеканием возрастзависимых патологий. Перечень составлен по результатам анализа литературы и метаболомных репозиторий и представлен в Приложении П.

По результатам работ подготовлена публикации:

1.Kiseleva, O.I.; Arzumanyan, V.A.; Ikhalaynen, Y.A.; Kurbatov, I.Y.; Kryukova, P.A.; Poverennaya, E.V. Multiomics of Aging and Aging-Related Diseases. Int. J. Mol. Sci. 2024, 25, 13671. <https://doi.org/10.3390/ijms252413671>. (Публикация №7 с составе

пакета отчетной документации).

2.Lokhov, P.G.; Balashova, E.E.; Maslov, D.L.; Trifonova, O.P.; Archakov, A.I. Aging and Pathological Conditions Similarity Revealed by Meta-Analysis of Metabolomics Studies Suggests the Existence of the Health and Age-Related Metapathway. *Metabolites* 2024, 14, 593. <https://doi.org/10.3390/metabo14110593>. (Публикация №3 с составе пакета отчетной документации).

14. РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА (МЕТОДИКИ) ОЦЕНКИ ОБЩЕГО СОДЕРЖАНИЯ МЕТАБОЛИТОВ В ОБРАЗЦЕ ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕЙ НОРМИРОВКИ ПРИ СОПОСТАВЛЕНИИ ОБРАЗЦОВ

Метаболиты – это малые молекулы с весом до 1500 Да, являющиеся субстратами и продуктами химических реакций, которые протекают в живых системах. Метаболом – это сумма метаболитов, представленных в объекте в конкретный момент времени. Будучи финальным этапом передачи генетической информации, метаболом человека отражает сумму молекул, возникающих в результате взаимодействий 20 тыс. генов, 60 тыс. транскриптом и более 1 млн протеоформ в динамически изменяющейся внешней среде. Сведения о том, как организм реагирует на возникновение болезни, преобразует питательные вещества и избавляется от ксенобиотиков, необходимы для формирования представления о фенотипе биологической системы.

Для профилирования метаболома биологических образцов различной природы рутинно используется тандем газового хроматографа с масс-спектрометром (ГХ-МС) – стабильная аналитическая платформа, поддерживаемая рядом программных решений и спектральных библиотек для процессирования экспериментальных данных. Прозрачность процессирования данных, генерируемых ГХ-МС системами, в некоторой степени компенсируется сложностью преаналитических процедур, которые включают помимо традиционных стадий остановки ферментативных процессов и экстракции еще и метоксимацию и дериватизацию метаболитов. Целью данного этапа выполнения проекта стала разработка протокола метаболомного профилирования образцов плазмы крови, адаптированного к анализу больших батчей биологических образцов. Следование итоговому протоколу должно обеспечить:

- контроль качества проведения преаналитических стадий и оценку воспроизводимости хромато-масс-спектрометрических экспериментов с помощью стандартных соединений,
- экстракцию низкомолекулярных соединений из целевых биологических образцов и их преаналитическую подготовку,
- рациональное использование ресурсов (с точки зрения реагентки, а также трудо- и временных затрат) при подготовке образцов,

- формирование полуколичественных профилей метаболомов исследуемых образцов,
- формирование собственной библиотеки хромато-масс-спектров коровых низкомолекулярных соединений, циркулирующих в плазме крови человека, которая помимо сведений о картине фрагментации соединения при ионизации электронным ударом содержит информацию о времени хроматографического удержания.

Протокол идеологически разделен на три самостоятельных этапа:

3. Подготовка проб плазмы крови и стандартных смесей;
4. Проверка пригодности хроматографической системы;
5. Проведение метаболомного анализа, в том числе биоинформатическая обработка экспериментальных данных.

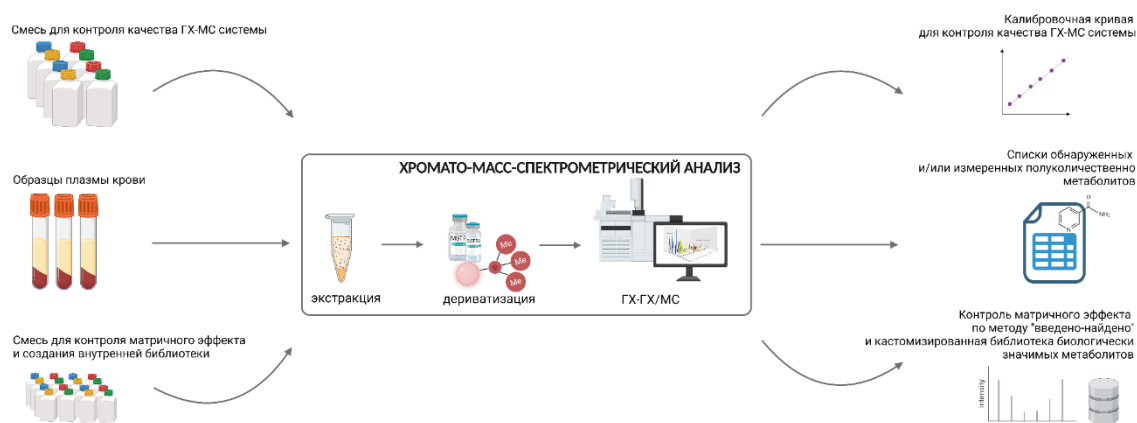


Рисунок 14.1 – Общая схема метаболомного эксперимента, используемая при разработке Протокола. Исследователь подготавливает смесь для контроля пригодности системы (см. п. 5), целевые образцы плазмы крови (см. п. 6), а также смесь стандартов для контроля матричного эффекта и создания внутренней хромато-масс-спектрометрической библиотеки (см. п. 7). Все смеси и образцы подготавливаются: образцы плазмы крови экстрагируются, метоксимируются и дериватизируются (см. пп. 6 и 8), чистые стандартные смеси - только метоксимируются и дериватизируются (см. пп. 7 и 8). Далее дериватизированные метаболиты и стандартные соединения направляются на хромато-масс-спектрометрическое исследование (см. п. 9). Перед первичной интерпретацией (см. пп. 10) следует убедиться в исправности ГХ-МС системы (см. п. 11). Списки идентифицированных метаболитов далее подготавливаются к рапортированию (см. п. 12), некоторые из находок могут быть дополнительно верифицированы с помощью ранее созданной кастомизированной библиотеки (см. п. 13)

В соответствии с п 1.14 ПГ и с п.п. 3.14, 4.14, 5.13 и 6.1.8 ТЗ разработан Протокол оценки общего содержания метаболитов в образце для последующей нормировки при сопоставлении образцов (Приложение Р).

Результаты работы, полученные при выполнении пп.1.13 и 1.14 ПГ частично использованы при подготовке диссертационной работы Арзуманян В.А. по теме «Молекулярный профиль опухолевой клеточной линии НерG2», представленной на соискание степени кандидата наук (назначена дата защиты 13 февраля 2025 года).

15. ТЕСТОВОЕ НАНОПОРОВОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ (ВК)ДНК - ПОДБОР УСЛОВИЙ ПРОБОПОДГОТОВКИ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК И ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА, АНАЛИЗ ДАННЫХ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФРАГМЕНТОМА И МЕТИЛОМА

Работы по п.1.15 ПГ выполнялись Соисполнителем - Федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Пирогова», (химический факультет) по Договору № 13/К от 16 августа 2024, заключенному в рамках текущего проекта. В работе Соисполнителем также использованы результаты работы Сергеева А.В., выполненные по Договору ГПХ №18К/223, заключенному с ИБМХ. В том числе использованы данные анализа литературы по возможности создания «часов старения» на основе анализа внеклеточной ДНК и по выбору метода обнаружения модификаций ДНК.

Целью работ по п.1.15 ПГ являлось определение оптимальных параметров проведения эксперимента по нанопоровому секвенированию, включая оценку необходимого количества ДНК для безамплификационного протокола. В результате отбора выбраны оптимальные параметры проведения эксперимента, включая протокол анализа данных на присутствие 5-метил-цитозина, 6-метиладенина, 5-гидроксиметилцитозина. Выполнена оценка необходимого количества ДНК для безамплификационного протокола проведения эксперимента.

Согласно п. 4.15 ТЗ работы по п.1.5 ПГ включали:

Работы «Проверка распределения модельной ДНК и/или вкДНК по длинам фрагментов».

Работы «Подбор условий пробоподготовки модельной ДНК для получения достаточного количества данных при нанопоровом секвенировании без амплификации ДНК».

Согласно п .5.14 ТЗ выполнены следующие требования:

Протокол пробоподготовки модельной ДНК должен наиболее полно соответствовать протоколу работы с вкДНК и сохранять фрагменты ДНК малых размеров.

Протокол обработки данных секвенирования вкДНК должен минимизировать потери данных при анализе коротких последовательностей ДНК.

В результате выполнения работ сделана оценка возможности и обоснованности создания «молекулярных часов» старения на основе анализа внеклеточной ДНК. Проведенный анализ данных позволяет сделать вывод о возможности создания более эффективных (лучше предсказывающих биологический возраст, требующих проведения только одного анализа), комплексных (вычисляется и суммируется вклад различных биологических процессов, влияющих на старение) «часов старения» на основе анализа фрагмента и эпигенетического ландшафта внеклеточной ДНК за счет использования методов, позволяющих анализировать единичные молекулы ДНК. Метод оптимального выбора, позволяющего оценить все вышеперечисленные параметры и реализовать определение в одном эксперименте — это секвенирование единичных молекул на основе длинных прочтений. При минимизации количества плазмы крови, необходимого для анализа, предпочтительным выбором будет нанопоровое секвенирование, и мы предлагаем использовать его для создания «часов старения» — комплексной оценки состояния организма на основе сокращения и кластеризации данных длины фрагментов, их последовательностей, положения и состава модификаций и повреждения нуклеотидных остатков вкДНК. Мы предлагаем назвать такой подход cfDNAgeLong как сокращение от внеклеточная ДНК для оценки возраста на основе длинных прочтений — «cell free DNA as age evaluation based on long reads».

Предложен и протестирован протокол пробоподготовки, который позволил провести нанопоровое секвенирование модельной, коммерчески доступной, фрагментированной геномной ДНК из клеток Raji, имитирующих вкДНК из плазмы крови. Подтверждена возможность изучения фрагмента вкДНК путем нанопорового секвенирования. Необходимое количество ДНК для безамплификационного протокола проведения эксперимента оценено в 50 нг. Подготовлены рекомендации о количестве образцов на один запуск секвенатора. Также сделан вывод о необходимости оптимизации протокола для увеличения количества и качества получаемых данных. Разработан и протестирован протокол секвенирования и обработки данных на примере модельных ДНК (Приложение С). Показано, что этот протокол позволяет проводить анализ распределения длин фрагментов — фрагмента вкДНК. Протокол позволяет идентифицировать

фрагменты малых размеров – от 50 п.н. Показана применимость технологии нанопорового секвенирования для получения высококачественных данных о последовательностях вкДНК, в том числе небольшой длины (50-500 пар нуклеотидов). В то же время, для оптимизации качества получаемых результатов следует минимизировать инкубацию вкДНК на комнатной температуре в плазме крови. Идентификация модифицированных оснований по данным нанопорового секвенирования требует дальнейшей оптимизации для исключения эффектов, связанных с пробоподготовкой.

По результатам работ подготовлена публикации:

1. А.В. Сергеев, О.В. Кисиль, А.А. Ерёмин, А.С. Петров, М.Э. Зверева "Часы старения" на основе внеклеточной ДНК. Публикация принята в печать в журнал «Успехи химии» (прилагается справка о принятии к публикации). Переводная версия публикуется как спецвыпуск журнала Special issue. BIOLOGICAL CHEMISTRY REVIEWS. (Публикация №13 в составе пакета отчетной документации)

2. Kisil, O.; Sergeev, A.; Bacheva, A.; Zvereva, M. Methods for Detection and Mapping of Methylated and Hydroxymethylated Cytosine in DNA. *Biomolecules* **2024**, *14*, 1346. <https://doi.org/10.3390/biom14111346> (Публикация №10 в составе пакета отчетной документации).

16. РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА ПОЛУЧЕНИЯ *IN VITRO* МОДЕЛИ СТАРЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК (МСК) ЧЕЛОВЕКА

Постнатальные стволовые клетки, такие как мезенхимальные стволовые клетки (МСК) человека из костного мозга, жировой ткани, пульпы зуба и др., представляют собой перспективный инструмент для клеточной терапии и регенеративной медицины [443–446]. Уникальные иммуномодулирующие свойства и ангиогенная активность наряду с мультипотентностью, самообновлением и пластичностью позволяет использовать МСК для лечения воспалительных [447,448], нейродегенеративных [449,450] и аутоиммунных заболеваний [446]. Тем не менее, концентрация выделенных МСК от одного донора недостаточна для биомедицинских применений. Сообщается, что не менее 10^7 клеток/пациента необходимо для успешной трансплантации и приживления [451]. Вынужденная длительная экспансия МСК в условиях *ex vivo* приводит к функциональным изменениям этих клеток и, в частности, старению.

Стареющие МСК могут быть охарактеризованы как клетки в состоянии длительной и, как правило, необратимой остановки клеточного цикла. Такое физиологическое состояние также связано с макромолекулярными модификациями [452], секреторным фенотипом стареющих клеток (SASP) [453] и дерегулированным метаболизмом клеток [454,455]. На основе путей индукции и задействованных механизмов клеточное старение в основном подразделяется на три типа. Во-первых, статус МСК может зависеть от возраста донора [456,457] и/или возникать в результате достижения клетками предела Хейфлика, согласно теории которого лимит деления клеток ограничен размером теломер [458]. Кроме того, старение клеток может быть индуцировано различными стрессовыми факторами, в том числе оксидативным стрессом [459], тепловым шоком [460,461] или в результате активации онкогенов [462] и др. [463], которые инициируют повреждение ДНК, активные формы кислорода (АФК), усиление воспалительных реакций. В целом, клеточное старение является необходимым этапом в развитии популяции клеток, поскольку позволяет предотвратить размножение клеток с поврежденным геномом. Тем не менее, активно исследуются стратегии длительного сохранения пролиферативного потенциала МСК в условиях *in vitro* для повышения их

терапевтической эффективности [464,465].

Разработка клеточной модели старения необходима не только для исследования методов сохранения нативных свойств МСК, но также является ключевой составляющей при оценке эффективности геропротективных соединений в модели *in vitro*. Поскольку преждевременное старение *in vitro* связывают в первую очередь с окислительным стрессом, приводящим к повреждению ДНК [466,467], одной из стратегий для его моделирования является обработка клеток с помощью пероксида водорода H_2O_2 , который является характерным эндогенным источником клеточного окислительного стресса [468]. При этом, исследование функциональных изменений в МСК, связанных с H_2O_2 -индуцированным старением, является ключевым этапом в получении модели стареющих клеток и может быть использовано для последующей оценки эффективности геропротекторных соединений или стратегий прекондиционирования.

Целью этапа работы по п.1.16 ПГ и в соответствии с п.3.16 ТЗ являлась разработка протокола получения *in vitro* модели старения мезенхимальных стволовых клеток (МСК) человека.

16.1. Материалы и методы.

Согласно требованиям п.5.15 ТЗ работы, описанные в подразделах 16.1.1 и 16.1.2 выполнялись с использованием мезенхимальных стволовых клеток человека (МСК) в стерильных условиях клеточного бокса.

16.1.1. Культивирование МСК.

В работе использовали пулированные от 3-х доноров МСК, полученные из жировой ткани человека, которые были приобретены в УНУ «Коллекция клеточных культур» ЦКП ИБР РАН. МСК культивировали в среде α -MEM (ПанЭко, РФ) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (FBS), GlutaMAX™ и 1% пенициллина/стрептомицина (все Gibco, США) при 37°C и 5% CO_2 до достижения 70-80% конфлюэнта. После этого клетки обрабатывали 0,25% раствором трипсина (ПанЭко, РФ) для их открепления от дна культурального планшета и высевали при плотности $5-7 \times 10^3$ клеток/см² в культуральный флакон для культивирования тканей “T-75” (Corning, США). Для работы использовались клетки не старше 5 пассажа.

16.1.2. Дифференцировка МСК.

Для дифференцировки МСК в остеобласты использовали полную культуральную среду α -MEM (ПанЭко, РФ) с добавлением остеогенных индукторов (Таблица 16.1). Для дифференцировки в адипоциты в среду для культивирования были добавлены индукторы адипогенеза (таблица 16.1). Среда обновлялась каждые 72 ч.

Таблица 16.1 – Индукторы остеогенной и адипогенной дифференцировки МСК и их концентрация в среде (все от Sigma–Aldrich, США)

Среда	Компонент	Концентрация
Остеогенная среда	дексаметазон	100 нМ
	β -глицеролфосфат	10 мМ
	аскорбат-2-фосфат	0,05 мМ
Адипогенная среда	инсулин	1 мкг/мл
	3-изобутил-1-метилксантин	0,5 мМ
	дексаметазон	0,5 мкМ

Для подтверждения остеогенного и адипогенного потенциалов МСК клетки в индуцированном состоянии окрашивали с помощью Ализаринового красного и Масляного красного О (все от Sigma-Aldrich, США) на 14-й день культивирования. Ализариновый красный использовался для выявления отложений кальция, характерных для остеоцитов. В то время как Масляный красный О использовался для определения липидов в цитозоле адипоцитов.

16.1.3. Исследование иммунофенотипа МСК методом проточной цитофлуориметрии.

МСК были верифицированы на CD105- (Cloud-Clone Corp., Китай), CD90- (Abcam, Великобритания) и CD73-положительное окрашивание с использованием антител (Cloud-Clone Corp., Китай) и отрицательное окрашивание на CD45 (Abcam, Великобритания), CD34 (Abcam, Великобритания) и HLA-DR (Thermo Fisher Scientific, США). Для этого осадки МСК (около 5×10^5 клеток) суспендировали в фосфатно-солевом буфере (PBS) (ПанЭко, Россия) и инкубировали с соответствующими моноклональными антителами и антителами изотипического контроля (Bio-Rad, США). После инкубации образцы промывали PBS (ПанЭко, Россия) и осаждали центрифугированием ($300 \times g$, 5 минут). Затем клетки

ресуспендировали в PBS (ПанЭко, Россия) и анализировали с помощью проточного цитофлуориметра ZE5 (Bio-Rad, США) и программного обеспечения Floreada.io (<https://floreada.io/analysis>, дата доступа 12.08.2024 г.).

16.1.4. Протокол индукции клеточного старения.

Для индукции клеточного старения в МСК использовали обработку клеток с помощью H_2O_2 (Merck, Германия). Для оценки цитотоксичности H_2O_2 и выбора сублетальной концентрации количество жизнеспособных МСК исследовали с использованием МТТ-теста. Для этого, клетки высевали в лунки 96-луночного планшета в концентрации 5×10^3 клеток/см² (Corning, США) и через 48 ч обрабатывали различными концентрациями H_2O_2 в диапазоне от 50 до 800 мкМ. Для исследования влияния прекондиционирования за 24 ч до внесения H_2O_2 к МСК дополнительно вносили различные разведения $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma–Aldrich, США) так, чтобы конечная концентрация вещества в лунках составляла от 0 до 1000 мкМ.

Через 24 ч после обработки H_2O_2 в среду культивирования добавляли 100 мкл раствора МТТ (1 мг/мл, ПанЭко, Россия) и инкубировали в течение 2 ч. Осадки кристаллов формазана растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО, Servicebio, Китай) (100 мкл/лунка). Поглощение раствора формазана измеряли при 570 нм с помощью микропланшетного ридера iMark (Bio-Rad, США). При подсчете живых клеток полученные значения оптической плотности (ОП) поглощения нормировали на значения ОП для контрольных образцов (МСК в полной культуральной среде без обработки) и выражали в %.

На основании результатов МТТ-теста были выбраны рабочие концентрации H_2O_2 и CoCl_2 при использовании которых количество жизнеспособных МСК было выше 75% от контроля (100%).

16.1.5. Исследование морфологии и аутофлуоресценции стареющих МСК.

Для оценки морфологических изменений в МСК проводили анализ популяций интактных клеток раннего пассажа (p<3-го пассажа, контроль, МСК РП), клеток раннего пассажа, прекондиционированных с CoCl_2 (гипМСК) и обработанных H_2O_2 (гипМСК+), обработанных H_2O_2 (МСК+) и позднего пассажа (p>10, МСК ПП) с помощью проточной цитометрии.

Для этого, клетки высевали в 6-луночные планшеты в количестве 5×10^3

клеток/см² и через 24 ч заменяли среду на новую или новую, содержащую 500 мкМ CoCl₂. После инкубации в течение 24 ч в соответствующие лунки вносили еще 400 мкМ H₂O₂ или свежей культуральной среды, соответственно. Клетки инкубировали в течение 24 ч при 37°C и 5% CO₂, после чего, обрабатывали 0,25% раствором трипсина (ПанЭко, РФ) для их открепления от дна культурального планшета, промывали дважды PBS (ПанЭко, РФ) при 300g в течение 5 минут и фиксировали в растворе формалина (4% в PBS (ПанЭко, РФ)). После, промывали в PBS (300g, 5 минут), ресуспендировали в 300 мкл PBS (ПанЭко, РФ) и анализировали параметры прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния популяции с помощью проточного цитофлуориметра ZE5 (Bio-Rad, США) и программного обеспечения Floreada.io (<https://floreada.io/analysis>, дата доступа 10.09.2024 г.).

Флуоресценцию в лунках детектировали с помощью системы визуализации ZOE (Bio-Rad, США). Определение средней интенсивности аутофлуоресценции МСК проводили в результате анализа полученных микрофотографий и рассчитывали с использованием программного обеспечения ImageJ. Подсчет флуоресцирующих клеток производили с использованием не менее 50 клеток в трех независимых полях зрения каждого изображения и нормировали на контроль (0%).

16.1.6. Оценка уровня активности β -галактозидазы.

Для оценки уровня активности, ассоциированной со старением β -галактозидазы (SA- β -gal, от англ. Senescence associated β -galactosidase), проводили цитохимическое окрашивание с помощью Aging Cell β -galactosidase Staining Kit (Servicebio, Китай), согласно рекомендациям производителя. Данный метод основан на гидролизе субстрата X-gal (5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактопиранозид) SA- β -gal при pH = 6.0 до детектируемого синего производного – 5,5'-дибром-4,4'-дихлор-индиго.

Так, МСК высевали в 6-луночный планшет с плотностью 5×10^3 клеток/см². Затем, для исследования влияния гипоксического прекондиционирования и стресс-индуцированного старения на активность β -галактозидазы, к МСК РП через 24 ч добавляли CoCl₂ в концентрации 500 мкМ (гипМСК), а затем через следующие 24 ч - H₂O₂ в концентрации 400 мкМ (МСК+ и гипМСК+), соответственно. Через 24 ч инкубации с индукторами или свежей культуральной средой без добавления CoCl₂ и H₂O₂ (МСК РП, МСК ПП), клетки фиксировали с помощью β -galactosidase Staining

Fixation. Далее, МСК инкубировали с β -galactosidase Staining Working Solution в течение 16 часов при 37°C для выявления активности SA- β -gal.

Результаты окрашивания МСК РП, гипМСК, МСК ПП, МСК+ и гипМСК+ исследовали с использованием инвертированного микроскопа (Carl Zeiss, Германия). Определение клеток с SA- β -gal (SA- β -gal+ клетки) производили с использованием не менее 150 клеток в трех независимых полях зрения каждого изображения. Количество клеток с SA- β -gal активностью выражали как процент клеток с детектируемой синей окраской от общего количества клеток.

16.1.7. Исследование уровня АФК в стареющих МСК (иммунофлуоресцентное окрашивание).

Образование внутриклеточных АФК в МСК оценивали с помощью флуоресцентного красителя хлорметилпроизводного 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетата (CM-H₂DCFDA, Invitrogen, США), согласно инструкции производителя. В присутствии АФК субстрат CM-H₂DCFDA подвергается окислению с образованием флуоресцентного соединения дихлорфлуоресцеина (DCF). Ядра клеток дополнительно окрашивали с помощью Hoechst-33342 (Thermo Fisher Scientific, США) для нормирования DCF-положительных клеток на общее количество клеток.

Так, МСК РП и МСК ПП высаживали в лунки 6-луночного планшета в количестве 5×10^3 клеток/см². Через 24 ч МСК РП обрабатывали 500 мкМ CoCl₂ с целью активации необходимых для нейтрализации АФК сигнальных путей в течение 24 ч (гипМСК). Через 24 ч в соответствующие лунки вносили 400 мкМ H₂O₂ и инкубировали в течение 2 ч. В лунках с контрольными клетками (МСК РП и МСК ПП) обновляли среду на новую и также инкубировали в течение 2 ч. После чего, к клеткам вносили субстрат CM-H₂DCFDA и Hoechst для инкубации в течение 0,5 ч. Флуоресценцию в лунках детектировали с помощью системы визуализации ZOE (Bio-Rad, США). Определение средней интенсивности флуоресценции рассчитывали с использованием программного обеспечения ImageJ. Подсчет флуоресцирующих клеток производили с использованием не менее 50 клеток в трех независимых полях зрения каждого изображения. Количество внутриклеточных АФК (ROS level, %) выражали как процент окрашенных DCF клеток от общего количества клеток (окрашенных Hoechst-332).

16.1.8. Оценка прогрессии клеточного цикла (ПЦР-РВ).

Для оценки прогрессии клеточного цикла МСК исследовали экспрессию характерных маркёров с помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). РНК из клеток МСК РП, МСК+, гипМСК, гипМСК+ и МСК ПП выделяли с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрацию и чистоту РНК определяли с помощью спектрофотометра Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, США).

Обратную транскрипцию проводили с использованием набора MMLV RT (Evrogen, Россия). ПЦР-РВ проводили с использованием набора qPCRMix-HS SYBR+Low RES (Evrogen, Россия) в приборе CFX96 real-time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США). Последовательности праймеров приведены в Таблице 2. Данные были проанализированы с использованием эффективного метода $\Delta\Delta C_t$ и генов *ACTB* и/или *GAPDH* в качестве генов домашнего хозяйства. В работе оценивали относительную экспрессию следующих генов: *TP53* (p53), *CDKN1A* (p21) и *CDKN2A* (p16) (таблица 16.2).

Исходные данные были проанализированы с помощью программного обеспечения CFX Maestro 1.0 (версия 4.0.0325.0418).

Таблица 16.2 – Последовательности праймеров генов

Ген	Прямая последовательность	Обратная последовательность
<i>ACTB</i>	TCAGAAGGATTCSTATGTGGGCGA	CACGCAGCTCATTGTAGAAGGTGT
<i>GAPDH</i>	TCGACAGTCAGCCGCATCTTCTTT	ACCAAATCCGTTGACTCCGACCTT
<i>TP53</i>	CTCACCATCATCACACTGGAA	CCAGGACAGGCACAAACA
<i>CDKN1A</i>	GGCAGACCAGCATGACA	GAGACTAAGGCAGAAGATGTAGAG
<i>CDKN2A</i>	GGTCGGGTAGAGGAGGT	CCCATCATCATGACCTGGAT

16.1.9. Исследование количества колониеобразующих единиц (КОЕ).

Для оценки КОЕ МСК рассаживали в лунки в 12-луночного планшета в количестве 5×10^3 клеток на лунку. Через 24 ч после прикрепления соответствующие лунки обрабатывали CoCl_2 (500 мкМ), H_2O_2 (400 мкМ) или 500 мкМ CoCl_2 и через 24 ч - 400 мкМ H_2O_2 . После 14 дней культивирования в стандартных условиях клетки промывали PBS и фиксировали в растворе 4% формалина в PBS (20 мин). Колонии

клеток окрашивали с помощью 0.1% раствора кристаллического фиолетового (ПанЭко, Россия)) в 4% формалине в течение 15 мин и аккуратно промывали лунки дистиллированной водой. После просушивания в лунки вносили 500 мкл раствора уксусной кислоты в дистиллированной воде (10% v/v) для растворения кристаллов при легком перемешивании в течении 15 мин. Оптическую плотность раствора измеряли при 595 нм с помощью микропланшетного ридера iMark (Bio-Rad, США).

16.1.10. Исследование профиля секретируемых стареющими клетками молекул с помощью иммуноферментного анализа (ИФА).

Кондиционную среду, полученную от МСК РП, гипМСК, гипМСК+, МСК+ и МСК ПП анализировали с использованием наборов для ИФА на интерлейкин-1 бета (IL-1 β) и моноцитарный хемотаксический белок 1 (MCP-1) (все от "Вектор-Бест", РФ) в соответствии с рекомендациями производителя. Оптическую плотность измеряли при 450 нм с помощью считывателя поглощения на микропланшетах iMark (Bio-Rad, США).

16.1.11. Исследование влияния гипоксического прекондиционирования МСК на терапевтические эффекты в отношении клеточной модели болезни Альцгеймера.

Клеточная модель болезни Альцгеймера представляла собой исследование поляризации модельных макрофагов в про- или противовоспалительный фенотип (M1 и M2, соответственно) под действием кондиционной среды от МСК (КС). Клетки острого моноцитарного лейкоза человека THP-1 (Центр коллективного пользования "Коллекция культур клеток позвоночных", РФ) культивировали в среде RPMI-1640 (ПанЭко, РФ) с добавлением 10% FBS, GlutaMAX™ и 1% пенициллина/стрептомицина (все от Gibco, США) при 37°C и 5% CO₂. Клетки пассировали каждые три дня из расчета 5×10⁵ клеток/мл в культуральном флаконе для культивирования тканей "Т-25" (Corning, США).

Клетки линии THP-1 дифференцировали в макрофаги M0 с помощью 10 нг/мл форбол-12-миристан-13-ацетата (PMA) (Sigma-Aldrich, США) в течение 24 ч. Подтверждение дифференцировки проводили путем оценки морфологии клеток с использованием инвертированного микроскопа (Carl Zeiss, Германия).

Для получения КС от МСК, клетки высевали с плотностью 5-7×10³ клеток/см² и через 24 ч после прикрепления, среду в соответствующих лунках либо заменяли

на новую полную культуральную среду, либо содержащую миметик гипоксии $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma–Aldrich, США) в концентрации 100 мкМ. Индукцию гипоксии проводили в течение 3 ч. После чего, интактные МСК, а также гипоксически прекондиционированные МСК трижды промывали PBS (ПанЭко, РФ) и инкубировали в культуральной среде RPMI-1640 (ПанЭко, РФ) без FBS в течение в течение 24 ч для сбора кондиционной среды. Кондиционные среды от интактных МСК (кКС) и гипоксически прекондиционированных МСК (гипКС) концентрировали с использованием фильтров Amicon Ultra-15 MWCO с размером пор 3 кДа (Millipore, Merck KGaA, Германия) при $4000 \times g$ в течение 45 мин. После концентрирования аликвоты сред хранили при -86°C . В результате измерения концентрации белка с использованием анализа бицинхониновой кислотой (BCA-assay, Elabscience, Китай), согласно инструкции производителя, было подтверждено 10-кратное концентрирование белка в КС.

Для исследования М1-подобных клеток М0 макрофаги обрабатывали с помощью липополисахарида (LPS, Thermo Fisher Scientific, США) в концентрации 1 мкг/мл в течение 72 ч. Иммуномодулирующий потенциал КС оценивали путем внесения КС от МСК к макрофагам М0 одновременно с LPS. Для дифференцировки М0 макрофагов в М2 использовали КС от МСК. Кондиционные среды добавляли к М0 клеткам в процентном соотношении 50/50 об./об. Клетки М0, М1 и М2 фенотипа и кондиционную среду собирали через 72 ч после их обработки КС для ПЦР-РВ и ИФА, соответственно.

Последовательности праймеров генов для TNF-1 для проведения ПЦР-РВ указана в таблице 16.3. Подготовку образцов и ПЦР-РВ выполняли согласно методике, изложенной в разделе 16.1.8.

Таблица 16.3 – Последовательности праймеров генов для THP-1

Ген	Прямая последовательность	Обратная последовательность
<i>MRC1</i>	GCAAAGTGGATTACGTGTCTTG	CTGTTATGTCGCTGGCAAATG
<i>IL-10</i>	TCAGGCTGAGGCTACGG	AGATGTCAAACCTCACTCATGGC
<i>TGFB1</i>	CGTGGAGCTGTACCAGAAATAC	CACAACCTCCGGTGACATCAA

Кондиционную среду исследовали с использованием наборов для ИФА на интерлейкин-1 бета, интерлейкин-4, интерлейкина-6, альфа-ФНО и VEGF (все от "Вектор-Бест", РФ) в соответствии с рекомендациями производителя. Оптическую плотность измеряли при 450 нм с помощью считывателя поглощения на микропланшетах iMark (Bio-Rad, США).

16.1.12. Статистический анализ.

Данные представлены для трех повторных выборок и экспериментов, если не указано иное. Полученные результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM). Различия между экспериментальными группами были оценены с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) при помощи теста Тьюки и/или двухфакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA) с использованием теста множественных сравнений Сидака. Различия считались статистически значимыми при значении $p < 0,05$. Для статистического анализа и построения графиков использовался GraphPad Prism версии 10.1.1.

16.2. Результаты и обсуждение.

16.2.1. Характеристика МСК.

Для подтверждения стволовости, проводили исследование фенотипических характеристик МСК. Клетки представляли собой адгезионную культуру с характерной фибробластоподобной (веретенообразной) морфологией. При культивировании клеток в среде, содержащей индукторы остеогенной дифференцировки, фиксировали наличие отложений кальция с помощью окрашивания Ализариновым красным (рисунок 16.1 (А)). Окрашивание накоплений нейтральных липидов с помощью красителя Масляного красного подтвердило возможность дифференцировки клеток в адипогенном направлении (рисунок 16.1).

Методом проточной цитометрии был также исследован иммунофенотип МСК (рисунок 16.1 (Б)). Показано, что исследуемые клетки были негативны по маркерам CD34 и CD45, не экспрессировали антиген второго класса гистосовместимости (HLA-DR), слабоположительны по маркеру CD73 и положительны по маркерам CD105 и CD90.

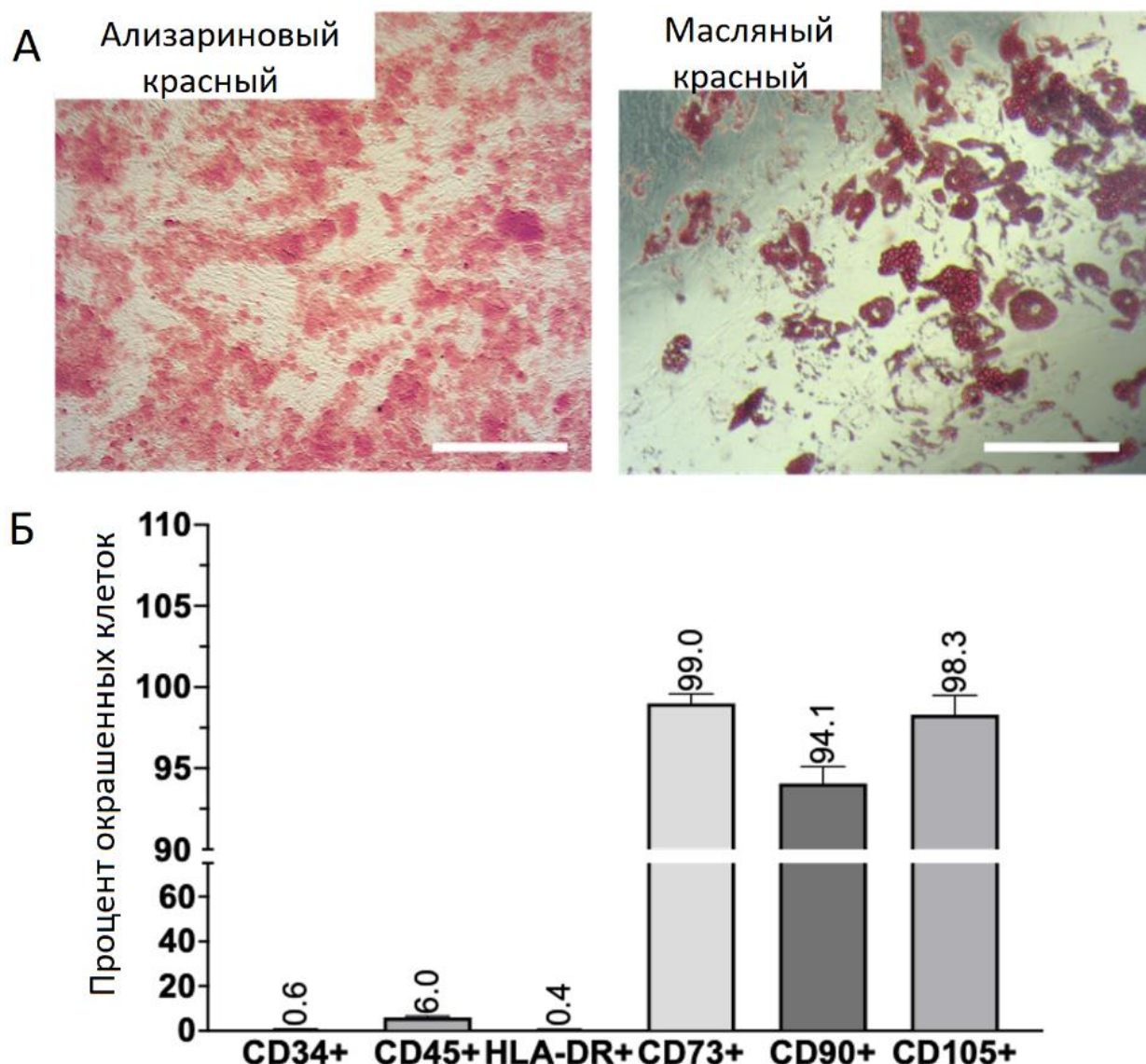


Рисунок 16.1 - Исследование фенотипа и экспрессии иммуносупрессивных молекул в МСК, полученных из жировой ткани человека. (А) Мультипотентность клеток подтверждена результатами цитохимических окрашиваний отложений кальция (Ализариновый красный) и накопления липидов (Масляный красный) после индукции остеогенеза и адипогенеза, соответственно. Шкала 100 мкм. (Б) Иммунофенотипические характеристики МСК исследованы методом проточной цитофлуориметрии. Показана отрицательная экспрессия маркеров CD34, CD45 и HLA-DR и положительная экспрессия маркеров CD73, CD90 и CD105. Погрешность указана как SEM. $**p < 0,01$ и $***p < 0,001$

Таким образом, клетки соответствовали фенотипу МСК, установленному Международным обществом клеточной и генной терапии (ISCT) [469] и могли быть использованы для дальнейших исследований в качестве модели стареющих МСК.

16.2.2. Моделирование стресс-индуцированного старения МСК в условиях *in vitro*.

Исследования репликативного старения клеток внесли большой вклад в понимание механизма старения, связанного с теломерами, в то время как анализ стресс-индуцированного старения часто используется для изучения влияния окислительного стресса на этот процесс. Согласно п. 4.16 ТЗ должны быть подобраны условия получения *in vitro* модели старения МСК человека. До сих пор для индукции стресс-индуцированного старения в модели *in vitro* использовались различные индукторы, которые могут вызывать окислительный стресс в клетках. К ним относятся H_2O_2 , ультрафиолетовый свет, этанол и др. [468,470]. Пероксид водорода – один из наиболее часто используемых индукторов старения клеток, в том числе потому, что он считается классическим естественным индуктором окислительного стресса [471]. Поэтому на данном этапе работы использовали H_2O_2 для обработки МСК РП с целью получения модели клеточного старения *in vitro*, а именно, оптимизировали протокол обработки (доза и время воздействия) таким образом, чтобы обеспечить субтоксическое воздействие.

Как упоминалось ранее, преждевременное старение *in vitro* связывают в первую очередь с окислительным стрессом, приводящим к повреждению ДНК [466,467]. Культивирование в условиях низкого содержания кислорода (1 - 7% O_2) может оказаться перспективной стратегией как для снижения уровней АФК [472,473], так и для моделирования микроокружения ниши стволовых клеток [474,475]. Однако, противоречивые результаты оценки влияния гипоксии на регуляцию клеточного старения вероятно связаны с условиями проведения экспериментов. В частности, различия в гипоксической концентрации кислорода (от 0,2 % до 1 % или 5 % [476], [477], [478]), временем инкубации и используемом оборудовании затрудняют обобщение полученных экспериментальных данных. Гипоксические камеры имеют ряд ограничений, поэтому использование миметиков гипоксии кажется перспективной альтернативой, поскольку исключает влияние нестабильности уровня кислорода в камерах, а также благодаря низкой стоимости и возможности легко оптимизировать протокол обработки клеток [479,480].

Ключевой молекулой в реализации эффектов гипоксии является транскрипционный фактор, индуцируемый гипоксией 1 (HIF-1). Пути HIF пересекаются с путями сиртуинов, AMPK и mTORC1-ULK1, которые участвуют в механизмах, регулирующих воспаление, митохондриальный биогенез, клеточное старение и старение организма [481]. Миметики гипоксии, среди которых дефероксамин (ДФО), диметилноксалоилглицин (ДМОГ), 2,4-динитрофенол (ДНФ) и хлорид кобальта (CoCl_2), а также специальные биоматериалы могут быть использованы для индукции или стабилизации HIF-1 α [482–484]. В результате обработки миметиком гипоксии в МСК запускается каскад реакций как при физиологической гипоксии, но функциональные эффекты могут отличаться [485]. Например, фармацевтические/химические средства-миметики гипоксии сильнее усиливали экспрессию хемокиновых рецепторов и VEGF, чем гипоксия [484,486], а также оказывали эффект на жизнеспособность и метаболизм клеток в зависимости от протокола обработки клеток [487,488]. Тем не менее, влияние миметиков на старение МСК мало изучено. Показано, что ДФО может задерживать индуцированное H_2O_2 прогрессирование старения стволовых клеток эндометрия человека [489] и защищает от апоптоза МСК-КМ [490]. Однако, нет опубликованных данных об исследованиях влияния на старение МСК предобработки с помощью других миметиков гипоксии в модели *in vitro*, в том числе хлорида кобальта. Важно отметить, что механизм действия ДФО и CoCl_2 на клетки, с одной стороны, отличается. В частности, CoCl_2 искусственно индуцирует гипоксию и может блокировать деградацию α - белка HIF-1, вызывая тем самым его накопление [491], в отличие от ДФО, который стабилизирует HIF-1 α при нормоксии [492]. С другой стороны, Co^{2+} может выступать в качестве конкурента железа, и подобно хелатору железа – ДФО, оба широко используются для снижения количества свободного Fe^{2+} , необходимого также для катализа гидроксирования HIF [482].

Таким образом, еще одной задачей данного этапа работы была оценка влияния прекондиционирования МСК из жировой ткани человека на индуцированное старение.

Согласно результатам МТТ-теста обработка МСК с помощью H_2O_2 приводила к дозозависимому снижению жизнеспособности клеток (рисунок 16.2). В частности, при инкубации с 300 мкМ H_2O_2 количество жизнеспособных МСК относительно

контроля (интактные клетки) составляло $91 \pm 8 \%$, воздействие 400 мкМ приводило к $62 \pm 16 \%$, а максимальной концентрации 600 мкМ – к $35 \pm 14 \%$.

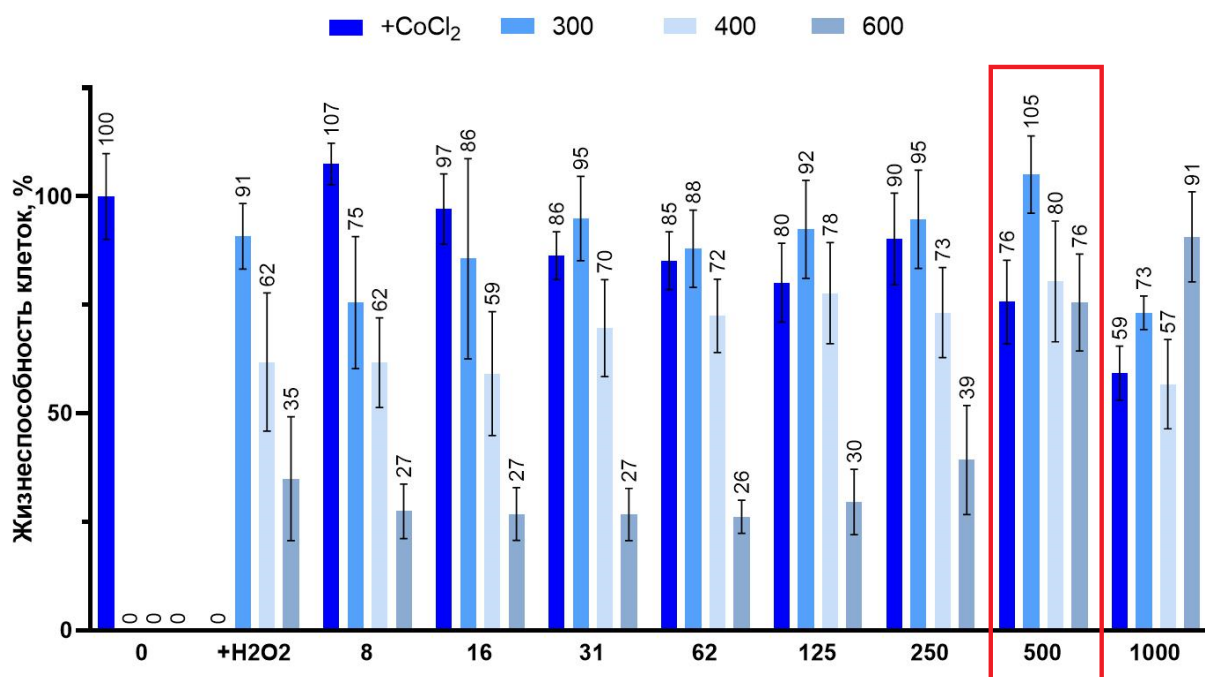


Рисунок 16.2 – Исследование влияния прекондиционирования МСК с CoCl_2 (24 ч) в различных концентрациях (8 – 1000 мкМ) на H_2O_2 -индуцированную цитотоксичность. Результаты МТТ-теста. Контроль – 100 % соответствует МСК без обработки. Концентрации H_2O_2 : 300, 400 и 600 мкМ, соответственно. Погрешность указана как SEM

Преко́нди́ционирование МСК с CoCl_2 в различных концентрациях (8 – 1000 мкМ) способствовало снижению H_2O_2 -индуцированной цитотоксичности. Важно отметить, что значительные эффекты от предобработки МСК отмечались при высоких концентрациях (выше 500 мкМ CoCl_2), однако, использование 1000 мкМ миметика гипоксии также приводило к цитотоксическим реакциям. Тем не менее, праймирование МСК с помощью 500 мкМ CoCl_2 в течение 24 ч приводило к $76 \pm 9 \%$ жизнеспособных клеток, в то время как, последующее воздействие 300, 400 или 600 мкМ H_2O_2 было менее токсичным для МСК ($105 \pm 9 \%$, 80 ± 14 и $76 \pm 11 \%$, соответственно), по сравнению с клетками без предобработки.

В результате, на данном этапе работы были определены концентрации и время воздействия веществ, как CoCl_2 , так и H_2O_2 , на МСК с целью последующей оценки их влияния на ключевые параметры стареющих клеток. В частности, для получения модели стресс-индуцированных стареющих МСК применяли обработку клеток 400 мкМ H_2O_2 в течение 24 ч, а для оценки влияния миметика гипоксии на стресс-

индуцированное старение – предварительно обрабатывали МСК с помощью 500 мкМ CoCl_2 в течение 24 ч.

16.2.3. Исследование морфологии и аутофлуоресценции стареющих МСК.

На данном этапе работы в соответствии с п 4.16 ТЗ проведено доказательство работоспособности выбранного метода получения *in vitro* модели старения МСК человека, а именно проводили исследование морфологии клеток после индукции старения с помощью H_2O_2 , а также оценивали влияние гипоксической предобработки МСК на этот параметр.

Известно, что при старении клетки претерпевают ряд морфологических изменений [493], в частности, МСК уплощаются, становятся более вытянутыми и характеризуются как клетки с зернистой цитоплазмой и большим количеством ножек и актиновых стрессовых волокон [494].

Также клетки в результате H_2O_2 -индуцированного старения изменяли свою морфологию и уровень флуоресценции (рисунок 16.3 (А), (Б)) по сравнению с интактными МСК РП. Для количественной оценки этих изменений мы исследовали клетки МСК РП, а также гипМСК, МСК+, гипМСК+ и МСК ПП с помощью проточной цитометрии. Анализ диаграмм распределения прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния этих популяций подтвердил смещение медиан интенсивности флуоресценции в клетках МСК+ на уровне тенденции (рисунок 16.3 (В)).

Кроме того, согласно результатам проточной цитометрии (рисунок 16.3 (В)), МСК позднего пассажа также имели тенденцию к увеличенному размеру. Важно отметить, что гипоксическое прекондиционирование с использованием CoCl_2 , в отличие от результатов по оценке жизнеспособности клеток (см. раздел 16.2.2.), не влияло на статус клеток после H_2O_2 обработки и МСК сохраняли размеры сопоставимые с клетками без предобработки.

Таким образом, на данном этапе было подтверждено изменение размеров и общего уровня флуоресценции МСК как при репликативном, так и при H_2O_2 -индуцированном старении. Следует отметить, что гипоксическое прекондиционирование МСК с помощью CoCl_2 не влияло на этот маркёр стареющих клеток.

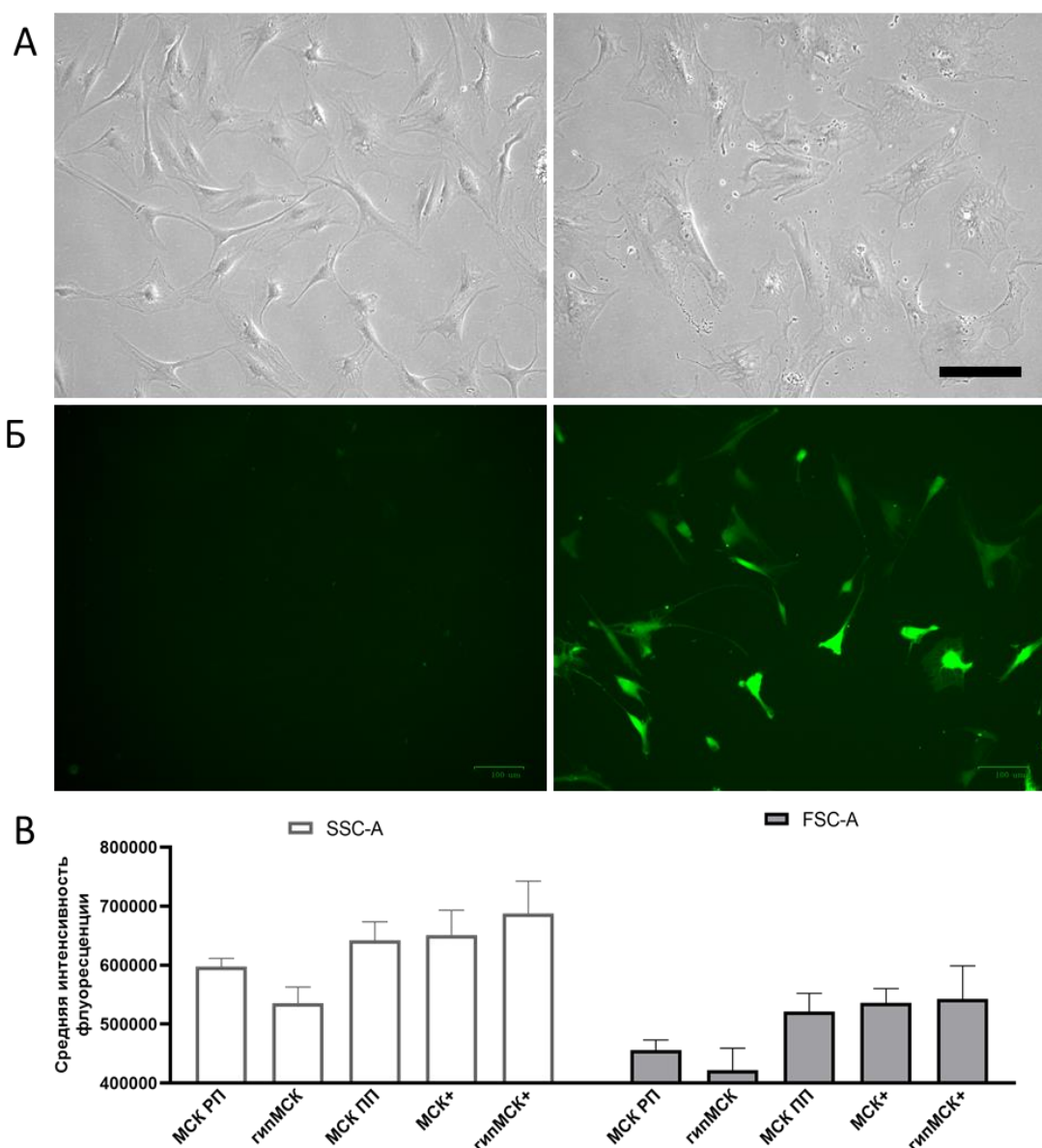


Рисунок 16.3 – Исследование морфологических особенностей стареющих МСК. Микрофотографии (А) и интенсивность флуоресценции (Б) МСК раннего пассажа, $p < 3$ (слева), и позднего пассажа, $p > 10$ (справа). Шкалы 50 и 100 мкм. Анализ диаграмм распределения прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния клеток раннего пассажа (МСК РП), обработанных миметиком гипоксии (гипМСК), позднего пассажа (МСК ПП), стареющих в результате H_2O_2 обработки без (МСК+) и с гипоксическим прекондиционированием (гипМСК+). Погрешность указана как SEM (Б)

16.2.4. Оценка уровня активности β -галактозидазы.

Одним из ключевых маркёров для определения сенесцентных клеток, как *in vitro*, так и *in vivo*, является активность ассоциированной со старением β -галактозидазы [493,495]. β -галактозидаза представляет собой лизосомальную гидролазу, которая имеет оптимальный $pH = 4.0-4.5$ во всех клетках, независимо от

их репликативного статуса [496,497]. При этом, сенесцентные клетки характеризуются повышенным лизосомальным биогенезом, что приводит к накоплению высокого количества лизосом, а следовательно, и лизосомальных ферментов в клетке, что справедливо и для стареющих МСК. Кроме того, старение клеток связано с изменением кислотности лизосом, повышенным уровнем их повреждения и изменением цитозольного pH. Данные явления, ассоциированные со старением клеток, предположительно, обуславливают повышенную активность β -галактозидазы при субоптимальном значении pH = 6.0. Таким образом, в настоящее время данный фермент с максимальной активностью при смещенном pH определяется как β -галактозидаза, ассоциированная со старением [495,496,498,499].

На данном этапе работы, активность SA- β -gal в зависимости от статуса клеток была оценена с помощью цитохимического анализа, основанного на окрашивании хромогенного субстрата X-gal (5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактопиранозид) (рисунок 16.4). При действии SA- β -gal на X-gal, последний распадается на галактозу и 5-бром-4-хлор-3-гидроксииндол, который при спонтанной димеризации и окислении дает детектируемый синий продукт – 5,5'-дибром-4,4'-дихлор-индиго.

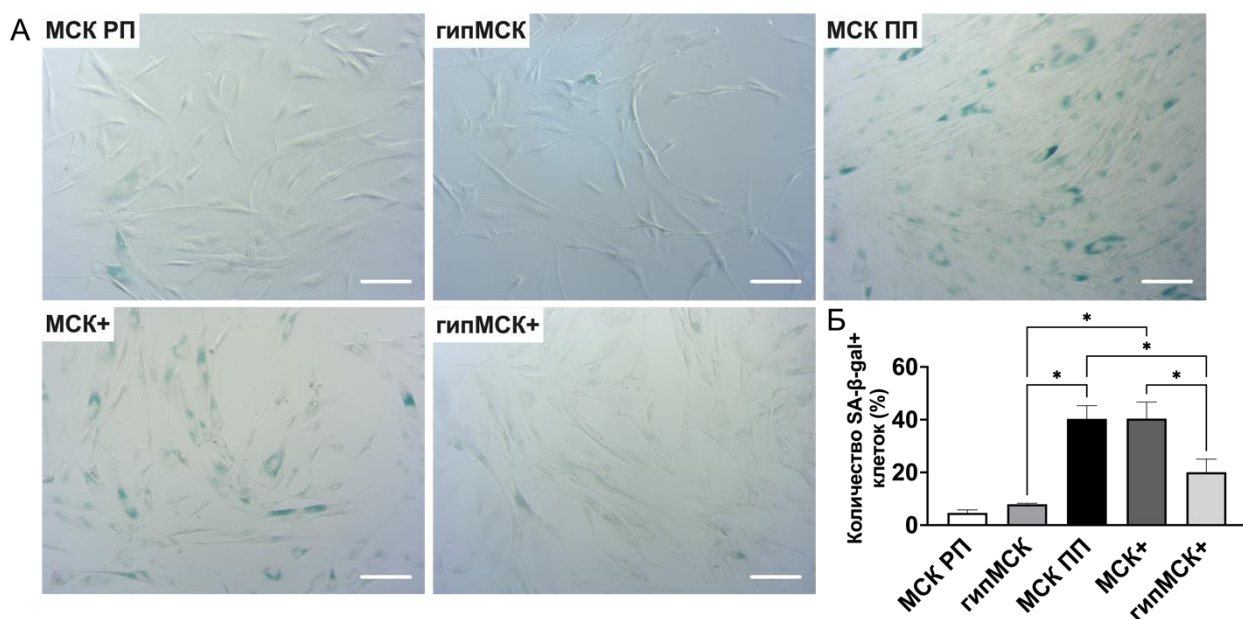


Рисунок 16.4 – Оценка уровня активности β -галактозидазы, ассоциированной со старением, в клетках МСК раннего пассажа (МСК РП, контроль), обработанных миметиком гипоксии CoCl_2 (гипМСК), позднего пассажа (МСК ПП), стареющих в результате H_2O_2 обработки без (МСК+) и с гипоксическим прекондиционированием (гипМСК+). А – микрофотографии окрашенных МСК. Шкала 30 мкм. Б – относительное количество позитивно окрашенных клеток МСК (% SA- β -gal+) в зависимости от активности фермента. Погрешность указана как SEM. * $p < 0,05$

Так, было показано, что наименьшим уровнем активности данного фермента обладали МСК РП, о чем свидетельствовало незначительное количество позитивно окрашенных клеток (SA- β -gal+) – $4,65 \pm 1,62$ %. В это же время, МСК ПП и МСК с H_2O_2 -индуцированным старением были охарактеризованы высокой активностью SA- β -gal и накоплением значительного количества 5,5'-дибром-4,4'-дихлор-индиго – $40,3 \pm 8,66$ % и $40,4 \pm 8,9$ % клеток с детектируемым синим производным, соответственно. Важно отметить, что предобработка МСК миметиком гипоксии не способствовала увеличению активности SA- β -gal ($7,95 \pm 2,6$ % SA- β -gal+ клеток), а также позволила снизить количество окрашенных клеток с $40,4 \pm 8,9$ % для МСК+ до $20,1 \pm 8,57$ % для гипМСК+, и следовательно, снизила активность фермента после добавления пероксида водорода к гипМСК.

Таким образом, было показано, что как при репликативном, так и при H_2O_2 -индуцированным старением, клетки характеризуются высоким уровнем активности SA- β -gal. При этом, предварительная обработка МСК миметиком гипоксии CoCl_2 позволяет предотвратить накопление SA- β -gal, и следовательно, сенесценцию клеток по данному параметру.

16.2.5. Исследование уровня АФК в стареющих МСК (иммунофлуоресцентное окрашивание).

Активные формы кислорода, побочный продукт метаболизма, имеют решающее значение для пролиферации и дифференцировки МСК при их накоплении в физиологическом количестве. Однако при патологических уровнях АФК возможна индукция клеточного старения, в том числе МСК. Чрезмерное накопление АФК не только является ключевым стимулом, запускающим «ответ на повреждение ДНК» (DDR, от англ. – DNA damage response), но и приводит к широкому спектру других пагубных реакций, включая нарушение работы митохондрий, подавление аутофагии, истощение теломер и деградацию белков, все из которых способствуют старению клеток [500].

Активные формы кислорода способствуют старению МСК, вызывая окисление и каскад вторичных метаболических патологических реакций. На данном этапе работы, исследовалось влияние пассажа на уровень АФК в МСК, а также эффект preconditionирования с миметиком гипоксии на H_2O_2 -индуцированное старение клеток (рисунок 16.5). Для оценки уровня АФК инкубировали клетки со специфичным субстратом CM- H_2DCFDA (6-хлорметил-2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат). Значения уровня флуоресценции МСК ПП, МСК+, гипМСК и гипМСК+ измеряли относительно уровня флуоресценции интактных клеток МСК РП (флуоресценцию которых принимали за 0%).

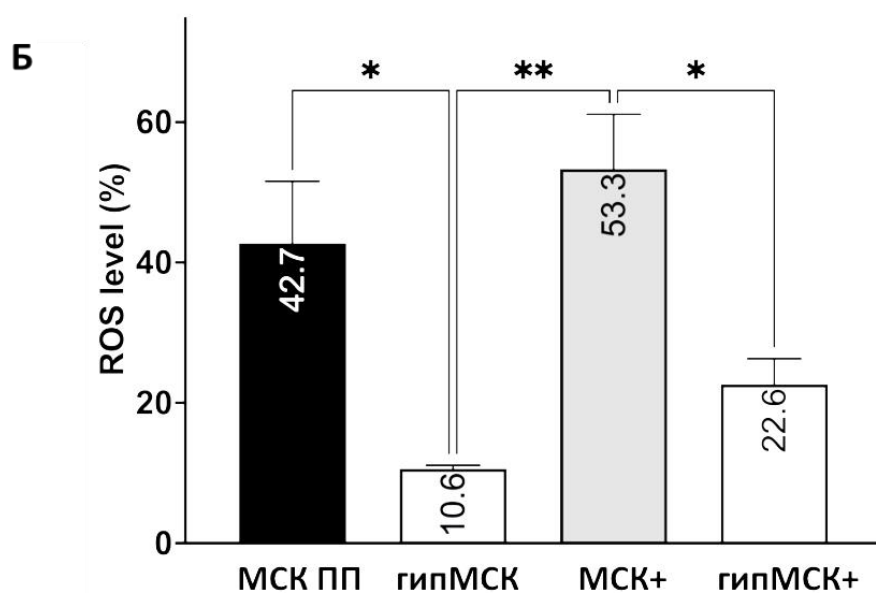
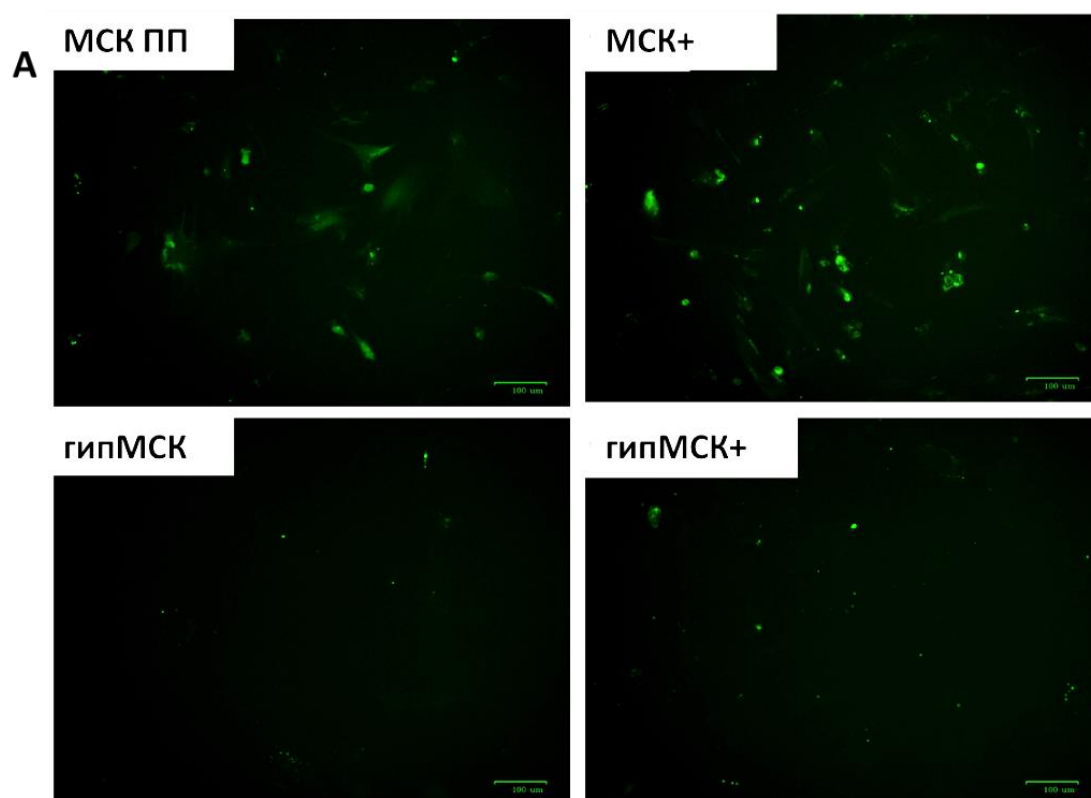


Рисунок 16.5 – Исследование уровня АФК в клетках МСК раннего пассажа (МСК РП, контроль), обработанных миметиком гипоксии CoCl_2 (гипМСК), позднего пассажа (МСК РП), стареющих в результате H_2O_2 обработки без (МСК+) и с гипоксическим прекондиционированием (гипМСК+). А – репрезентативные изображения окрашенных клеток. Шкала 100 мкм. Б – уровень производства АФК (% окрашенных DCF от всех клеток) МСК. Погрешность указана как SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

В результате было показано, что уровень АФК в МСК РП значительно возрастает до $42,7 \pm 19,7\%$. При этом, предварительная обработка МСК миметиком гипоксии снизила уровень АФК с $53,3 \pm 19\%$ для МСК+ до $22,6 \pm 8,9\%$. Важно

отметить, что preconditionирование МСК с помощью миметика гипоксии не приводило к существенному увеличению уровня АФК и составляло $10,6 \pm 0,8\%$.

Таким образом, было показано, что при старении в результате деления, так и при обработке МСК с помощью H_2O_2 существенно увеличивается количество внутриклеточных АФК, что, в свою очередь, дополнительно усиливает прогрессию старения клеток. При этом, предварительное гипоксическое preconditionирование позволяет снизить уровень АФК и, вероятно, замедлить этот процесс.

16.2.6. Оценка прогрессии клеточного цикла в стареющих МСК (ПЦР-РВ).

Состояние старения в первую очередь характеризуется длительной остановкой клеточного цикла. Активация ингибиторов циклинзависимой киназы (CDK) p16^{INK4A} и p21^{CIP1/WAF1}, кодируемых генами *CDKN1A* и *CDKN2A*, соответственно, необходима для блокировки прогрессии клеточного цикла. При клеточном старении было показано, что уровень экспрессии p16^{INK4A}, p53 и p21^{CIP1/WAF1} повышается как *in vitro*, так и *in vivo* [493].

На данном этапе работы мы оценивали уровень экспрессии в полученной модели клеточного старения МСК с использованием ПЦР в реальном времени (рисунок 16.6). В качестве маркёров были выбраны ключевые участники прогрессии клеточного цикла, а именно гены *CDKN1A*, *CDKN2A* и *TP53*.

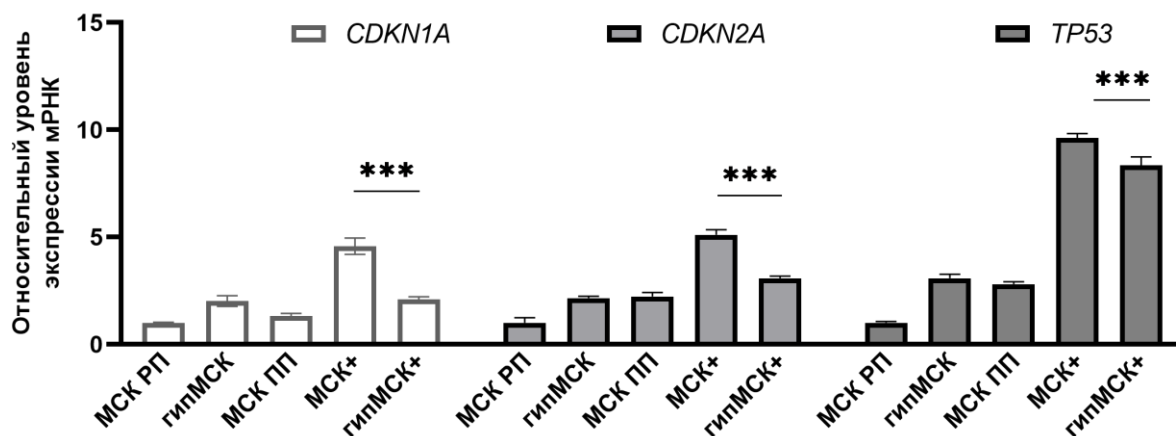


Рисунок 16.6 – Оценка прогрессии клеточного цикла в стареющих МСК. Относительный уровень экспрессии мРНК генов *CDKN1A*, *CDKN2A* и *TP53* в клетках МСК раннего пассажа (МСК РП, контроль), обработанных миметиком гипоксии $CoCl_2$ (гипМСК), позднего пассажа (МСК ПП), стареющих в результате H_2O_2 обработки без (МСК+) и с гипоксическим preconditionированием (гипМСК+). Погрешность указана как SEM. *** $p < 0,001$

Согласно результатам ПЦР-РВ уровень экспрессии *CDKN1A*, *CDKN2A* и *TP53* возрастал как при репликативном старении (изменения относительной экспрессии для МСК РП составляли: $1,33 \pm 0,11$, $2,24 \pm 0,19$ и $2,80 \pm 0,12$, соответственно), так и в случае H_2O_2 -индуцированного старения (изменения относительной экспрессии для МСК+ составляли: $4,58 \pm 0,38$, $5,21 \pm 0,23$ и $9,63 \pm 0,20$, соответственно). Важно отметить, что МСК, обработанные миметиком гипоксии, также обладали повышенным уровнем экспрессии этих маркёров (изменения относительной экспрессии для МСК+ составляли: $2,01 \pm 0,25$, $2,15 \pm 0,10$ и $3,09 \pm 0,18$, соответственно). Однако, примечательно, что прекондиционирование достоверно снижало экспрессию ($p < 0,001$) всех маркёров при стресс-индуцированном старении. Так, для гипМСК+ значения относительной экспрессии мРНК для *CDKN1A*, *CDKN2A* и *TP53* составляли $2,10 \pm 0,12$, $3,08 \pm 0,10$ и $8,36 \pm 0,38$, соответственно.

Таким образом, старение клеток в результате деления приводит к увеличению экспрессии генов-контроллеров клеточного цикла, однако, при анализе экспрессии *CDKN1A*, *CDKN2A* и *TP53* в клетках после обработки H_2O_2 изменение экспрессии было более выражено. Важно отметить, что прекондиционирование МСК с миметиком гипоксии в течение 24 ч позволило достоверно снизить экспрессию этих генов в гипМСК+.

16.2.7. Исследование количества колониеобразующих единиц (КОЕ) в стареющих МСК.

Снижение пролиферативной способности стареющих МСК широко описано как *in vitro*, так и *in vivo*. Изначально, клеточное старение было идентифицировано как потеря пролиферативной способности клеток после длительного культивирования (репликативное старение клеток). Анализ колониеобразующих единиц-фибробластов (КОЕ) является одним из наиболее часто используемых качественных методов оценки и анализа потенциала пролиферации МСК *in vitro*. Стареющие МСК демонстрируют пониженный уровень КОЕ и меньшие размеры колоний.

На данном этапе исследовали количество КОЕ в модели стареющих МСК с использованием кристаллического фиолетового (рисунок 16.7). Клетки МСК РП культивировали в течение 14 дней после обработки $CoCl_2$ или $CoCl_2$ и H_2O_2 . В

качестве контроля использовали клетки МСК РП без обработки. В качестве модельных клеток репликативного старения оценивали пролиферативный потенциал МСК позднего пассажа. В результате, было показано, что доля пролиферирующих МСК после обработки CoCl_2 не претерпевает существенных изменений и значения ОП после растворения кристаллического фиолетового были сопоставимы с контролем (МСК РП). При этом, МСК ПП также обладали достаточно высоким значением КОЕ ($93,2 \pm 2,6$ % относительно контроля МСК РП). В результате индукции старения с использованием H_2O_2 существенно снижалась пролиферативная способность клеток ($33,2 \pm 2,0$ % для МСК+), при этом, прекондиционирование МСК с миметиком гипоксии не влияло на КОЕ ($29,6 \pm 2,6$ % для гипМСК+).

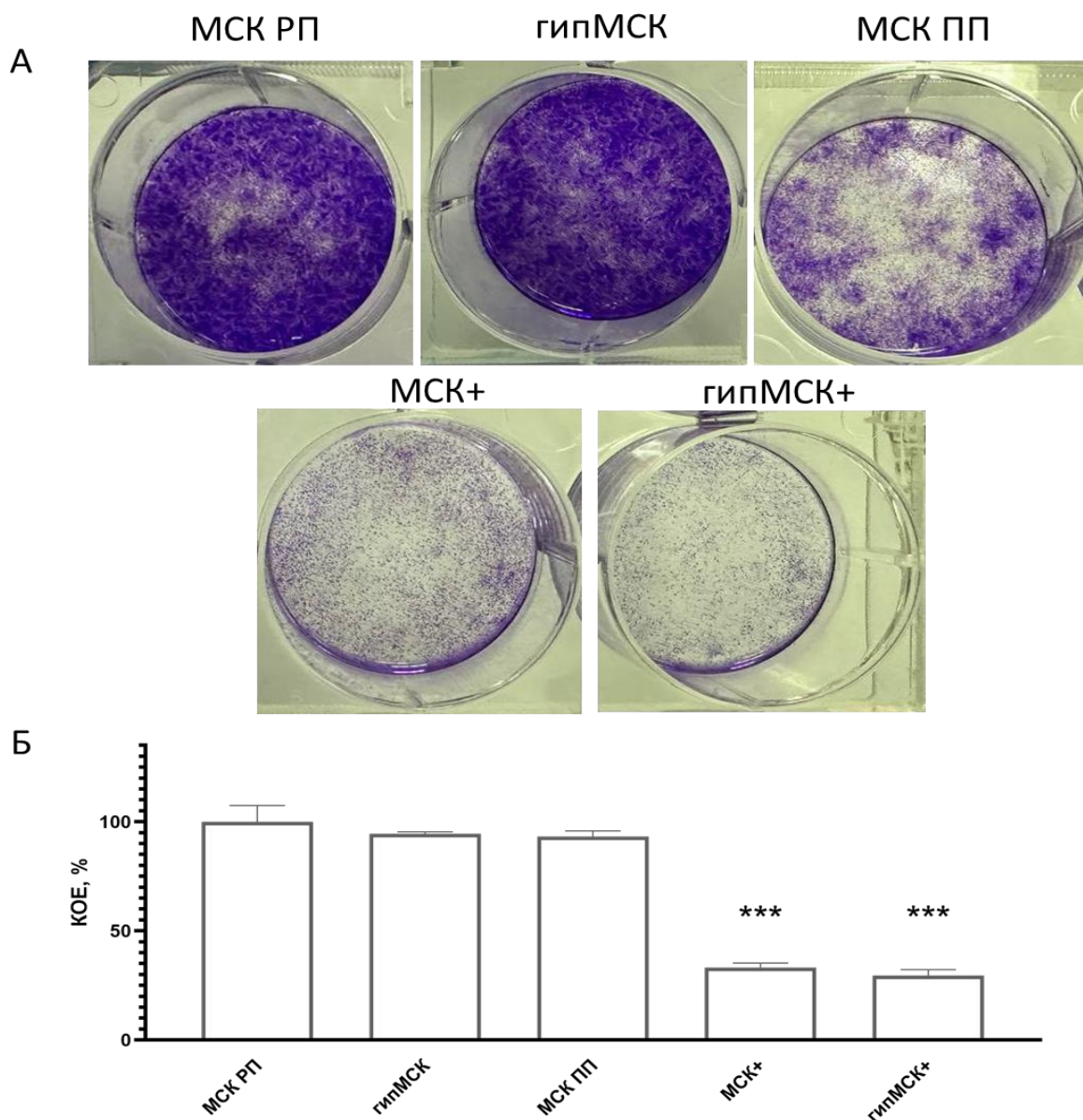


Рисунок 16.7 – Результаты теста на определение колониеобразующих единиц при культивировании МСК раннего пассажа (МСК РП, контроль), обработанных миметиком гипоксии CoCl_2 (гипМСК), позднего пассажа (МСК ПП), стареющих в результате H_2O_2 обработки без (МСК+) и с гипоксическим прекондиционированием (гипМСК+). А – репрезентативные изображения окрашенных клеток. Б – результаты исследования оптической плотности растворов кристаллического фиолетового. Погрешность указана как SEM. *** $p < 0,001$

16.2.8. Исследование профиля секретируемых стареющими МСК молекул с помощью ИФА.

В процессе старения МСК демонстрируют специфический секретом, который регулирует, поддерживает и усиливает старение. Набор ряда цитокинов и хемокинов представляет собой, так называемый, профиль секретируемых стареющими клетками, или SASP (от англ. senescence-associated secretory phenotype). Доказано,

что SASP позволяет стареющим клеткам участвовать в ремоделировании своей среды посредством модуляции множества физиологических функций, включая заживление ран, подавление рака и эмбриональное развитие. Этот секреторный фенотип также связан с повышенной экспрессией протеаз и металлопротеиназ, которые могут влиять на внеклеточный матрикс. Кроме того, сообщается, что секреторные цитокины, факторы роста и протеиназы стареющих МСК являются не только маркерами старения, но и триггерами старения [501]. Одними из ключевых маркеров стареющих МСК являются интерлейкин-1 бета (IL-1 β) и моноцитарный хемотаксический белок 1 (MCP-1). Уровень этих цитокинов в кондиционной среде от МСК РП и ПП, а также обработанных миметиком гипоксии CoCl₂ и стареющих в результате H₂O₂ обработки без и с гипоксическим прекондиционированием был исследован на данном этапе работы с помощью иммуноферментного анализа (рисунок 16.8).

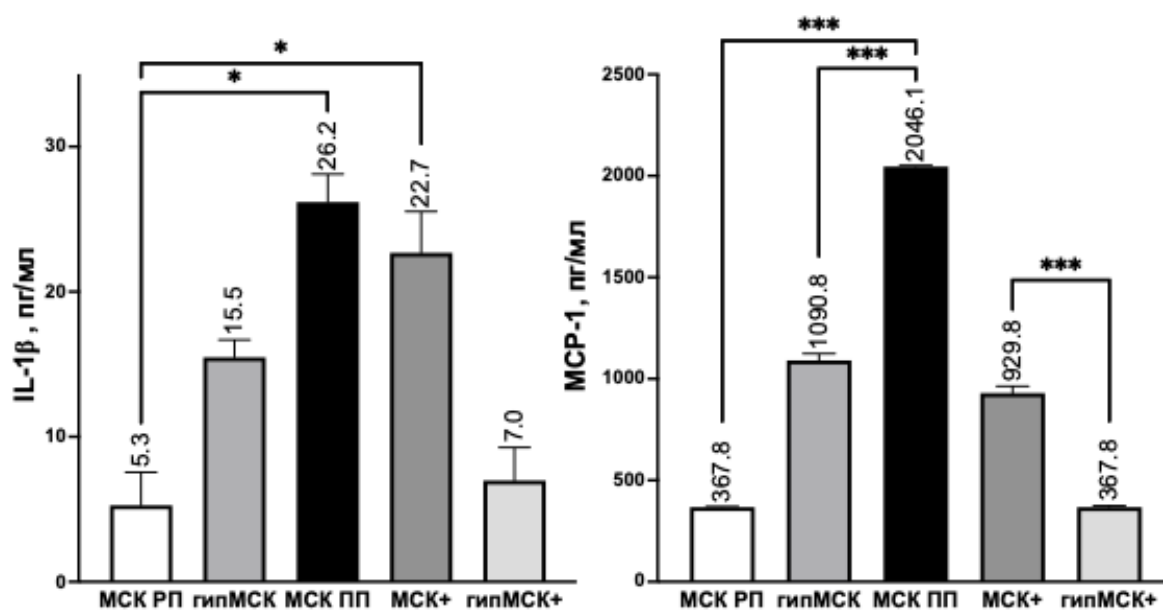


Рисунок 16.8 – Исследование профиля секретируемых молекул МСК раннего пассажа (МСК РП, контроль), обработанных миметиком гипоксии CoCl₂ (гипМСК), позднего пассажа (МСК ПП), стареющих в результате H₂O₂ обработки без (МСК+) и с гипоксическим прекондиционированием (гипМСК+). Результаты ИФА на интерлейкин-1 бета (IL-1 β) и моноцитарный хемотаксический белок 1 (MCP-1). Погрешность указана как SEM. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

В результате было показано, что МСК РП секретируют IL-1 β в количестве 5,3 $\pm$ 3,2 пг/мл, при этом в результате репликативного старения уровень этого цитокина существенно возрастал в КС и составлял для МСК ПП 26,2 $\pm$ 2,7 пг/мл. Кроме того,

при H_2O_2 - индуцированном старении клеток в КС от МСК⁺ детектировали сопоставимое для МСК РП значение ($22,7 \pm 4,1$ пг/мл). Обработка МСК с помощью миметика гипоксии также способствовала усилению секреции IL-1 β : для гипМСК концентрация составляла $15,5 \pm 1,7$ пг/мл. Тем не менее, в результате прекондиционирования снижался уровень IL-1 β в среде после обработки H_2O_2 и для гипМСК⁺ составлял $7,0 \pm 3,2$ пг/мл, что соотносится с контрольным значением для МСК РП.

Аналогичную тенденцию отмечали при анализе уровня МСР-1 в КС от МСК. Так, для МСК РП детектировали $367,8 \pm 4,6$ пг/мл МСР-1, а в результате обработки H_2O_2 клетки продуцировали $929,7 \pm 47,8$ пг/мл. Для МСК позднего пассажа было получено максимальное значение концентрации ($2046,1 \pm 7,9$ пг/мл). Предобработка МСК⁺ с помощью CoCl_2 нивелировала индукцию секреции МСР-1 клетками гипМСК⁺ и уровень этого хемокина составлял $367,8 \pm 9,9$ пг/мл.

Таким образом, было показано, что в результате репликативного и стресс-индуцированного старения МСК усиленно секретируют определенные цитокины в кондиционную среду. В частности, уровни IL-1 β и МСР-1 достоверно возрастали в образцах МСК РП и МСК⁺, по сравнению с МСК раннего пассажа. Важно отметить, что прекондиционирование МСК с миметиком гипоксии приводило к снижению уровней этих паракринных факторов в среде от МСК⁺ и может быть рассмотрено в качестве стратегии для потенциального сохранения популяции молодых клеток.

16.2.9. Исследование терапевтических эффектов КС от МСК в отношении возраст-ассоциированных заболеваний (влияние на поляризацию макрофагов)

МСК способны оказывать паракрин-опосредованное влияние на микроглию/макрофаги, в том числе на их поляризацию в про- или противовоспалительный фенотип [502–504]. На следующем этапе настоящего исследования макрофаги М0 были дифференцированы в провоспалительный М1 фенотип. Для этого, М0 клетки обрабатывали LPS в концентрации 1 мкг/мл в течение 72 ч. Иммуномодулирующий потенциал КС оценивали по эффекту на дифференцировку М0 клеток в М1. Определение степени дифференцировки клеток проводили путем измерения уровня характерных для М1 провоспалительных цитокинов в кондиционной среде с помощью ИФА [505,506]. Были выбраны следующие цитокины М1 фенотипа: TNF- α , IL-1 β и IL-6 (рисунок 16.9).

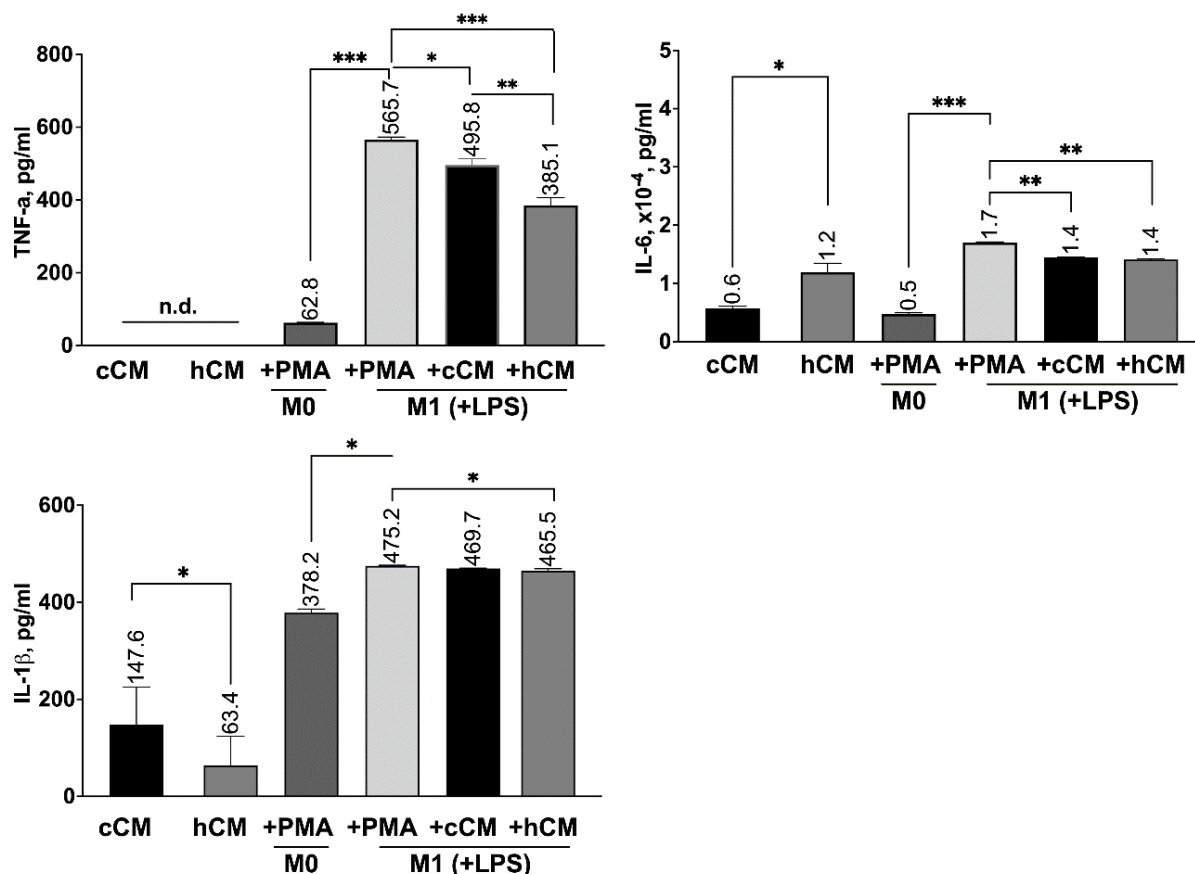


Рисунок 16.9 – Влияние КС от МСК на LPS-индуцированную дифференцировку M0 макрофагов в M1 фенотип. Уровень секреции МСК, M0 и M1 макрофагами M1-характерных провоспалительных цитокинов: TNF-α, IL-1β и IL-6. Погрешность указана как SEM. n.d. - не было детектировано. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$

В cCM и hCM не детектировали TNF-α, что может быть связано с чувствительностью использованного в работе набора для ИФА (рисунок 16.9). Обработка M0 макрофагов 1 мкг/мл LPS приводила к существенному увеличению концентрации TNF-α в культуральной среде по сравнению с интактными M0 клетками ($62,8 \pm 1,6$ пкг/мл и $565,7 \pm 12,6$ пкг/мл для M0 и M1 клеток, соответственно). При индукции дифференцировки в присутствии КС наблюдали достоверное снижение уровня TNF-α ($p < 0,05$ или $p < 0,001$). Так, в результате обработки индуцированных M0 макрофагов с помощью cCM концентрация TNF-α составляла $495,8 \pm 19,2$ пкг/мл и $385,1 \pm 16,3$ пкг/мл после - hCM.

Во всех типах исследуемых КС от МСК детектировали IL-1β. Важно отметить, что в результате предобработки CoCl₂ уровень этого провоспалительного цитокина достоверно снижался ($p < 0,05$). Мы также отмечаем, что макрофаги M0 конститутивно продуцировали IL-1β ($378,2 \pm 13,8$ пкг/мл), а их обработка LPS

приводила к увеличению концентрации IL-1 β в среде до $475,2 \pm 1,6$ пкг/мл. Обработка клеток с помощью hCM приводила к достоверному ($p < 0,05$) снижению LPS-индуцированной секреции IL-1 β в M1 клетках ($465,5 \pm 5,0$ пкг/мл).

Кроме того, МСК конститутивно секретируют IL-6 ($5677,7 \pm 714,0$ пкг/мл), а гипоксическое прекондиционирование способствовало повышению его продукции ($11908,9 \pm 2678,8$ пкг/мл) (рисунок 16.9). При исследовании уровня IL-6 в культуральной среде от M0 и M1 макрофагов было показано, что индукция M1 фенотипа приводила к достоверному увеличению концентрации IL-6 (от $4724,5 \pm 398,0$ пкг/мл для M0 до $16990,6 \pm 246,0$ пкг/мл для M1 макрофагов). Добавление hCM и cCM к индукционной среде с LPS приводило к значительному снижению уровня IL-6 (с $16990,0 \pm 246,0$ пкг/мл до $14433,4 \pm 187,9$ и $14082,7 \pm 219,7$ пкг/мл для cCM и hCM, соответственно).

Таким образом, использование КС от прекондиционированных МСК является перспективной стратегией для снижения секреции провоспалительных цитокинов в LPS-индуцированных макрофагах.

Для исследования влияния КС от МСК на дифференцировку M0 в M2 макрофаги, клетки M0 были обработаны cCM и hCM в течение 72 ч. Клетки M2 фенотипа регулируют снижение чрезмерного воспаления, путем секреции противовоспалительных цитокинов [505–507]. В данной работе оценивался уровень IL-4 и VEGF в культуральной среде M2-индуцированных макрофагов методом ИФА, а также экспрессия генов-маркеров M2 фенотипа (*MRC1*, *IL-10*, *TGFB1*) с помощью ПЦР-РВ (рисунок 16.10).

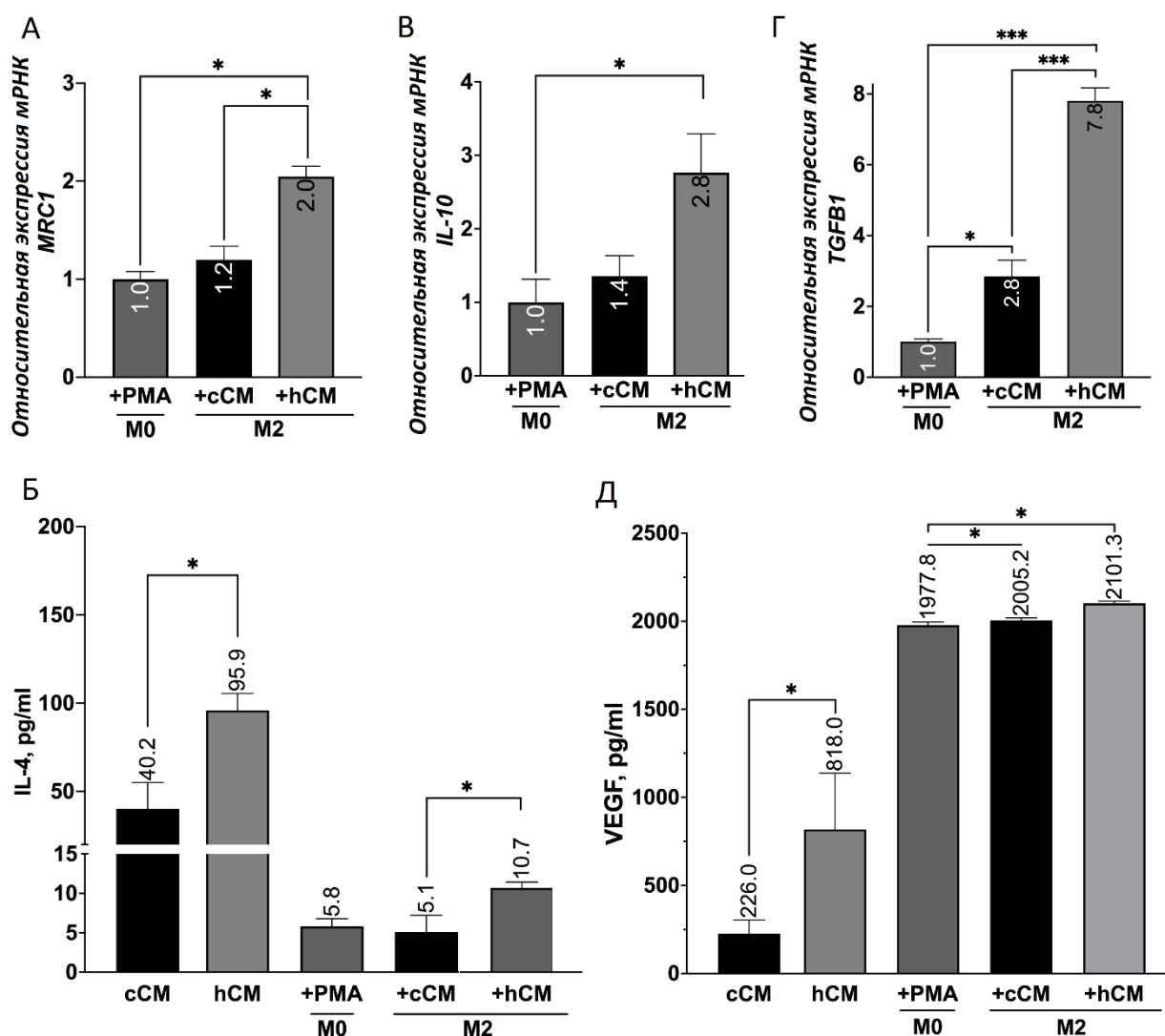


Рисунок 16.10 – Влияние КС от МСК на дифференцировку М0 макрофагов в М2 фенотип. А, В, Г - относительная экспрессия *MRC1*, *IL-10* и *TGFB1*, соответственно, Б, Д - уровень секреции *IL-4* и *VEGF*, соответственно, после индукции дифференцировки с помощью КС. Погрешность указана как SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$

Увеличение относительной экспрессии мРНК гена *MRC1* наблюдалось в результате обработки М0 клеток с помощью hCM и cCM в $2,0 \pm 0,1$ раза и $1,2 \pm 0,13$ раза, соответственно (рисунок 16.10А), относительно контроля (клетки THP-1 в полной среде). При исследовании уровня IL-4 было показано, что МСК конститутивно секретируют IL-4 ($40,2 \pm 21,2$ пкг/мл), а гипоксическое прекондиционирование приводят к достоверному увеличению ($p < 0,05$) уровня этого цитокина в hCM ($95,9 \pm 16,6$ пкг/мл) (рисунок 16.10Б). Мы показали, что в КС от М0 макрофагов также детектируется IL-4 ($5,8 \pm 1,36$ пкг/мл). Важно отметить, что обработка М0 клеток с помощью hCM, но не cCM, индуцировала секрецию IL-4 М-

2 подобными клетками (M2+hCM: $10,7 \pm 1,0$ пкг/мл; в то время как для M2+cCM: $5,8 \pm 1,4$ пкг/мл).

Все типы КС от МСК индуцировали экспрессию *IL-10* после обработки M0 макрофагов (рисунок 16.10В). При культивировании M0 макрофагов с hCM детектировали изменение экспрессии *IL-10* в $2,8 \pm 0,5$ раза, по сравнению с интактными M0 клетками, а использование cCM приводило к увеличению экспрессии *IL-10* в $1,4 \pm 0,3$ раза.

Добавление всех типов КС к макрофагам M0 индуцировало экспрессию *TGFB1* (рисунок 16.10Г). При этом обработка с помощью hCM индуцировала *TGFB1* в $7,8 \pm 0,37$ раз, в то время как использование cCM - в $2,8 \pm 0,45$ раз.

Во всех КС от МСК и в КС от M0 макрофагов детектировали VEGF (рисунок 16.10Д). Так, для cCM отмечали $226,0 \pm 134,9$ пкг/мл VEGF, при этом, гипоксическое preconditionирование МСК позволило усилить секрецию VEGF МСК до $818,0 \pm 258,5$ пкг/мл. Для M0 макрофагов детектировали секрецию VEGF на уровне $1977,8 \pm 30,8$ пкг/мл. Обработка M0 макрофагов с помощью hCM приводила к максимальной индукции этого фактора ($2101,3 \pm 21,9$ пкг/мл), по сравнению с cCM ($2055 \pm 29,9$ пкг/мл).

Таким образом, обработка M0-подобных макрофагов с помощью КС от МСК способствует их дифференцировке в M2 фенотип, согласно результатам исследования увеличенной экспрессии/секреции соответствующих M2-маркеров (*MRC1*, *IL-4*, *IL-10*, *TGFB1* и VEGF). При этом, использование КС от preconditionированных МСК приводило к более эффективной дифференцировке макрофагов в M2 фенотип по сравнению с КС от интактных МСК.

Таким образом, результаты данного этапа исследования свидетельствуют о том, что preconditionирование МСК является перспективной стратегией для усиления иммуносупрессивных свойств клеток, важных для лечения возраст-ассоциированных заболеваний. В частности, использование миметика гипоксии CoCl_2 в качестве агента для preconditionирования МСК способствовало более выраженным иммуносупрессивным свойствам КС в отношении провоспалительных M1-макрофагов и может препятствовать развитию нейровоспаления за счет поддержания баланса между M1/M2 типами микроглии (опубликована статья в журнале *Biomedicines*, Q1, 10.3390/biomedicines12102243). Результаты настоящего

исследования представляют интерес для дальнейшего развития терапии болезни Альцгеймера с использованием КС от прекондиционированных МСК. Однако, требуется более подробное изучение механизма, в результате которого эти КС реализуют наблюдаемые эффекты.

16.2.10. Протокол in vitro моделирования старения МСК человека.

На основании проведенных исследований в соответствии с п.1.16 ПГ был разработан протокол *in vitro* моделирования старения МСК человека (Приложение Т).

16.3. Заключение к Разделу 16

В результате данного этапа работы был разработан протокол получения *in vitro* модели старения мезенхимальных стволовых клеток (МСК) человека путём их обработки с помощью 400 мкМ H₂O₂ в течение 24 ч. Было показано, что в такой модели стресс-индуцированного клеточного старения изменяется морфология и аутофлуоресценция клеток, возрастает активность SA-β-gal, увеличивается количество внутриклеточных АФК, замедляется прогрессия клеточного цикла, снижается пролиферативный потенциал клеток и изменяется профиль секретируемых провоспалительных молекул (IL-1β, MCP-1). Кроме того, было показано, что прекондиционирование клеток с миметиком гипоксии CoCl₂ в концентрации 500 мкМ в течение 24 ч может снижать влияние на некоторые параметры (уровень АФК, прогрессия клеточного цикла, секреторный фенотип), участвующих в реализации прогрессии H₂O₂-индуцированного старения МСК.

Согласно п 1.16 ПГ и в соответствии с пп. 3.16, 4.16, 5.15 и 6.1.10 ТЗ работы выполнены в полном объеме.

По результатам работ подготовлена публикация: Tolstova, T.; Dotsenko, E.; Luzgina, N.; Rusanov, A. Preconditioning of Mesenchymal Stem Cells Enhances the Neuroprotective Effects of Their Conditioned Medium in an Alzheimer's Disease In Vitro Model. *Biomedicines* **2024**, 12, 2243. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12102243> (Публикация №2 в составе пакета отчетной документации).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выполнен первый этап проекта, цель которого является разработка методологии оценки функциональной активности единичных объектов и потенциальных геропротективных соединений для выявления молекулярных основ возраст-зависимых процессов в организме человека и разработки системы определения биологического возраста.

В рамках решения Задачи 1 проекта «Разработка технологии оценки функциональной активности единичных биомакромолекул с помощью молекулярных детекторов, включающей методические, инструментальные и программные решения, необходимые для наблюдения за свойствами единичных молекул ферментов в условиях их функционирования» выполнена разработка методологии использования молекулярного детектора АСМ для исследования функциональных свойств единичных молекул модельного фермента – пероксидазы хрена. Получены результаты АСМ-визуализации ПХ в условиях ферментной активности, включающие: сведения об олигомерном состоянии белка; рекомендации по выбору объектов наблюдения на поверхности; референсные значения уровней шума измеряемых сигналов. По результатам визуализации с высоким разрешением выбраны параметры (латеральные размеры и высоты) объектов, которые могут рассматриваться как характеристические для целевых объектов при наблюдении за ферментной активностью отдельных молекул белка. Получены инструментальные и программные решения в рамках создания нового типа детектора – нанопорового детектора для наблюдения за свойствами единичных молекул ферментов в условиях их функционирования. Разработана принципиальная схема нанопорового детектора, как основы системы регистрации функциональной активности фермента, включая электронные блоки для измерения сигнала, конструкцию ячейки для аналита, программное обеспечение для работы на нанопоровом детекторе, методику встраивания белка в нанопору. Работоспособность предложенного решения доказана на примере регистрации функциональной активности фермента цитохрома Р450 ВМ3.

В рамках решения Задачи 2 проекта «Выбор, создание и характеристика соединений и композиций, способствующих значимому увеличению продолжительности функциональной активности биологических систем» выбраны

соединения, обладающие потенциалом применения в качестве геропротекторных препаратов, выбраны модели для исследования функциональной активности и оценки эффективности геропротективных свойств этих соединений. В том числе получены генетические конструкции, проведена экспрессия мутантных ферментов и определены кинетические параметры для стабильного модельного цитохрома P450BM3 как мишени для проверки действия эффекторов. На основе имеющегося в ИБМХ задела по разработке фосфолипидных препаратов и оценке возможности использования фосфолипидных препаратов в исследованиях *in vitro* и *in vivo* препарат Витафосфолип™ выбран как потенциальное геропротективное соединение, влияющее на липид крови, а следовательно, и атеросклеротические поражения. Также получен набор полноатомных трехмерных структур мишеней для белка ORF2p – потенциальной мишени для воздействия терапевтических средств. Получены валидированные модели зависимостей «структура - геропротекторная активность».

В рамках решения Задачи 3 «Масштабное профилирование биологических образцов с целью определения молекулярных показателей, имеющих потенциал применения в системах оценки биологического возраста» сформирована часть первая коллекции биоматериала для выявления молекулярных основ возраст-зависимых процессов в организме человека и разработки системы определения биологического возраста, включающая 150 биологических образцов (плазма крови) с аннотированными данными. Для анализа образцов коллекции с целью масштабного профилирования: (1) разработаны необходимые протоколы для панорамного и таргетного протеомного анализа, включающего роботизированную пробоподготовку образцов; (2) проведен синтез и очистка пептидных стандартов с присоединением одного изотопно-меченого аминокислотного остатка; (3) разработан протокол оценки общего содержания метаболитов в образце, адаптированный к анализу больших серий биологических образцов; (4) разработан протокол пробоподготовки для анализа внеклеточной ДНК.

По Задаче 4 «Разработка предсказательной модели для оценки биологического возраста» на основании анализа литературы и данных публичных репозиторий определен перечень белков и перечень метаболитов важных для диагностики социально значимых заболеваний и/или заболеваний, связанных с

возрастными изменениями. Также в рамках данной задачи разработан протокол получения *in vitro* модели старения мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

По результатам работ за отчетный период опубликовано 12 публикации и одна публикация принята в печать, также подготовлена к защите диссертация.

Все предусмотренные Планом-графиком работы выполнены в полном объеме в строгом соответствии с требованиями Технического задания Соглашения. Разработанные документы представлены в составе пакета отчетной документации за текущий этап работ. Основные результаты проекты размещены на сайте ИБМХ по ссылке

<https://www.ibmc.msk.ru/articles/075-15-2024-643-12-07-2024>.

.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1.Crimmins E.M. Lifespan and Healthspan: Past, Present, and Promise // Gerontologist. 2015. Vol. 55, № 6. P. 901–911.
- 2.Finch C.E. Evolution in health and medicine Sackler colloquium: Evolution of the human lifespan and diseases of aging: roles of infection, inflammation, and nutrition // Proc Natl Acad Sci U S A. 2010. Vol. 107 Suppl 1, № Suppl 1. P. 1718–1724.
- 3.Brayne C. et al. Cognitive decline in an elderly population--a two wave study of change // Psychol Med. 1995. Vol. 25, № 4. P. 673–683.
- 4.Gulmez Karaca K. et al. Engram reactivation during memory retrieval predicts long-term memory performance in aged mice // Neurobiol Aging. 2021. Vol. 101. P. 256–261.
- 5.Morley J.E. Mild cognitive impairment-a treatable condition // J Am Med Dir Assoc. 2014. Vol. 15, № 1. P. 1–5.
- 6.Casagrande M. et al. The complex burden of determining prevalence rates of mild cognitive impairment: A systematic review // Front Psychiatry. 2022. Vol. 13. P. 960648.
- 7.Shah Y., Tangalos E.G., Petersen R.C. Mild cognitive impairment. When is it a precursor to Alzheimer's disease? // Geriatrics. 2000. Vol. 55, № 9. P. 62, 65–68.
- 8.Brayne C. The elephant in the room - healthy brains in later life, epidemiology and public health // Nat Rev Neurosci. 2007. Vol. 8, № 3. P. 233–239.
- 9.Amini R. et al. The Level of Cognitive Impairment and Likelihood of Frequent Hospital Admissions // J Aging Health. 2019. Vol. 31, № 6. P. 967–988.
- 10.Fogg C. et al. Cognitive impairment is independently associated with mortality, extended hospital stays and early readmission of older people with emergency hospital admissions: A retrospective cohort study // Int J Nurs Stud. 2019. Vol. 96. P. 1–8.
- 11.Fogg C. et al. Hospital outcomes of older people with cognitive impairment: An integrative review // Int J Geriatr Psychiatry. 2018. Vol. 33, № 9. P. 1177–1197.
- 12.Goldsmith T.C. On the programmed/non-programmed aging controversy // Biochemistry (Mosc). 2012. Vol. 77, № 7. P. 729–732.
- 13.Goldsmith T.C. Modern evolutionary mechanics theories and resolving the programmed/non-programmed aging controversy // Biochemistry Moscow. 2014. Vol. 79, № 10. P. 1049–1055.

14. De La Fuente M. Oxidation and Inflammation in the Immune and Nervous Systems, a Link Between Aging and Anxiety // Handbook of Immunosenescence / ed. Fulop T. et al. Cham: Springer International Publishing, 2018. P. 1–31.
15. Montecino-Rodriguez E., Berent-Maoz B., Dorshkind K. Causes, consequences, and reversal of immune system aging // J Clin Invest. 2013. Vol. 123, № 3. P. 958–965.
16. Félix J. et al. The immunity and redox clocks in mice, markers of lifespan // Sci Rep. 2024. Vol. 14, № 1. P. 1703.
17. De la Fuente M., Miquel J. An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging // Curr Pharm Des. 2009. Vol. 15, № 26. P. 3003–3026.
18. Mattson M.P., Magnus T. Ageing and neuronal vulnerability // Nat Rev Neurosci. 2006. Vol. 7, № 4. P. 278–294.
19. Salminen A. et al. Astrocytes in the aging brain express characteristics of senescence-associated secretory phenotype // Eur J Neurosci. 2011. Vol. 34, № 1. P. 3–11.
20. Yeoman M., Scutt G., Faragher R. Insights into CNS ageing from animal models of senescence // Nat Rev Neurosci. 2012. Vol. 13, № 6. P. 435–445.
21. Vardy Y. The Alzheimer conundrum: Entanglements of dementia and aging // Glob Public Health. 2015. Vol. 10, № 1. P. 132–133.
22. Sasaki T., Kishi S. Molecular and chemical genetic approaches to developmental origins of aging and disease in zebrafish // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. 2013. Vol. 1832, № 9. P. 1362–1370.
23. Jazwinski S.M. Longevity, genes, and aging // Science. 1996. Vol. 273, № 5271. P. 54–59.
24. Taormina G. et al. Longevity: Lesson from Model Organisms // Genes. 2019. Vol. 10, № 7. P. 518.
25. Keshavarz M. et al. Aging - What it is and how to measure it // Mech Ageing Dev. 2023. Vol. 213. P. 111837.
26. Kenyon C.J. The genetics of ageing // Nature. 2010. Vol. 464, № 7288. P. 504–512.
27. Aebersold R., Mann M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function // Nature. 2016. Vol. 537, № 7620. P. 347–355.

- 28.Huttlin E.L. et al. Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks // *Nature*. 2017. Vol. 545, № 7655. P. 505–509.
- 29.UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge // *Nucleic Acids Res*. 2019. Vol. 47, № D1. P. D506–D515.
- 30.Kliuchnikova A.A. et al. Proteomic Markers of Aging and Longevity: A Systematic Review // *IJMS*. 2024. Vol. 25, № 23. P. 12634.
- 31.WHO. Старение [Электронный ресурс]. URL: https://www.who.int/ru/health-topics/ageing#tab=tab_1 (дата обращения: 16.01.2025).
- 32.López-Otín C. et al. The hallmarks of aging // *Cell*. 2013. Vol. 153, № 6. P. 1194.
- 33.Gladyshev V.N. et al. Molecular Damage in Aging // *Nature aging. Nat Aging*, 2021. Vol. 1, № 12. P. 1096–1106.
- 34.Coenen L. et al. Markers of aging: Unsupervised integrated analyses of the human plasma proteome // *Frontiers in aging. Front Aging*, 2023. Vol. 4.
- 35.Ivanova I.A. et al. Atomic Force Microscopy Study of the Temperature and Storage Duration Dependencies of Horseradish Peroxidase Oligomeric State // *Biomedicines*. 2022. Vol. 10, № 10. P. 2645.
- 36.Cygan R.T., Liang J.-J., Kalinichev A.G. Molecular Models of Hydroxide, Oxyhydroxide, and Clay Phases and the Development of a General Force Field // *J. Phys. Chem. B*. 2004. Vol. 108, № 4. P. 1255–1266.
- 37.Huang J. et al. CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins // *Nat Methods*. 2017. Vol. 14, № 1. P. 71–73.
- 38.Heinz H. et al. Thermodynamically consistent force fields for the assembly of inorganic, organic, and biological nanostructures: the INTERFACE force field // *Langmuir*. 2013. Vol. 29, № 6. P. 1754–1765.
- 39.Berglund G.I. et al. The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution // *Nature*. 2002. Vol. 417, № 6887. P. 463–468.
- 40.Abraham M.J. et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers // *SoftwareX*. 2015. Vol. 1–2. P. 19–25.

41. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 3.0 Schrödinger, LLC [Электронный ресурс]. URL: <https://www.pymol.org/support.html> (дата обращения: 16.01.2025).
42. Brooks B.R. et al. CHARMM: the biomolecular simulation program // *J Comput Chem*. 2009. Vol. 30, № 10. P. 1545–1614.
43. Choi Y.K. et al. CHARMM-GUI Nanomaterial Modeler for Modeling and Simulation of Nanomaterial Systems // *J. Chem. Theory Comput*. 2022. Vol. 18, № 1. P. 479–493.
44. Jo S. et al. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM // *J Comput Chem*. 2008. Vol. 29, № 11. P. 1859–1865.
45. Kern N.R. et al. CHARMM-GUI Multicomponent Assembler for Modeling and Simulation of Complex Multicomponent Systems // *bioRxiv*. 2023. P. 2023.08.30.555590.
46. Lee J. et al. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field // *J Chem Theory Comput*. 2016. Vol. 12, № 1. P. 405–413.
47. Mark P., Nilsson L. Structure and Dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E Water Models at 298 K // *J. Phys. Chem. A*. 2001. Vol. 105, № 43. P. 9954–9960.
48. Bussi G., Donadio D., Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling // *J Chem Phys*. 2007. Vol. 126, № 1. P. 014101.
49. Essmann U. et al. A smooth particle mesh Ewald method // *The Journal of Chemical Physics*. 1995. Vol. 103, № 19. P. 8577–8593.
50. Gorelov S. et al. DSSP in GROMACS: Tool for Defining Secondary Structures of Proteins in Trajectories // *J Chem Inf Model*. 2024. Vol. 64, № 9. P. 3593–3598.
51. Michaud-Agrawal N. et al. MDAAnalysis: a toolkit for the analysis of molecular dynamics simulations // *J Comput Chem*. 2011. Vol. 32, № 10. P. 2319–2327.
52. Справочник химика. Том 4. Аналитическая химия, спектральный анализ, показатели преломления / Под ред. Б.П. Никольского — Л.: Химия, 1967 — 920 с.
53. Dunford H.B. Peroxidases and catalases: biochemistry, biophysics, biotechnology, and physiology. 2. ed / ed. Dunford H.B. Hoboken, NJ: Wiley, 2010. 459 p.

54.Sanders S.A., Bray R.C., Smith A.T. pH-dependent Properties of a Mutant Horseradish Peroxidase Isoenzyme C in which Arg38 has been Replaced with Lysine // European Journal of Biochemistry. 1994. Vol. 224, № 3. P. 1029–1037.

55.Wolfenden B.S., Willson Robin.L. Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2. 1982. № 7. P. 805–812.

56.Ivanov Yu.D. et al. Atomic force microscopy visualization and measurement of the activity and physicochemical properties of single monomeric and oligomeric enzymes // BIOPHYSICS. 2011. Vol. 56, № 5. P. 892–896.

57.Иванова, И. А. Алгоритм обработки данных для определения флуктуаций высоты биомакромолекулы при АСМ измерениях / И. А. Иванова, М. О. Ершова, Т. О. Плешакова // Биомедицинская химия: наука и практика : Сборник научных трудов Всероссийской конференции с международным участием, Москва, 03–04 октября 2024 года. – Москва: Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, 2024. – С. 23-24. – EDN CCMAUY.

58.Cappella B., Dietler G. Force-distance curves by atomic force microscopy // Surface Science Reports. 1999. Vol. 34, № 1–3. P. 1–104.

59.Alegre-Cebollada J. et al. Single-molecule Force Spectroscopy Approach to Enzyme Catalysis // Journal of Biological Chemistry. 2010. Vol. 285, № 25. P. 18961–18966.

60.Radmacher M. et al. Imaging adhesion forces and elasticity of lysozyme adsorbed on mica with the atomic force microscope // Langmuir. 1994. Vol. 10, № 10. P. 3809–3814.

61.McCammon J.A., Harvey S.C. Dynamics of Proteins and Nucleic Acids. 1st ed. Cambridge University Press, 1987.

62.Umeda K., McArthur S.J., Kodera N. Spatiotemporal resolution in high-speed atomic force microscopy for studying biological macromolecules in action // Microscopy. 2023. Vol. 72, № 2. P. 151–161.

63.Shibata M. et al. Real-space and real-time dynamics of CRISPR-Cas9 visualized by high-speed atomic force microscopy // Nat Commun. 2017. Vol. 8, № 1. P. 1430.

- 64.Akter L. et al. Observing Dynamic Conformational Changes within the Coiled-Coil Domain of Different Laminin Isoforms Using High-Speed Atomic Force Microscopy // IJMS. 2024. Vol. 25, № 4. P. 1951.
- 65.Metzler D.E. Biochemistry: the chemical reactions of living cells. New York: Academic Press, 1977. 1129 p.
- 66.Archakov A. et al. Biospecific irreversible fishing coupled with atomic force microscopy for detection of extremely low-abundant proteins // Proteomics. 2009. Vol. 9, № 5. P. 1326–1343.
- 67.Ivanov Y.D. et al. AFM study of cytochrome CYP102A1 oligomeric state // Soft Matter. 2012. Vol. 8, № 17. P. 4602.
- 68.Pleshakova T.O. et al. AFM-based technologies as the way towards the reverse Avogadro number // BIOMED KHIM. 2015. Vol. 61, № 2. P. 239–253.
- 69.Xie X.S., Lu H.P. Single-molecule Enzymology // Journal of Biological Chemistry. 1999. Vol. 274, № 23. P. 15967–15970.
- 70.Xie S. Single-Molecule Approach to Enzymology // Single Mol. 2001. Vol. 2, № 4. P. 229–236.
- 71.Dekker C. Solid-state nanopores // Nature Nanotech. 2007. Vol. 2, № 4. P. 209–215.
- 72.Luo Y. et al. Application of Solid-State Nanopore in Protein Detection // IJMS. 2020. Vol. 21, № 8. P. 2808.
- 73.Sheng Y. et al. Measuring Enzymatic Activities with Nanopores // ChemBioChem. 2020. Vol. 21, № 15. P. 2089–2097.
- 74.Pham B. et al. A Nanopore Approach for Analysis of Caspase-7 Activity in Cell Lysates // Biophysical Journal. 2019. Vol. 117, № 5. P. 844–855.
- 75.Chen H. et al. Nanopore-based measurement of the interaction of P450cam monooxygenase and putidaredoxin at the single-molecule level // Faraday Discuss. 2022. Vol. 233. P. 295–302.
- 76.Wloka C. et al. Label-Free and Real-Time Detection of Protein Ubiquitination with a Biological Nanopore // ACS Nano. 2017. Vol. 11, № 5. P. 4387–4394.
- 77.Willems K. et al. Single-molecule nanopore enzymology // Phil. Trans. R. Soc. B. 2017. Vol. 372, № 1726. P. 20160230.

78. Bayley H., Braha O., Cheley S., Gu L.-Q. Engineered Nanopores. In: Nanobiotechnology: Concepts, Applications and Perspectives. Ed. by Niemeyer C. M., Mirkin C.A. / H. Bayley, O. Braha, S. Cheley, L.-Q. Gu. Wiley-VCH: Weinheim, 2005.
79. Gu L.-Q. et al. Stochastic sensing of organic analytes by a pore-forming protein containing a molecular adapter // *Nature*. 1999. Vol. 398, № 6729. P. 686–690.
80. Movileanu L. et al. Detecting protein analytes that modulate transmembrane movement of a polymer chain within a single protein pore // *Nat Biotechnol*. 2000. Vol. 18, № 10. P. 1091–1095.
81. Nanopores: Sensing and Fundamental Biological Interactions / ed. Iqbal S.M., Bashir R. Boston, MA: Springer US, 2011.
82. Pérez-Mitta G. et al. Bioinspired integrated nanosystems based on solid-state nanopores: “iontronic” transduction of biological, chemical and physical stimuli // *Chem. Sci*. 2017. Vol. 8, № 2. P. 890–913.
83. Tan S. et al. Detection of a single enzyme molecule based on a solid-state nanopore sensor // *Nanotechnology*. 2016. Vol. 27, № 15. P. 155502.
84. Wu M.-Y. et al. Formation of nanopores in a SiN/SiO₂ membrane with an electron beam // *Applied Physics Letters*. 2005. Vol. 87, № 11. P. 113106.
85. Storm A.J. et al. Fabrication of solid-state nanopores with single-nanometre precision // *Nature Mater*. 2003. Vol. 2, № 8. P. 537–540.
86. Chen C.-H., Chang X., Wu C.-S. A novel shaped-controlled fabrication of nanopore and its applications in quantum electronics // *Sci Rep*. 2019. Vol. 9, № 1. P. 18663.
87. Chen S. et al. Electron Beam Drilling of Nanopores on Silicon Nitride Membranes Using a Transmission Electron Microscope: S02 // *MAM*. 2007. Vol. 13, № S02.
88. Muhammad Sajeer P et al. TEM based applications in solid state nanopores: From fabrication to liquid in-situ bio-imaging // *Micron*. 2022. Vol. 162. P. 103347.
89. Ivanov Y.D. et al. Solid-State Nanopore-Based Nanosystem for Registration of Enzymatic Activity of a Single Molecule of Cytochrome P450 BM3 // *IJMS*. 2024. Vol. 25, № 19. P. 10864.
90. Ivanov Y.D. et al. SOI nanowire for the high-sensitive detection of HBsAg and α -fetoprotein // *Lab Chip*. 2012. Vol. 12, № 23. P. 5104.

91. Hartel A.J.W. et al. High bandwidth approaches in nanopore and ion channel recordings - A tutorial review // *Analytica Chimica Acta*. 2019. Vol. 1061. P. 13–27.
92. Tietze U., Schenk C. Halbleiter-Schaltungstechnik. 5., überarb. Aufl. Berlin Heidelberg: Springer, 1980. 734 p.
93. Баширов А. С., Соловьев В. Ю., Баловнев Д. А., Красовский В. Е. Оценка уровня шума генератора сигналов сверхмалого напряжения // *Вопросы радиоэлектроники*. — 2018. — № 2. — С. 128–135.
94. Стратонович, Р. Л. Избранные вопросы теории флуктуаций в радиотехнике / Р. Л. Стратонович – М.: Сов. радио, 1961. 559 с.
95. Малахов, А. Н. Флуктуации в автоколебательных системах / А. Н. Малахов – М.: Наука, 1968. 660 с.
96. Левин, Б. Р. Теоретические основы статистической радиотехники. Книга первая / Б. Р. Левин – М.: Сов. радио, 1969. 752 с.
97. Ван дер Зил, А. Шум (источники, описание, измерение) / А. Ван дер Зил – М.: Сов. радио, 1973 (пер. с англ.). 178 с.
98. Poole C., Darwazeh I. Low-noise amplifier design // *Microwave Active Circuit Analysis and Design*. Elsevier, 2016. P. 475–517.
99. Adak O. et al. Flicker Noise as a Probe of Electronic Interaction at Metal–Single Molecule Interfaces // *Nano Lett.* 2015. Vol. 15, № 6. P. 4143–4149.
100. Тэнесеску Ф., Крамарюк Р. Электростатика в технике. / Ф. Тэнесеску, М. Крамарюк — М.: «Энергия», 1980 (пер. с рум.). 296 с.
101. Orasugh J.T., Ray S.S. Functional and Structural Facts of Effective Electromagnetic Interference Shielding Materials: A Review // *ACS Omega*. 2023. Vol. 8, № 9. P. 8134–8158.
102. Mirarchi L. et al. A Standard Protocol Proposal for Reliable and Time-Saving Shielding Effectiveness Measurements for MRI Faraday Cages // *TOBEJ*. 2020. Vol. 14, № 1. P. 1–10.
103. Сарычев И. А., Бутузов А. В., Серкова Е. А., Долгова Е. В. ФОТООТВЕРЖДАЕМЫЕ АКРИЛАТНЫЕ КОМПОЗИЦИИ (ОБЗОР) // *Труды ВИАМ*. 2022. №9 (115).
104. CYP102A1 в открытой конформации [Электронный ресурс]. URL: <https://www.rcsb.org/structure/8DME> (дата обращения: 04.07.2024).

- 105.Ensembl Genome Browser [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ensembl.org/index.html> (дата обращения: 11.11.2024).
- 106.Tarbeeva S. et al. ScanBious: Survey for Obesity Genes Using PubMed Abstracts and DisGeNET // J Pers Med. 2021. Vol. 11, № 4. P. 246.
- 107.Ponomarenko E.A. et al. The Size of the Human Proteome: The Width and Depth. // International journal of analytical chemistry. Egypt, 2016. Vol. 2016. P. 7436849.
- 108.Sarygina E.V. et al. The human proteome size as a technological development function // Biomed Khim. 2024. Vol. 70, № 5. P. 364–373.
- 109.Emms D.M., Kelly S. OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics // Genome Biol. 2019. Vol. 20, № 1. P. 238.
- 110.Enroth S. et al. Protein profiling reveals consequences of lifestyle choices on predicted biological aging // Sci Rep. 2015. Vol. 5, № 1. P. 17282.
- 111.Kuo C.-L. et al. Proteomic aging clock (PAC) predicts age-related outcomes in middle-aged and older adults // Aging Cell. 2024. Vol. 23, № 8. P. e14195.
- 112.Argentieri M.A. et al. Proteomic aging clock predicts mortality and risk of common age-related diseases in diverse populations // Nat Med. 2024. Vol. 30, № 9. P. 2450–2460.
- 113.Tanaka T. et al. Plasma proteomic signature of age in healthy humans // Aging Cell. 2018. Vol. 17, № 5. P. e12799.
- 114.Tanaka T. et al. Plasma proteomic biomarker signature of age predicts health and life span // Elife. 2020. Vol. 9. P. e61073.
- 115.Lehallier B. et al. Undulating changes in human plasma proteome profiles across the lifespan // Nat Med. 2019. Vol. 25, № 12. P. 1843–1850.
- 116.Menni C. et al. Circulating Proteomic Signatures of Chronological Age // J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2015. Vol. 70, № 7. P. 809–816.
- 117.Lehallier B. et al. Data mining of human plasma proteins generates a multitude of highly predictive aging clocks that reflect different aspects of aging // Aging Cell. 2020. Vol. 19, № 11. P. e13256.
- 118.Orwoll E.S. et al. High-throughput serum proteomics for the identification of protein biomarkers of mortality in older men // Aging Cell. 2018. Vol. 17, № 2. P. e12717.
- 119.Santos-Lozano A. et al. Successful aging: insights from proteome analyses of healthy centenarians // Aging (Albany NY). 2020. Vol. 12, № 4. P. 3502–3515.

- 120.Wang H. et al. Quantitative iTRAQ-based proteomic analysis of differentially expressed proteins in aging in human and monkey // BMC Genomics. 2019. Vol. 20, № 1. P. 725.
- 121.Wang Z. et al. TMT-Based Quantitative Proteomic Analysis Reveals Proteomic Changes Involved in Longevity // Proteomics Clin Appl. 2019. Vol. 13, № 4. P. e1800024.
- 122.Ye S. et al. Plasma proteomic and autoantibody profiles reveal the proteomic characteristics involved in longevity families in Bama, China // Clin Proteom. 2019. Vol. 16, № 1. P. 22.
- 123.Salignon J. et al. Age prediction from human blood plasma using proteomic and small RNA data: a comparative analysis // Aging (Albany NY). 2023. Vol. 15, № 12. P. 5240–5265.
- 124.Johnson A.A. et al. Systematic review and analysis of human proteomics aging studies unveils a novel proteomic aging clock and identifies key processes that change with age // Ageing Res Rev. 2020. Vol. 60. P. 101070.
- 125.Moaddel R. et al. Proteomics in aging research: A roadmap to clinical, translational research // Aging Cell. 2021. Vol. 20, № 4. P. e13325.
- 126.Howe K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome // Nature. 2013. Vol. 496, № 7446. P. 498–503.
- 127.Fitch W.M. Distinguishing homologous from analogous proteins // Syst Zool. 1970. Vol. 19, № 2. P. 99–113.
- 128.Thomas P.D. et al. On the Use of Gene Ontology Annotations to Assess Functional Similarity among Orthologs and Paralogs: A Short Report // PLoS Comput Biol. 2012. Vol. 8, № 2. P. e1002386.
- 129.Nehrt N.L. et al. Testing the ortholog conjecture with comparative functional genomic data from mammals // PLoS Comput Biol. 2011. Vol. 7, № 6. P. e1002073.
- 130.Altenhoff A.M. et al. Resolving the ortholog conjecture: orthologs tend to be weakly, but significantly, more similar in function than paralogs // PLoS Comput Biol. 2012. Vol. 8, № 5. P. e1002514.
- 131.Hansson G.K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease // N Engl J Med. 2005. Vol. 352, № 16. P. 1685–1695.
- 132.Bouabe H., Okkenhaug K. Gene targeting in mice: a review // Methods Mol Biol. 2013. Vol. 1064. P. 315–336.

- 133.Oka K. et al. The Naked Mole-Rat as a Model for Healthy Aging // *Annu Rev Anim Biosci.* 2023. Vol. 11. P. 207–226.
- 134.Oka K. et al. Resistance to chemical carcinogenesis induction via a dampened inflammatory response in naked mole-rats // *Commun Biol.* 2022. Vol. 5, № 1. P. 287.
- 135.Kerepesi C. et al. Epigenetic aging of the demographically non-aging naked mole-rat // *Nat Commun.* 2022. Vol. 13, № 1. P. 355.
- 136.Yao L. et al. Health ROI as a measure of misalignment of biomedical needs and resources // *Nat Biotechnol.* 2015. Vol. 33, № 8. P. 807–811.
- 137.Brown-Borg H.M. et al. Dwarf mice and the ageing process // *Nature.* 1996. Vol. 384, № 6604. P. 33.
- 138.Dollé M.E., Snyder W.K., Vijg J. Genotyping the Prop-1 mutation in Ames dwarf mice // *Mech Ageing Dev.* 2001. Vol. 122, № 15. P. 1915–1918.
- 139.Blüher M., Kahn B.B., Kahn C.R. Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue // *Science.* 2003. Vol. 299, № 5606. P. 572–574.
- 140.Hartwell L.H. Nobel Lecture. Yeast and cancer // *Biosci Rep.* 2002. Vol. 22, № 3–4. P. 373–394.
- 141.Coughlan C.M., Brodsky J.L. Use of yeast as a model system to investigate protein conformational diseases // *Mol Biotechnol.* 2005. Vol. 30, № 2. P. 171–180.
- 142.Nakano A. Yeast Golgi apparatus--dynamics and sorting // *Cell Mol Life Sci.* 2004. Vol. 61, № 2. P. 186–191.
- 143.Longo V.D. et al. Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae* // *Cell Metab.* 2012. Vol. 16, № 1. P. 18–31.
- 144.Hyde R.R. Inheritance of the length of life in *Drosophila ampelophila*. *Indiana Sci. Rep.*, 2013;23:113-123.
- 145.Pearl R., Parker S.L. Experimental Studies on the Duration of Life. I. Introductory Discussion of the Duration of Life in *Drosophila* // *The American Naturalist.* 1921. Vol. 55, № 641. P. 481–509.
- 146.Piper M.D.W., Partridge L. Protocols to Study Aging in *Drosophila* // *Methods Mol Biol.* 2016. Vol. 1478. P. 291–302.
- 147.Ziehm M., Thornton J.M. Unlocking the potential of survival data for model organisms through a new database and online analysis platform: SurvCurv // *Aging Cell.* 2013. Vol. 12, № 5. P. 910–916.

- 148.Ziehm M., Piper M.D., Thornton J.M. Analysing variation in *Drosophila* aging across independent experimental studies: a meta-analysis of survival data // *Aging Cell*. 2013. Vol. 12, № 5. P. 917–922.
- 149.Gargano J.W. et al. Rapid iterative negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila* // *Exp Gerontol*. 2005. Vol. 40, № 5. P. 386–395.
- 150.Grotewiel M.S. et al. Functional senescence in *Drosophila melanogaster* // *Ageing Res Rev*. 2005. Vol. 4, № 3. P. 372–397.
- 151.Kennedy B.K., Kaeberlein M., Partridge L. *Small Metazoans. The Gerontological Society of America*. 2017:84-112.
- 152.Rera M., Azizi M.J., Walker D.W. Organ-specific mediation of lifespan extension: more than a gut feeling? // *Ageing Res Rev*. 2013. Vol. 12, № 1. P. 436–444.
- 153.Friedman D.B., Johnson T.E. A mutation in the age-1 gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility // *Genetics*. 1988. Vol. 118, № 1. P. 75–86.
- 154.Kenyon C. et al. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type // *Nature*. 1993. Vol. 366, № 6454. P. 461–464.
- 155.Garigan D. et al. Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation // *Genetics*. 2002. Vol. 161, № 3. P. 1101–1112.
- 156.Huang C., Xiong C., Kornfeld K. Measurements of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of *Caenorhabditis elegans* // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004. Vol. 101, № 21. P. 8084–8089.
- 157.Hughes S.E. et al. Genetic and pharmacological factors that influence reproductive aging in nematodes // *PLoS Genet*. 2007. Vol. 3, № 2. P. e25.
- 158.Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans* // *Genetics*. 1974. Vol. 77, № 1. P. 71–94.
- 159.White J.G. et al. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans* // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1986. Vol. 314, № 1165. P. 1–340.
- 160.Jarrell T.A. et al. The connectome of a decision-making neural network // *Science*. 2012. Vol. 337, № 6093. P. 437–444.

- 161.Sammut M. et al. Glia-derived neurons are required for sex-specific learning in *C. elegans* // *Nature*. 2015. Vol. 526, № 7573. P. 385–390.
- 162.Yan G. et al. Network control principles predict neuron function in the *Caenorhabditis elegans* connectome // *Nature*. 2017. Vol. 550, № 7677. P. 519–523.
- 163.McGhee J.D. The *C. elegans* intestine // *WormBook*. 2007. P. 1–36.
- 164.Altun, Zeynep F., Hall, David H., Herndon, Laura A. Pericellular Structures. *WormAtlas*.
- 165.Dijksterhuis J., Veenhuis M., Harder W. Ultrastructural-study of adhesion and initial-stages of infection of nematodes by conidia of *Drechmeria coniospora*. *Mycol Res*. 1990;94:1-8.
- 166.Tan M.W., Mahajan-Miklos S., Ausubel F.M. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999. Vol. 96, № 2. P. 715–720.
- 167.Kim D.H., Ewbank J.J. Signaling in the innate immune response // *WormBook*. 2018. Vol. 2018. P. 1–35.
- 168.Herndon L.A. et al. Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans* // *Nature*. 2002. Vol. 419, № 6909. P. 808–814.
- 169.Link C.D. Expression of human beta-amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans* // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995. Vol. 92, № 20. P. 9368–9372.
- 170.Oeda T. et al. Oxidative stress causes abnormal accumulation of familial amyotrophic lateral sclerosis-related mutant SOD1 in transgenic *Caenorhabditis elegans* // *Hum Mol Genet*. 2001. Vol. 10, № 19. P. 2013–2023.
- 171.Lakso M. et al. Dopaminergic neuronal loss and motor deficits in *Caenorhabditis elegans* overexpressing human alpha-synuclein // *J Neurochem*. 2003. Vol. 86, № 1. P. 165–172.
- 172.Papaevgeniou N., Chondrogianni N. The ubiquitin proteasome system in *Caenorhabditis elegans* and its regulation // *Redox Biol*. 2014. Vol. 2. P. 333–347.
- 173.Hsin H., Kenyon C. Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *C. elegans* // *Nature*. 1999. Vol. 399, № 6734. P. 362–366.
- 174.Kaletsky R. et al. The *C. elegans* adult neuronal IIS/FOXO transcriptome reveals adult phenotype regulators // *Nature*. 2016. Vol. 529, № 7584. P. 92–96.

175. Kaletsky R. et al. Transcriptome analysis of adult *Caenorhabditis elegans* cells reveals tissue-specific gene and isoform expression // *PLoS Genet.* 2018. Vol. 14, № 8. P. e1007559.
176. C. elegans Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology // *Science.* 1998. Vol. 282, № 5396. P. 2012–2018.
177. Li R. et al. Illumina Synthetic Long Read Sequencing Allows Recovery of Missing Sequences even in the “Finished” *C. elegans* Genome // *Sci Rep.* 2015. Vol. 5. P. 10814.
178. Tyson J.R. et al. MinION-based long-read sequencing and assembly extends the *Caenorhabditis elegans* reference genome // *Genome Res.* 2018. Vol. 28, № 2. P. 266–274.
179. Lai C.H. et al. Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *Caenorhabditis elegans* by comparative proteomics // *Genome Res.* 2000. Vol. 10, № 5. P. 703–713.
180. Kim W. et al. OrthoList 2: A New Comparative Genomic Analysis of Human and *Caenorhabditis elegans* Genes // *Genetics.* 2018. Vol. 210, № 2. P. 445–461.
181. Hodgkin J., Horvitz H.R., Brenner S. Nondisjunction Mutants of the Nematode *CAENORHABDITIS ELEGANS* // *Genetics.* 1979. Vol. 91, № 1. P. 67–94.
182. Luo S. et al. TGF- β and insulin signaling regulate reproductive aging via oocyte and germline quality maintenance // *Cell.* 2010. Vol. 143, № 2. P. 299–312.
183. Gerstbrein B. et al. In vivo spectrofluorimetry reveals endogenous biomarkers that report healthspan and dietary restriction in *Caenorhabditis elegans* // *Aging Cell.* 2005. Vol. 4, № 3. P. 127–137.
184. Podshivalova K., Kerr R.A., Kenyon C. How a Mutation that Slows Aging Can Also Disproportionately Extend End-of-Life Decrepitude // *Cell Rep.* 2017. Vol. 19, № 3. P. 441–450.
185. Newell Stamper B.L. et al. Movement decline across lifespan of *Caenorhabditis elegans* mutants in the insulin/insulin-like signaling pathway // *Aging Cell.* 2018. Vol. 17, № 1. P. e12704.

- 186.Petrascheck M., Ye X., Buck L.B. A high-throughput screen for chemicals that increase the lifespan of *Caenorhabditis elegans* // *Ann N Y Acad Sci.* 2009. Vol. 1170. P. 698–701.
- 187.Lucanic M. et al. Chemical activation of a food deprivation signal extends lifespan // *Aging Cell.* 2016. Vol. 15, № 5. P. 832–841.
- 188.Cabreiro F. et al. Metformin retards aging in *C. elegans* by altering microbial folate and methionine metabolism // *Cell.* 2013. Vol. 153, № 1. P. 228–239.
- 189.Han B. et al. Microbial Genetic Composition Tunes Host Longevity // *Cell.* 2017. Vol. 169, № 7. P. 1249-1262.e13.
- 190.Goudeau J., Aguilaniu H. Carbonylated proteins are eliminated during reproduction in *C. elegans* // *Aging Cell.* 2010. Vol. 9, № 6. P. 991–1003.
- 191.Roux A.E. et al. Reversible Age-Related Phenotypes Induced during Larval Quiescence in *C. elegans* // *Cell Metab.* 2016. Vol. 23, № 6. P. 1113–1126.
- 192.Burnaevskiy N. et al. Reactivation of RNA metabolism underlies somatic restoration after adult reproductive diapause in *C. elegans* // *Elife.* 2018. Vol. 7. P. e36194.
- 193.López-Otín C. et al. Hallmarks of aging: An expanding universe // *Cell.* 2023. Vol. 186, № 2. P. 243–278.
- 194.Kishi S. et al. The zebrafish as a vertebrate model of functional aging and very gradual senescence // *Exp Gerontol.* 2003. Vol. 38, № 7. P. 777–786.
- 195.Holmes D.J., Flückiger R., Austad S.N. Comparative biology of aging in birds: an update // *Exp Gerontol.* 2001. Vol. 36, № 4–6. P. 869–883.
- 196.Gerhard G.S. Comparative aspects of zebrafish (*Danio rerio*) as a model for aging research // *Exp Gerontol.* 2003. Vol. 38, № 11–12. P. 1333–1341.
- 197.Gerhard G.S. et al. Life spans and senescent phenotypes in two strains of Zebrafish (*Danio rerio*) // *Exp Gerontol.* 2002. Vol. 37, № 8–9. P. 1055–1068.
- 198.Barbazuk W.B. et al. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes // *Genome Res.* 2000. Vol. 10, № 9. P. 1351–1358.
- 199.Saverino C., Gerlai R. The social zebrafish: behavioral responses to conspecific, heterospecific, and computer animated fish // *Behav Brain Res.* 2008. Vol. 191, № 1. P. 77–87.

200. Shimoda N. et al. Decrease in cytosine methylation at CpG island shores and increase in DNA fragmentation during zebrafish aging // *Age (Dordr)*. 2014. Vol. 36, № 1. P. 103–115.
201. Kishi S. The search for evolutionary developmental origins of aging in zebrafish: a novel intersection of developmental and senescence biology in the zebrafish model system // *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2011. Vol. 93, № 3. P. 229–248.
202. Yu L. et al. Cognitive aging in zebrafish // *PLoS One*. 2006. Vol. 1, № 1. P. e14.
203. Balamurugan K. et al. Protocol to evaluate hyperlipidemia in zebrafish larvae // *STAR Protoc*. 2022. Vol. 3, № 4. P. 101819.
204. Almaida-Pagán P.F., Lucas-Sánchez A., Tocher D.R. Changes in mitochondrial membrane composition and oxidative status during rapid growth, maturation and aging in zebrafish, *Danio rerio* // *Biochim Biophys Acta*. 2014. Vol. 1841, № 7. P. 1003–1011.
205. Almaida-Pagán P.F. et al. Age-related changes in mitochondrial membrane composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) heart and brain // *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2012. Vol. 163, № 1. P. 129–137.
206. Almaida-Pagán P.F. et al. Changes in tissue and mitochondrial membrane composition during rapid growth, maturation and aging in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* // *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2012. Vol. 161, № 4. P. 404–412.
207. López-Otín C. et al. The Hallmarks of Aging // *Cell*. 2013. Vol. 153, № 6. P. 1194–1217.
208. Barzilai N. et al. The critical role of metabolic pathways in aging // *Diabetes*. 2012. Vol. 61, № 6. P. 1315–1322.
209. Schumacher B. et al. Delayed and accelerated aging share common longevity assurance mechanisms // *PLoS Genet*. 2008. Vol. 4, № 8. P. e1000161.
210. Philpott C. et al. Reducing the noise in behavioral assays: sex and age in adult zebrafish locomotion // *Zebrafish*. 2012. Vol. 9, № 4. P. 191–194.
211. Rosa C.E. da et al. GH overexpression modifies muscle expression of anti-oxidant enzymes and increases spinal curvature of old zebrafish // *Exp Gerontol*. 2010. Vol. 45, № 6. P. 449–456.
212. Patnaik B.K., Mahapatro N., Jena B.S. Ageing in fishes // *Gerontology*. 1994. Vol. 40, № 2–4. P. 113–132.

213. Novak C.M. et al. Caloric restriction and physical activity in zebrafish (*Danio rerio*) // *Neurosci Lett*. 2005. Vol. 383, № 1–2. P. 99–104.
214. Craig P.M., Moon T.W. Fasted zebrafish mimic genetic and physiological responses in mammals: a model for obesity and diabetes? // *Zebrafish*. 2011. Vol. 8, № 3. P. 109–117.
215. Tsai S.B. et al. Differential effects of genotoxic stress on both concurrent body growth and gradual senescence in the adult zebrafish // *Aging Cell*. 2007. Vol. 6, № 2. P. 209–224.
216. Manuel R. et al. The effects of environmental enrichment and age-related differences on inhibitory avoidance in zebrafish (*Danio rerio* Hamilton) // *Zebrafish*. 2015. Vol. 12, № 2. P. 152–165.
217. Fang L., Miller Y.I. Emerging applications for zebrafish as a model organism to study oxidative mechanisms and their roles in inflammation and vascular accumulation of oxidized lipids // *Free Radic Biol Med*. 2012. Vol. 53, № 7. P. 1411–1420.
218. Wilkinson R.N., van Eeden F.J.M. The zebrafish as a model of vascular development and disease // *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2014. Vol. 124. P. 93–122.
219. Asnani A., Peterson R.T. The zebrafish as a tool to identify novel therapies for human cardiovascular disease // *Dis Model Mech*. 2014. Vol. 7, № 7. P. 763–767.
220. Santoriello C., Zon L.I. Hooked! Modeling human disease in zebrafish // *J Clin Invest*. 2012. Vol. 122, № 7. P. 2337–2343.
221. Trede N.S. et al. The use of zebrafish to understand immunity // *Immunity*. 2004. Vol. 20, № 4. P. 367–379.
222. Fang L., Liu C., Miller Y.I. Zebrafish models of dyslipidemia: relevance to atherosclerosis and angiogenesis // *Transl Res*. 2014. Vol. 163, № 2. P. 99–108.
223. Renshaw S.A., Trede N.S. A model 450 million years in the making: zebrafish and vertebrate immunity // *Dis Model Mech*. 2012. Vol. 5, № 1. P. 38–47.
224. Lugo-Villarino G. et al. Identification of dendritic antigen-presenting cells in the zebrafish // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010. Vol. 107, № 36. P. 15850–15855.
225. Patton E.E., Zon L.I. The art and design of genetic screens: zebrafish // *Nat Rev Genet*. 2001. Vol. 2, № 12. P. 956–966.
226. Cassar S. et al. Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology // *Chem Res Toxicol*. 2020. Vol. 33, № 1. P. 95–118.

- 227.Fang L., Miller Y.I. Targeted cholesterol efflux // *Cell Cycle*. 2013. Vol. 12, № 21. P. 3345–3346.
- 228.Fang L. et al. In vivo visualization and attenuation of oxidized lipid accumulation in hypercholesterolemic zebrafish // *J Clin Invest*. 2011. Vol. 121, № 12. P. 4861–4869.
- 229.Luo H. et al. Chronological in vivo imaging reveals endothelial inflammation prior to neutrophils accumulation and lipid deposition in HCD-fed zebrafish // *Atherosclerosis*. 2019. Vol. 290. P. 125–135.
- 230.Liu C. et al. Modeling hypercholesterolemia and vascular lipid accumulation in LDL receptor mutant zebrafish // *J Lipid Res*. 2018. Vol. 59, № 2. P. 391–399.
- 231.Brown D.R. et al. Advances in the Study of Heart Development and Disease Using Zebrafish // *J Cardiovasc Dev Dis*. 2016. Vol. 3, № 2. P. 13.
- 232.Yin W. et al. Plasma lipid profiling across species for the identification of optimal animal models of human dyslipidemia // *J Lipid Res*. 2012. Vol. 53, № 1. P. 51–65.
- 233.Chen Y. et al. Atherosclerotic dyslipidemia revealed by plasma lipidomics on ApoE^{-/-} mice fed a high-fat diet // *Atherosclerosis*. 2017. Vol. 262. P. 78–86.
- 234.Camandola S., Mattson M.P. Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration // *EMBO J*. 2017. Vol. 36, № 11. P. 1474–1492.
- 235.Kelly K.M. et al. The neurobiology of aging // *Epilepsy Res*. 2006. Vol. 68 Suppl 1. P. S5-20.
- 236.Morrison J.H., Baxter M.G. The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline // *Nat Rev Neurosci*. 2012. Vol. 13, № 4. P. 240–250.
- 237.Wong L.-W. et al. Age-related changes in hippocampal-dependent synaptic plasticity and memory mediated by p75 neurotrophin receptor // *Aging Cell*. 2021. Vol. 20, № 2. P. e13305.
- 238.Ceafalan L.C. et al. Age-related ultrastructural changes of the basement membrane in the mouse blood-brain barrier // *J Cell Mol Med*. 2019. Vol. 23, № 2. P. 819–827.
- 239.Wolkow C.A. Life span: getting the signal from the nervous system // *Trends in Neurosciences*. 2002. Vol. 25, № 4. P. 212–216.

- 240.Félix J. et al. Characterization of a natural model of adult mice with different rate of aging // *Mech Ageing Dev.* 2024. Vol. 222. P. 111991.
- 241.Flurkey K., Mcurrer J., Harrison D. Mouse Models in Aging Research // *The Mouse in Biomedical Research.* Elsevier, 2007. Vol. III. P. 637–672.
- 242.Hoerder-Suabedissen A., Molnár Z. Development, evolution and pathology of neocortical subplate neurons // *Nat Rev Neurosci.* 2015. Vol. 16, № 3. P. 133–146.
- 243.Castellano J.M. et al. Human umbilical cord plasma proteins revitalize hippocampal function in aged mice // *Nature.* 2017. Vol. 544, № 7651. P. 488–492.
- 244.Wyss-Coray T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation // *Nature.* 2016. Vol. 539, № 7628. P. 180–186.
- 245.Radulescu C.I. et al. The aging mouse brain: cognition, connectivity and calcium // *Cell Calcium.* 2021. Vol. 94. P. 102358.
- 246.Herssens N. et al. Do spatiotemporal parameters and gait variability differ across the lifespan of healthy adults? A systematic review // *Gait Posture.* 2018. Vol. 64. P. 181–190.
- 247.Fahlström A., Zeberg H., Ulfhake B. Changes in behaviors of male C57BL/6J mice across adult life span and effects of dietary restriction // *Age (Dordr).* 2012. Vol. 34, № 6. P. 1435–1452.
- 248.Berry A. et al. Deletion of the life span determinant p66Shc prevents age-dependent increases in emotionality and pain sensitivity in mice // *Exp Gerontol.* 2007. Vol. 42, № 1–2. P. 37–45.
- 249.Shoji H. et al. Age-related changes in behavior in C57BL/6J mice from young adulthood to middle age // *Mol Brain.* 2016. Vol. 9, № 1. P. 11.
- 250.Mock J.T. et al. Gait Analyses in Mice: Effects of Age and Glutathione Deficiency // *Aging Dis.* 2018. Vol. 9, № 4. P. 634–646.
- 251.Serradj N., Jamon M. Age-related changes in the motricity of the inbred mice strains 129/sv and C57BL/6j // *Behav Brain Res.* 2007. Vol. 177, № 1. P. 80–89.
- 252.Gold P.E. The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage // *Behav Neural Biol.* 1986. Vol. 46, № 1. P. 87–98.
- 253.Meliska C.J. et al. Inhibitory avoidance and appetitive learning in aged normal mice: comparison with transgenic mice having elevated plasma growth hormone levels // *Neurobiol Learn Mem.* 1997. Vol. 68, № 1. P. 1–12.

- 254.Gray D.T., Barnes C.A. Distinguishing adaptive plasticity from vulnerability in the aging hippocampus // *Neuroscience*. 2015. Vol. 309. P. 17–28.
- 255.Petralia R.S., Mattson M.P., Yao P.J. Communication breakdown: the impact of ageing on synapse structure // *Ageing Res Rev*. 2014. Vol. 14. P. 31–42.
- 256.Meyer D., Bonhoeffer T., Scheuss V. Balance and stability of synaptic structures during synaptic plasticity // *Neuron*. 2014. Vol. 82, № 2. P. 430–443.
- 257.Fan X., Wheatley E.G., Villeda S.A. Mechanisms of Hippocampal Aging and the Potential for Rejuvenation // *Annu Rev Neurosci*. 2017. Vol. 40. P. 251–272.
- 258.Hartley T. et al. Space in the brain: how the hippocampal formation supports spatial cognition // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014. Vol. 369, № 1635. P. 20120510.
- 259.Pereda D. et al. Changes in presynaptic calcium signalling accompany age-related deficits in hippocampal LTP and cognitive impairment // *Aging Cell*. 2019. Vol. 18, № 5. P. e13008.
- 260.Sumner R.L. et al. The role of Hebbian learning in human perception: a methodological and theoretical review of the human Visual Long-Term Potentiation paradigm // *Neurosci Biobehav Rev*. 2020. Vol. 115. P. 220–237.
- 261.Grossman N. et al. Noninvasive Deep Brain Stimulation via Temporally Interfering Electric Fields // *Cell*. 2017. Vol. 169, № 6. P. 1029-1041.e16.
- 262.Paigen B. et al. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice // *Atherosclerosis*. 1985. Vol. 57, № 1. P. 65–73.
- 263.Daugherty A. et al. Recommendation on Design, Execution, and Reporting of Animal Atherosclerosis Studies: A Scientific Statement From the American Heart Association // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017. Vol. 37, № 9. P. e131–e157.
- 264.Lee Y.T. et al. Mouse models of atherosclerosis: a historical perspective and recent advances // *Lipids Health Dis*. 2017. Vol. 16, № 1. P. 12.
- 265.Van der Donckt C. et al. Elastin fragmentation in atherosclerotic mice leads to intraplaque neovascularization, plaque rupture, myocardial infarction, stroke, and sudden death // *Eur Heart J*. 2015. Vol. 36, № 17. P. 1049–1058.
- 266.Tie C. et al. Ezetimibe Attenuates Atherosclerosis Associated with Lipid Reduction and Inflammation Inhibition // *PLoS One*. 2015. Vol. 10, № 11. P. e0142430.

- 267.Roche-Molina M. et al. Induction of sustained hypercholesterolemia by single adeno-associated virus-mediated gene transfer of mutant hPCSK9 // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015. Vol. 35, № 1. P. 50–59.
- 268.Bjørklund M.M. et al. Induction of atherosclerosis in mice and hamsters without germline genetic engineering // *Circ Res.* 2014. Vol. 114, № 11. P. 1684–1689.
- 269.Perlman R.L. Mouse models of human disease: An evolutionary perspective // *Evol Med Public Health.* 2016. Vol. 2016, № 1. P. 170–176.
- 270.Karbach S. et al. Interleukin 17 drives vascular inflammation, endothelial dysfunction, and arterial hypertension in psoriasis-like skin disease // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014. Vol. 34, № 12. P. 2658–2668.
- 271.Landlinger C. et al. The AT04A vaccine against proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces total cholesterol, vascular inflammation, and atherosclerosis in APOE*3Leiden.CETP mice // *Eur Heart J.* 2017. Vol. 38, № 32. P. 2499–2507.
- 272.Gong D.-M. et al. Endothelial GPR124 Exaggerates the Pathogenesis of Atherosclerosis by Activating Inflammation // *Cell Physiol Biochem.* 2018. Vol. 45, № 2. P. 547–557.
- 273.Brown M.S., Goldstein J.L. A tribute to Akira Endo, discoverer of a “Penicillin” for cholesterol // *Atherosclerosis Supplements.* 2004. Vol. 5, № 3. P. 13–16.
- 274.Ma T. et al. Atg5-independent autophagy regulates mitochondrial clearance and is essential for iPSC reprogramming // *Nat Cell Biol.* 2015. Vol. 17, № 11. P. 1379–1387.
- 275.Gonzalez-Covarrubias V. et al. Lipidomics of familial longevity // *Aging Cell.* 2013. Vol. 12, № 3. P. 426–434.
- 276.Vaarhorst A.A.M. et al. Lipid metabolism in long-lived families: the Leiden Longevity Study // *Age (Dordr).* 2011. Vol. 33, № 2. P. 219–227.
- 277.Srivastava S. Emerging Insights into the Metabolic Alterations in Aging Using Metabolomics // *Metabolites.* 2019. Vol. 9, № 12. P. 301.
- 278.Yang L. et al. A simple and sensitive method for lipoprotein and lipids profiles analysis of individual micro-liter scale serum samples // *Chemistry and Physics of Lipids.* 2012. Vol. 165, № 2. P. 133–141.
- 279.Liu X., Jansman M.M.T., Hosta-Rigau L. Haemoglobin-loaded metal organic framework-based nanoparticles camouflaged with a red blood cell membrane as potential oxygen delivery systems // *Biomater. Sci.* 2020. Vol. 8, № 21. P. 5859–5873.

- 280.Торховская Т.И. et al. Фосфатидилхолин липопротеинов высокой плотности плазмы крови как регулятор обратного транспорта холестерина // Биоорган. химия. 2018. Vol. 44, № 6. P. 608–619.
- 281.Torchovskaya T.I. et al. Dysfunctional High-Density Lipoproteins: Role in Atherogenesis and Potential Targets for Phospholipid Therapy // CARDIO. 2018. Vol. 17, № 3. P. 73–83.
- 282.Kudinov V.A. et al. High-density lipoprotein remodeling by phospholipid nanoparticles improves cholesterol efflux capacity and protects from atherosclerosis // Biomed Pharmacother. 2021. Vol. 141. P. 111900.
- 283.Archakov A. et al. Ultra-small phospholipid nanoparticles in the treatment of combined hyperlipidemia: a randomized placebo-controlled clinical trial // Research in Pharmaceutical Sciences. 2024. Vol. 19, № 6. P. 656–668.
- 284.Leontyev S.G., Yarovaya E.B., Kutsenko V.A., Semenov A.M., Semenov M.P., Ivanov S.V., Romashova Yu.A., Markin S.S. The safety of non-immunogenic recombinant staphylokinase in elderly patients with massive pulmonary embolism in FORPE trial [Электронный ресурс]. В печати.
- 285.Tenchov R, Sasso JM, Wang X, Zhou QA. Antiaging Strategies and Remedies: A Land-scape of Research Progress and Promise // ACS Chem Neurosci. – 2024. – V. 15(3). – P. 408-446.
- 286.Shen C.Y., Jiang J.G, Yang L., Wang D.W., Zhu W. Anti-ageing active ingredients from herbs and nutraceuticals used in traditional Chinese medicine: pharmacological mechanisms and implications for drug discovery // Br J Pharmacol. – 2017. – V. 174(11). – P. 1395-1425.
- 287.Ahmadi A, De Toma I, Vilor-Tejedor N, Eftekhariyan Ghamsari MR, Sadeghi I. Trans-posable elements in brain health and disease // Ageing Res Rev. – 2020. – V. 64. -P.101153.
- 288.St Laurent G 3rd, Hammell N., McCaffrey T.A. A LINE-1 component to human aging: do LINE elements exact a longevity cost for evolutionary advantage? // Mech Ageing Dev. – 2010. – V. 131. – N.5. – P.299-305.
- 289.Richardson S.R, Doucet A.J, Kopera H.C, Moldovan J.B, Garcia-Perez J.L, Moran J.V. The Influence of LINE-1 and SINE Retrotransposons on Mammalian Genomes // Micro-biol Spectr. – 2015. -V. 3. – N. 2. P.MDNA3-2014.

- 290.Dai L., Huang Q., Boeke J. D. Effect of reverse transcriptase inhibitors on LINE-1 and Ty1 reverse transcriptase activities and on LINE-1 retrotransposition // BMC Biochem. 2011. – V. 12. – P. 18.
- 291.Baldwin E. T., van Eeuwen T., Hoyos, et al. Structures, functions and adaptations of the human LINE-1 ORF2 protein // Nature. – 2024. V. 626. – N. 7997. P. 194–206.
292. Ergün S, Buschmann C, Heukeshoven J, et al. Cell type-specific expression of LINE-1 open reading frames 1 and 2 in fetal and adult human tissues // J Biol Chem. – 2004. – V. 279. - N. 26. – P. 27753-27763.
- 293.Toda T., Bedrosian T. A., Schafer S. T., et al. Long interspersed nuclear elements safe-guard neural progenitors from precocious differentiation // Cell reports. – 2024. – V. 43. – N. 2. – P. 113774
- 294.Rodić N, Sharma R, Sharma R, et al. Long interspersed element-1 protein expression is a hallmark of many human cancers // Am J Pathol. – 2014. – V. 184. – N. 5. – P. 1280-1286.
- 295.Ardeljan D, Wang X, Oghbaie M, et al. LINE-1 ORF2p expression is nearly imperceptible in human cancers // Mob DNA – 2019. – N. 11. – P. 1.
- 296.Van Meter M, Kashyap M, Rezazadeh S, et al. SIRT6 represses LINE1 retrotransposons by ribosylating KAP1 but this repression fails with stress and age // Nat Commun. 2014. – V. 5. – P. 5011.
- 297.De Cecco M., Ito T., Petrashen A. P., et al. L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation // Nature. – 2019. – V. – 566. – N. 7742. – P. 73–78.
- 298.Kines K.J., Sokolowski M., deHaro D.L., Christian C.M., Belancio V.P. Potential for ge-nomic instability associated with retrotranspositionally-incompetent L1 loci // Nucleic Ac-ids Res. – 2014. – V. 42. – N. 16. – P. 10488-10502.
- 299.Hancks D.C., Kazazian H.H. Jr. Active human retrotransposons: variation and disease // Curr Opin Genet Dev. – 2012. – V. 22. – N. 3. – P. 191-203.
- 300.Wallace N.A., Belancio V.P., Deininger P.L. L1 mobile element expression causes multiple types of toxicity // Gene – 2008. – V. 419. – N. 1-2. – P. 75-81.

301.Sarafianos S. G. et al. Lamivudine (3TC) resistance in HIV-1 reverse transcriptase involves steric hindrance with beta-branched amino acids // Proc. Natl Acad. Sci. USA – 1999. – V. 96. – P. 10027–10032.

302.Ruiz F., Arnold E. Evolving understanding of HIV-1 reverse transcriptase structure, function, inhibition, and resistance // Curr. Opin. Struct. Biol. – 2020. – V. 61. – P. 113–123.

303.Baldwin E. T. et al. Human endogenous retrovirus-K (HERV-K) reverse transcriptase (RT) structure and biochemistry reveals remarkable similarities to HIV-1 RT and opportunities for HERV-K-specific inhibition // Proc. Natl Acad. Sci. USA – 2022. – V. 119. – P. e2200260119

304.Tishkov V.I., Galkin A.G., Egorov A.M. NAD-dependent formate dehydrogenase of methylotrophic bacteria *Pseudomonas* sp. 101: cloning, expression, and study of the genetic structure. // Dokl. Akad. Nauk SSSR. – 1991. – V. 317. – P.745-748.

305.Christian C. M., Sokolowski M., deHaro D., Kines K. J., Belancio V. P. Involvement of Conserved Amino Acids in the C-Terminal Region of LINE-1 ORF2p in Retrotransposition // Genetics. – 2017. – V. 205. – P. 1139–1149.

306.Adney E. M. et al. Comprehensive Scanning Mutagenesis of Human Retrotransposon LINE-1 Identifies Motifs Essential for Function // Genetics. – 2019. – V. 213. – P. 1401–1414.

307.Weichenrieder O., Repanas K., Perrakis A. Crystal Structure of the Targeting Endonuclease of the Human LINE-1 Retrotransposon // Structure. – 2004. – V. 12. – P. 975–986.

308.Deng P. et al. Structural RNA components supervise the sequential DNA cleavage in R2 retrotransposon // Cell. – 2023. – V. 186. – P. 2865-2879.

309. Christian C. M., deHaro D., Kines K. J., Sokolowski M., Belancio V. P. Identification of L1 ORF2p sequence important to retrotransposition using Bipartite Alu retrotransposition (BAR) // Nucleic Acids Res. – 2016. – V. 44. – P. 4818–4834.

310. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. Санкт-Петербург, Наука. – 2003. – 468 С.

311.Мечников И.И. Этюды о природе человека, Санкт-Петербург, Азбука. – 2016. – С. 157.

- 312.Хохлов А.Н. Размышления геронтолога-пессимиста, или почему мы все еще не живем 1000 лет. Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. – 2021. – Т. 76. – № 4. – С. 266-272.
- 313.Москалев А.А. Потенциальные геропротекторы – из лаборатории в клинику. Биохимия. – 2023. – Т. 88. – № 11. – С. 2101-2108.
- 314.Tenchov R. et al. Aging Hallmarks and Progression and Age-Related Diseases: A Landscape View of Research Advancement // ACS Chem. Neurosci. 2024. Vol. 15, № 1. P. 1–30.
- 315.Rolland Y. et al. Challenges in developing Geroscience trials // Nat Commun. 2023. Vol. 14, № 1. P. 5038.
- 316.Nie C. et al. Distinct biological ages of organs and systems identified from a multi-omics study // Cell Reports. 2022. Vol. 38, № 10. P. 110459.
- 317.Rothermund K., Englert C., Gerstorf D. Explaining Variation in Individual Aging, Its Sources, and Consequences: A Comprehensive Conceptual Model of Human Aging // Gerontology. 2023. Vol. 69, № 12. P. 1437–1447.
- 318.Oh H.S.-H. et al. Organ aging signatures in the plasma proteome track health and disease // Nature. 2023. Vol. 624, № 7990. P. 164–172.
- 319.Anjaneyulu J., Godbole A. Small organism models for mode of action research on anti-ageing and nootropic herbs, foods, and formulations // Nutritional Neuroscience. 2024. P. 1–19.
- 320.Lee M.B., Kaeberlein M. Translational geroscience: From invertebrate models to companion animal and human interventions // Translational Medicine of Aging. 2018. Vol. 2. P. 15–29.
- 321.Информационная система PubMed [Электронный ресурс]. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/> (дата обращения: 29.11.2024).
- 322.База данных Geroprotectors [Электронный ресурс]. URL: <http://www.geroprotectors.org/> (дата обращения: 29.11.2024).
- 323.База данных DrugAge [Электронный ресурс]. URL: <https://genomics.senescence.info/drugs/index.php> (дата обращения: 29.11.2024).
- 324.Aliper A. et al. Towards natural mimetics of metformin and rapamycin // Aging. 2017. Vol. 9, № 11. P. 2245–2268.

- 325.Smer-Barreto V. et al. Discovery of senolytics using machine learning // Nat Commun. 2023. Vol. 14, № 1. P. 3445.
- 326.Wong F. et al. Discovering small-molecule senolytics with deep neural networks // Nat Aging. 2023. Vol. 3, № 6. P. 734–750.
- 327.Nutho B., Tungmunnithum D. Anti-Aging Potential of the Two Major Flavonoids Occurring in Asian Water Lily Using In Vitro and In Silico Molecular Modeling Assessments // Antioxidants. 2024. Vol. 13, № 5. P. 601.
- 328.Hayes C. et al. Coffee Silverskin Phytocompounds as a Novel Anti-Aging Functional Food: A Pharmacoinformatic Approach Combined with In Vitro Study // Molecules. 2023. Vol. 28, № 20. P. 7037.
- 329.Ke H. et al. Study on the anti-skin aging effect and mechanism of Sijunzi Tang based on network pharmacology and experimental validation // Journal of Ethnopharmacology. 2024. Vol. 333. P. 118421.
- 330.Xing J. et al. Integrating network pharmacology and experimental verification to explore the pharmacological mechanisms of asparagus against polycystic ovary syndrome // J Ovarian Res. 2023. Vol. 16, № 1. P. 128.
- 331.Long L. et al. Network Pharmacology and Experimental Validation to Elucidate the Pharmacological Mechanisms of Luteolin Against Chondrocyte Senescence // CCHTS. 2025. Vol. 28, № 2. P. 291–305.
- 332.Zhang Y. et al. Review on ginseng and its potential active substance G-Rg2 against age-related diseases: Traditional efficacy and mechanism // Journal of Ethnopharmacology. 2025. Vol. 337. P. 118781.
- 333.Буров Ю.В., Корольченко Л.В., Поройков В.В. Государственная система регистрации и биологических испытаний химических соединений: возможности для изыскания новых лекарственных препаратов. Бюлл. Всесоюзн. научн. центра по безопасности биологически активных веществ. – 1990. - № 1. С. 4-25.
- 334.Поройков В.В., Филимонов Д.А., Будунова А.П. Сравнение результатов предсказания спектра биологической активности химических соединений компьютерной системой PASS и экспертами. Научно-техническая информация, сер. 2. – 1993. - № 6. – С. 11-13.
- 335.Филимонов Д.А., Поройков В.В., Карайчева Е.И., Казарян Р.К., Будунова А.П., Михайловский Е.М., Рудницких А.В., Гончаренко Л.В., Буров Ю.В.

Компьютерное прогнозирование спектра биологической активности химических соединений по их структурной формуле: система PASS. Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1995. – Т. 58. – № 2. – С. 56-62.

336.Lagunin A. et al. PASS: prediction of activity spectra for biologically active substances // Bioinformatics. 2000. Vol. 16, № 8. P. 747–748.

337.Geronikaki A. et al. Computer-aided prediction for medicinal chemistry via the Internet // SAR QSAR Environ Res. 2008. Vol. 19, № 1–2. P. 27–38.

338.Filimonov D.A. et al. QNA-based ‘Star Track’ QSAR approach // SAR and QSAR in Environmental Research. 2009. Vol. 20, № 7–8. P. 679–709.

339.Lagunin A. et al. QSAR Modelling of Rat Acute Toxicity on the Basis of PASS Prediction // Molecular Informatics. 2011. Vol. 30, № 2–3. P. 241–250.

340.Filimonov D.A. et al. Prediction of the Biological Activity Spectra of Organic Compounds Using the Pass Online Web Resource // Chem Heterocycl Comp. 2014. Vol. 50, № 3. P. 444–457.

341.Zakharov A.V. et al. QSAR Modeling and Prediction of Drug–Drug Interactions // Mol. Pharmaceutics. 2016. Vol. 13, № 2. P. 545–556.

342.Rudik A.V. et al. MetaTox: Web Application for Predicting Structure and Toxicity of Xenobiotics’ Metabolites // J. Chem. Inf. Model. 2017. Vol. 57, № 4. P. 638–642.

343.Poroikov V.V. Computer-aided drug design: from discovery of novel pharmaceutical agents to systems pharmacology // BIOMED KHIM. 2020. Vol. 66, № 1. P. 30–41.

344.Muratov E.N. et al. QSAR without borders // Chem. Soc. Rev. 2020. Vol. 49, № 11. P. 3525–3564.

345.Ivanov S.M. et al. Relationships between the Structure and Severe Drug-Induced Liver Injury for Low, Medium, and High Doses of Drugs // Chem. Res. Toxicol. 2022. Vol. 35, № 3. P. 402–411.

346.Karasev D.A. et al. The method predicting interaction between protein targets and small-molecular ligands with the wide applicability domain // Computational Biology and Chemistry. 2022. Vol. 98. P. 107674.

347.Stolbov L.A., Filimonov D.A., Poroikov V.V. SAR based on self consistent classifier // SAR and QSAR in Environmental Research. 2022. Vol. 33, № 10. P. 793–804.

- 348.Lagunin A.A. et al. CLC-Pred 2.0: A Freely Available Web Application for In Silico Prediction of Human Cell Line Cytotoxicity and Molecular Mechanisms of Action for Druglike Compounds // IJMS. 2023. Vol. 24, № 2. P. 1689.
- 349.Schimunek J. et al. A community effort in SARS-CoV-2 drug discovery // Molecular Informatics. 2024. Vol. 43, № 1. P. e202300262.
- 350.Сухачёв В.С. et al. Оценка эффективности отбора перспективных соединений при виртуальном скрининге с использованием различных «фильтров» // Хим.-фарм. ж. 2024. Vol. 58, № 9. P. 4–12.
- 351.Донцов В.И., Крутько В.Н. Перспективные геропротекторы человека и млекопитающих. Биохимия. – 2017. – Т. 82. - № 12. - С. 1883–1888.
- 352.Morsli S., Bellantuono I. The use of geroprotectors to prevent multimorbidity: Opportunities and challenges // Mechanisms of Ageing and Development. 2021. Vol. 193. P. 111391.
- 353.Ilyushchenko A.K. et al. Senolytic drugs: implications for clinical practice // jour. 2023. № 1. P. 7–14.
- 354.Espinoza S.E. et al. Drugs Targeting Mechanisms of Aging to Delay Age-Related Disease and Promote Healthspan: Proceedings of a National Institute on Aging Workshop // The Journals of Gerontology: Series A / ed. Le Couteur D. 2023. Vol. 78, № Supplement_1. P. 53–60.
- 355.Zhang Z. et al. A new clinical age of aging research // Trends in Endocrinology & Metabolism. 2024. P. S1043276024002236.
- 356.Rad A.N., Grillari J. Current senolytics: Mode of action, efficacy and limitations, and their future // Mechanisms of Ageing and Development. 2024. Vol. 217. P. 111888.
- 357.Yusri K. et al. Towards Healthy Longevity: Comprehensive Insights from Molecular Targets and Biomarkers to Biological Clocks // IJMS. 2024. Vol. 25, № 12. P. 6793.
- 358.Bramwell L.R., Frankum R., Harries L.W. Repurposing Drugs for Senotherapeutic Effect: Potential Senomorphic Effects of Female Synthetic Hormones // Cells. 2024. Vol. 13, № 6. P. 517.

- 359.Kang S.M., Park J.H. Pleiotropic Benefits of DPP-4 Inhibitors Beyond Glycemic Control // Clin Med Insights Endocrinol Diabetes. 2021. Vol. 14. P. 11795514211051698.
- 360.Khajebishak Y. et al. The effects of vitamins and dietary pattern on epigenetic modification of non-communicable diseases // Int J Vitam Nutr Res. 2023. Vol. 93, № 4. P. 362–377.
- 361.Blagosklonny M.V. Anti-aging: senolytics or gerostatics (unconventional view) // Oncotarget. 2021. Vol. 12, № 18. P. 1821–1835.
- 362.Song Q. et al. The Safety and Antiaging Effects of Nicotinamide Mononucleotide in Human Clinical Trials: an Update // Advances in Nutrition. 2023. Vol. 14, № 6. P. 1416–1435.
- 363.Dudinskaya E.N. et al. Antihypertensive therapy: controlling the processes of replicative cell senescence // Russ J Cardiol. 2020. Vol. 25. P. 3974.
- 364.Zhou D.-D. et al. Effects and Mechanisms of Resveratrol on Aging and Age-Related Diseases // Oxidative Medicine and Cellular Longevity / ed. Teodoro A.J. 2021. Vol. 2021, № 1. P. 9932218.
- 365.Wirth A. et al. Novel aspects of age-protection by spermidine supplementation are associated with preserved telomere length // GeroScience. 2021. Vol. 43, № 2. P. 673–690.
- 366.Santín-Márquez R. et al. Sulforaphane - role in aging and neurodegeneration // GeroScience. 2019. Vol. 41, № 5. P. 655–670.
- 367.Lujan C. et al. An expedited screening platform for the discovery of anti-ageing compounds in vitro and in vivo // Genome Med. 2024. Vol. 16, № 1. P. 85.
- 368.Kuerec A.H. et al. Targeting aging with urolithin A in humans: A systematic review // Ageing Research Reviews. 2024. Vol. 100. P. 102406.
- 369.Tavenier J. et al. Fisetin as a senotherapeutic agent: Evidence and perspectives for age-related diseases // Mechanisms of Ageing and Development. 2024. Vol. 222. P. 111995.
- 370.Moskalev A. et al. Geroprotectors.org: a new, structured and curated database of current therapeutic interventions in aging and age-related disease // Aging. 2015. Vol. 7, № 9. P. 616–628.

- 371.Barardo D. et al. The DrugAge database of aging-related drugs // *Aging Cell*. 2017. Vol. 16, № 3. P. 594–597.
- 372.Fourches D., Muratov E., Tropsha A. Trust, but Verify II: A Practical Guide to Chemogenomics Data Curation // *J. Chem. Inf. Model*. 2016. Vol. 56, № 7. P. 1243–1252.
- 373.Moskalev A.A. Potential geroprotectors - from the bench to the clinic // *Biohimia*. 2023. Vol. 88, № 11. P. 2101–2108.
- 374.Ivanov S.M. et al. Proteomic Analysis Identifies Multiple Mechanisms of 5-Fluorouracil-Induced Gut Mucositis in Mice // *Cancers*. 2024. Vol. 16, № 23. P. 4025.
- 375.Li J., Smith L.S., Zhu H.-J. Data-independent acquisition (DIA): An emerging proteomics technology for analysis of drug-metabolizing enzymes and transporters // *Drug Discov Today Technol*. 2021. Vol. 39. P. 49–56.
- 376.Demichev V. et al. DIA-NN: neural networks and interference correction enable deep proteome coverage in high throughput // *Nat Methods*. 2020. Vol. 17, № 1. P. 41–44.
- 377.Prattichizzo F. et al. Organ-specific biological clocks: Ageotyping for personalized anti-aging medicine // *Ageing Res Rev*. 2024. Vol. 96. P. 102253.
- 378.Sun E.D. et al. Predicting physiological aging rates from a range of quantitative traits using machine learning // *Aging (Albany NY)*. 2021. Vol. 13, № 20. P. 23471–23516.
- 379.Shen X. et al. Nonlinear dynamics of multi-omics profiles during human aging // *Nat Aging*. 2024. Vol. 4, № 11. P. 1619–1634.
- 380.Li J. et al. Determining a multimodal aging clock in a cohort of Chinese women // *Med*. 2023. Vol. 4, № 11. P. 825-848.e13.
- 381.Fedintsev A., Moskalev A. Stochastic non-enzymatic modification of long-lived macromolecules - A missing hallmark of aging // *Ageing Res Rev*. 2020. Vol. 62. P. 101097.
- 382.Solovev I. et al. Aging and physiological barriers: mechanisms of barrier integrity changes and implications for age-related diseases // *Mol Biol Rep*. 2024. Vol. 51, № 1. P. 917.
- 383.Jansen R. et al. An integrative study of five biological clocks in somatic and mental health // *Elife*. 2021. Vol. 10. P. e59479.
- 384.Zhang H. et al. Mass spectrometric detection of tissue proteins in plasma // *Mol Cell Proteomics*. 2007. Vol. 6, № 1. P. 64–71.

- 385.Kliuchnikova A.A. et al. Blood Plasma Proteome: A Meta-Analysis of the Results of Protein Quantification in Human Blood by Targeted Mass Spectrometry // *Int J Mol Sci*. 2023. Vol. 24, № 1. P. 769.
- 386.Thul P.J., Lindskog C. The human protein atlas: A spatial map of the human proteome // *Protein Sci*. 2018. Vol. 27, № 1. P. 233–244.
- 387.Moqri M. et al. Biomarkers of aging for the identification and evaluation of longevity interventions // *Cell*. 2023. Vol. 186, № 18. P. 3758–3775.
- 388.Motschall E., Falck-Ytter Y. Searching the MEDLINE literature database through PubMed: a short guide // *Onkologie*. 2005. Vol. 28, № 10. P. 517–522.
- 389.Deutsch E.W. et al. The ProteomeXchange consortium at 10 years: 2023 update // *Nucleic Acids Res*. 2023. Vol. 51, № D1. P. D1539–D1548.
- 390.Kusebauch U. et al. Human SRMAAtlas: A Resource of Targeted Assays to Quantify the Complete Human Proteome // *Cell*. 2016. Vol. 166, № 3. P. 766–778.
- 391.Kanehisa M., Sato Y., Kawashima M. KEGG mapping tools for uncovering hidden features in biological data // *Protein Sci*. 2022. Vol. 31, № 1. P. 47–53.
- 392.Ashburner M. et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium // *Nat Genet*. 2000. Vol. 25, № 1. P. 25–29.
- 393.Omenn G.S. et al. Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database // *Proteomics*. 2005. Vol. 5, № 13. P. 3226–3245.
- 394.Petrak J. et al. Déjà vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins // *Proteomics*. 2008. Vol. 8, № 9. P. 1744–1749.
- 395.Anderson N.L. The clinical plasma proteome: a survey of clinical assays for proteins in plasma and serum // *Clin Chem*. 2010. Vol. 56, № 2. P. 177–185.
- 396.Kuh D. et al. A life-course approach to healthy ageing: maintaining physical capability // *Proc Nutr Soc*. 2014. Vol. 73, № 2. P. 237–248.
- 397.Wang H. et al. Methods and clinical biomarker discovery for targeted proteomics using Olink technology // *Proteomics Clin Appl*. 2024. Vol. 18, № 5. P. e2300233.
- 398.Gold L. et al. Aptamer-based multiplexed proteomic technology for biomarker discovery // *PLoS One*. 2010. Vol. 5, № 12. P. e15004.

- 399.Kalyakulina A. et al. Small immunological clocks identified by deep learning and gradient boosting // *Front Immunol.* 2023. Vol. 14. P. 1177611.
- 400.Yusipov I. et al. Accelerated epigenetic aging and inflammatory/immunological profile (ipAGE) in patients with chronic kidney disease // *Geroscience.* 2022. Vol. 44, № 2. P. 817–834.
- 401.Conte M. et al. Human Aging and Longevity Are Characterized by High Levels of Mitokines // *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2019. Vol. 74, № 5. P. 600–607.
- 402.Hanks L.J. et al. Circulating levels of fibroblast growth factor-21 increase with age independently of body composition indices among healthy individuals // *J Clin Transl Endocrinol.* 2015. Vol. 2, № 2. P. 77–82.
- 403.Villarroya J. et al. Aging is associated with increased FGF21 levels but unaltered FGF21 responsiveness in adipose tissue // *Aging Cell.* 2018. Vol. 17, № 5. P. e12822.
- 404.Gao W. et al. FGF-21 biomarker detection at the sub-nanogram per mL level in human serum using normal-flow liquid chromatography/tandem mass spectrometry // *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2020. Vol. 34, № 14. P. e8817.
- 405.Li H. et al. Pleiotrophin ameliorates age-induced adult hippocampal neurogenesis decline and cognitive dysfunction // *Cell Rep.* 2023. Vol. 42, № 9. P. 113022.
- 406.Hugosson F. et al. The Drosophila midkine/pleiotrophin homologues Miple1 and Miple2 affect adult lifespan but are dispensable for alk signaling during embryonic gut formation // *PLoS One.* 2014. Vol. 9, № 11. P. e112250.
- 407.Lee J.-T. et al. Macrophage metalloelastase (MMP12) regulates adipose tissue expansion, insulin sensitivity, and expression of inducible nitric oxide synthase // *Endocrinology.* 2014. Vol. 155, № 9. P. 3409–3420.
- 408.Traylor M. et al. A novel MMP12 locus is associated with large artery atherosclerotic stroke using a genome-wide age-at-onset informed approach // *PLoS Genet.* 2014. Vol. 10, № 7. P. e1004469.
- 409.Krim S.R., Vivo R.P., de Lemos J.A. B-type natriuretic peptides in acute coronary syndromes: implications in an aging population // *Clin Cardiol.* 2012. Vol. 35, № 11. P. 682–685.
- 410.Gassanov N. et al. Natriuretic peptides in therapy for decompensated heart failure // *Eur J Clin Pharmacol.* 2012. Vol. 68, № 3. P. 223–230.

- 411.Fried L.P. et al. Untangling the concepts of disability, frailty, and comorbidity: implications for improved targeting and care // J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2004. Vol. 59, № 3. P. 255–263.
- 412.Li J. et al. TNF Receptor-Associated Factor 6 Mediates TNF α -Induced Skeletal Muscle Atrophy in Mice During Aging // J Bone Miner Res. 2020. Vol. 35, № 8. P. 1535–1548.
- 413.Takahashi S. et al. Fas deficiency in mice with the Balb/c background induces blepharitis with allergic inflammation and hyper-IgE production in conjunction with severe autoimmune disease // Int Immunol. 2013. Vol. 25, № 5. P. 287–293.
- 414.Hong S.W., Kang J.-H. Growth differentiation factor-15 as a modulator of bone and muscle metabolism // Front Endocrinol (Lausanne). 2022. Vol. 13. P. 948176.
- 415.Wang X. et al. hNAG-1 increases lifespan by regulating energy metabolism and insulin/IGF-1/mTOR signaling // Aging (Albany NY). 2014. Vol. 6, № 8. P. 690–704.
- 416.Vavilov N. et al. Number of Detected Proteins as the Function of the Sensitivity of Proteomic Technology in Human Liver Cells // Curr Protein Pept Sci. 2022. Vol. 23, № 4. P. 290–298.
- 417.Ji X. et al. High blood galectin-3 level associated with risk of frailty in aging // Front Endocrinol (Lausanne). 2023. Vol. 14. P. 1189192.
- 418.Fraser H.C. et al. Biological mechanisms of aging predict age-related disease co-occurrence in patients // Aging Cell. 2022. Vol. 21, № 4. P. e13524.
- 419.Zgoda V.G. et al. Chromosome 18 transcriptome profiling and targeted proteome mapping in depleted plasma, liver tissue and HepG2 cells // J Proteome Res. 2013. Vol. 12, № 1. P. 123–134.
- 420.Kopylov A.T. 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 // Journal of Proteome Research. 2019. Vol. 18, № 1. 120–129 p.
- 421.Wishart D.S. et al. HMDB 5.0: the Human Metabolome Database for 2022 // Nucleic Acids Res. 2022. Vol. 50, № D1. P. D622–D631.
- 422.Brunk E. et al. Recon3D enables a three-dimensional view of gene variation in human metabolism // Nat Biotechnol. 2018. Vol. 36, № 3. P. 272–281.

- 423.Panyard D.J., Yu B., Snyder M.P. The metabolomics of human aging: Advances, challenges, and opportunities // *Sci Adv.* 2022. Vol. 8, № 42. P. eadd6155.
- 424.Garcia-Segura M.E. et al. Pathway-based integration of multi-omics data reveals lipidomics alterations validated in an Alzheimer's disease mouse model and risk loci carriers // *J Neurochem.* 2023. Vol. 164, № 1. P. 57–76.
- 425.Baloni P. et al. Multi-Omic analyses characterize the ceramide/sphingomyelin pathway as a therapeutic target in Alzheimer's disease // *Commun Biol.* 2022. Vol. 5, № 1. P. 1074.
- 426.Gómez-Pascual A. et al. Paired plasma lipidomics and proteomics analysis in the conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease // *Comput Biol Med.* 2024. Vol. 176. P. 108588.
- 427.Cohn W. et al. Multi-Omics Analysis of Microglial Extracellular Vesicles From Human Alzheimer's Disease Brain Tissue Reveals Disease-Associated Signatures // *Front Pharmacol.* 2021. Vol. 12. P. 766082.
- 428.Yi B. et al. Serum metabolomics analyses reveal biomarkers of osteoporosis and the mechanism of Quanduzhong capsules // *J Pharm Biomed Anal.* 2024. Vol. 246. P. 116198.
- 429.Lau K.-T. et al. Metabolomics of Osteoporosis in Humans: A Systematic Review // *Curr Osteoporos Rep.* 2023. Vol. 21, № 3. P. 278–288.
- 430.Neves L.S. et al. Metabolomics and Cardiovascular Risk in Patients with Heart Failure: A Systematic Review and Meta-Analysis // *Int J Mol Sci.* 2024. Vol. 25, № 11. P. 5693.
- 431.Cao J. et al. Spatial Metabolomics Identifies LPC(18:0) and LPA(18:1) in Advanced Atheroma With Translation to Plasma for Cardiovascular Risk Estimation // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2024. Vol. 44, № 3. P. 741–754.
- 432.Muller Bark J. et al. A pilot study: Metabolic profiling of plasma and saliva samples from newly diagnosed glioblastoma patients // *Cancer Med.* 2023. Vol. 12, № 10. P. 11427–11437.
- 433.Ferrasi A.C. et al. Metabolomics Approach Reveals Important Glioblastoma Plasma Biomarkers for Tumor Biology // *Int J Mol Sci.* 2023. Vol. 24, № 10. P. 8813.
- 434.Yu M. et al. Plasma metabolomics reveals risk factors for lung adenocarcinoma // *Front Oncol.* 2024. Vol. 14. P. 1277206.

- 435.Razavi S.A. et al. Plasma metabolites analysis of patients with papillary thyroid cancer: A preliminary untargeted ¹H NMR-based metabolomics // *J Pharm Biomed Anal.* 2024. Vol. 241. P. 115946.
- 436.Carmona A. et al. Lipidomics and metabolomics as potential biomarkers for breast cancer progression // *npj Metab Health Dis.* 2024. Vol. 2, № 1. P. 24.
- 437.Vidman L. et al. Untargeted plasma metabolomics and risk of colorectal cancer-an analysis nested within a large-scale prospective cohort // *Cancer Metab.* 2023. Vol. 11, № 1. P. 17.
- 438.Bucaciuc Mracica T. et al. MetaboAge DB: a repository of known ageing-related changes in the human metabolome // *Biogerontology.* 2020. Vol. 21, № 6. P. 763–771.
- 439.Li H. et al. HALL: a comprehensive database for human aging and longevity studies // *Nucleic Acids Res.* 2024. Vol. 52, № D1. P. D909–D918.
- 440.Aging Atlas Consortium. Aging Atlas: a multi-omics database for aging biology // *Nucleic Acids Res.* 2021. Vol. 49, № D1. P. D825–D830.
- 441.Huang K. et al. AgeAnnoMO: a knowledgebase of multi-omics annotation for animal aging // *Nucleic Acids Research.* 2024. Vol. 52, № D1. P. D822–D834.
- 442.Dalsgaard P.W., Mollerup C.B., Pasin D. Multi-library synchronization for suspect screening using LC-HRMS: The importance of InChIkeys // *Toxicologie Analytique et Clinique.* 2022. Vol. 34, № 3. P. S105.
- 443.Yadav P. et al. Therapeutic potential of stem cells in regeneration of liver in chronic liver diseases: Current perspectives and future challenges // *Pharmacol Ther.* 2024. Vol. 253. P. 108563.
- 444.Mohebichamkhorami F. et al. Therapeutic Potential of Oral-Derived Mesenchymal Stem Cells in Retinal Repair // *Stem Cell Rev Rep.* 2023. Vol. 19, № 8. P. 2709–2723.
- 445.Nejabati H.R., Nikzad S., Roshangar L. Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells in PCOS // *Curr Stem Cell Res Ther.* 2024. Vol. 19, № 2. P. 134–144.
- 446.Zaripova L.N. et al. Mesenchymal Stem Cells in the Pathogenesis and Therapy of Autoimmune and Autoinflammatory Diseases // *Int J Mol Sci.* 2023. Vol. 24, № 22. P. 16040.

447. Yang Q. et al. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Promote Anti-Inflammation and Angiogenesis by Targeting Macrophages in a Rat Uterine Scar Model // *Stem Cell Rev Rep*. 2024.
448. Tolstova T. et al. The effect of TLR3 priming conditions on MSC immunosuppressive properties // *Stem Cell Res Ther*. 2023. Vol. 14, № 1. P. 344.
449. Kråkenes T. et al. The neuroprotective potential of mesenchymal stem cells from bone marrow and human exfoliated deciduous teeth in a murine model of demyelination // *PLoS One*. 2023. Vol. 18, № 11. P. e0293908.
450. Babaei H. et al. Dose-dependent neuroprotective effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on amyloid β -induced Alzheimer's disease in rats // *Biochem Biophys Res Commun*. 2023. Vol. 678. P. 62–67.
451. Kabat M. et al. Trends in mesenchymal stem cell clinical trials 2004-2018: Is efficacy optimal in a narrow dose range? // *Stem Cells Transl Med*. 2019. Vol. 9, № 1. P. 17–27.
452. Gao Y. et al. Multi-omics analysis of human mesenchymal stem cells shows cell aging that alters immunomodulatory activity through the downregulation of PD-L1 // *Nat Commun*. 2023. Vol. 14, № 1. P. 4373.
453. Basisty N. et al. A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development // *PLoS Biol*. 2020. Vol. 18, № 1. P. e3000599.
454. Shmulevich R., Krizhanovsky V. Cell Senescence, DNA Damage, and Metabolism // *Antioxid Redox Signal*. 2021. Vol. 34, № 4. P. 324–334.
455. Miwa S. et al. Mitochondrial dysfunction in cell senescence and aging // *J Clin Invest*. 2022. Vol. 132, № 13. P. e158447.
456. Kapetanios K. et al. Chronological Age Affects MSC Senescence In Vitro-A Systematic Review // *Int J Mol Sci*. 2021. Vol. 22, № 15. P. 7945.
457. Siennicka K. et al. Comparison of the Donor Age-Dependent and In Vitro Culture-Dependent Mesenchymal Stem Cell Aging in Rat Model // *Stem Cells Int*. 2021. Vol. 2021. P. 6665358.
458. Shay J.W., Wright W.E. Hayflick, his limit, and cellular ageing // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000. Vol. 1, № 1. P. 72–76.
459. Davalli P. et al. ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases // *Oxid Med Cell Longev*. 2016. Vol. 2016. P. 3565127.

- 460.Nir D. et al. Antioxidants Attenuate Heat Shock Induced Premature Senescence of Bovine Mesenchymal Stem Cells // *Int J Mol Sci*. 2022. Vol. 23, № 10. P. 5750.
- 461.Sherman M. Major heat shock protein Hsp72 controls oncogene-induced senescence // *Ann N Y Acad Sci*. 2010. Vol. 1197. P. 152–157.
- 462.Zhu H. et al. Oncogene-induced senescence: From biology to therapy // *Mech Ageing Dev*. 2020. Vol. 187. P. 111229.
- 463.Dierick J.-F. et al. Stress-induced premature senescence and replicative senescence are different phenotypes, proteomic evidence // *Biochemical Pharmacology*. 2002. Vol. 64, № 5. P. 1011–1017.
- 464.Chinnadurai R. et al. Immune dysfunctionality of replicative senescent mesenchymal stromal cells is corrected by IFN γ priming // *Blood Adv*. 2017. Vol. 1, № 11. P. 628–643.
- 465.Budgude P., Kale V., Vaidya A. Pharmacological Inhibition of p38 MAPK Rejuvenates Bone Marrow Derived-Mesenchymal Stromal Cells and Boosts their Hematopoietic Stem Cell-Supportive Ability // *Stem Cell Rev Rep*. 2021. Vol. 17, № 6. P. 2210–2222.
- 466.Barnes R.P., Fouquerel E., Opresko P.L. The impact of oxidative DNA damage and stress on telomere homeostasis // *Mech Ageing Dev*. 2019. Vol. 177. P. 37–45.
- 467.Zhao H. et al. The dynamic changes of Nrf2 mediated oxidative stress, DNA damage and base excision repair in testis of rats during aging // *Exp Gerontol*. 2021. Vol. 152. P. 111460.
- 468.Wang Z., Wei D., Xiao H. Methods of cellular senescence induction using oxidative stress // *Methods Mol Biol*. 2013. Vol. 1048. P. 135–144.
- 469.Dominici M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytherapy*. 2006. Vol. 8, № 4. P. 315–317.
- 470.Di Micco R. et al. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021. Vol. 22, № 2. P. 75–95.
- 471.Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress // *Redox Biol*. 2017. Vol. 11. P. 613–619.

- 472.Li B. et al. Hypoxia-Induced Mesenchymal Stromal Cells Exhibit an Enhanced Therapeutic Effect on Radiation-Induced Lung Injury in Mice due to an Increased Proliferation Potential and Enhanced Antioxidant Ability // *Cell Physiol Biochem*. 2017. Vol. 44, № 4. P. 1295–1310.
- 473.Zhang W. et al. Hypoxia-pretreated human MSCs attenuate acute kidney injury through enhanced angiogenic and antioxidative capacities // *Biomed Res Int*. 2014. Vol. 2014. P. 462472.
- 474.Wuchter P., Diehlmann A., Klüter H. Closer to Nature: The Role of MSCs in Recreating the Microenvironment of the Hematopoietic Stem Cell Niche in vitro // *Transfus Med Hemother*. 2022. Vol. 49, № 4. P. 258–267.
- 475.Mohyeldin A., Garzón-Muvdi T., Quiñones-Hinojosa A. Oxygen in Stem Cell Biology: A Critical Component of the Stem Cell Niche // *Cell Stem Cell*. 2010. Vol. 7, № 2. P. 150–161.
- 476.Bigot N. et al. Hypoxia Differentially Modulates the Genomic Stability of Clinical-Grade ADSCs and BM-MSCs in Long-Term Culture // *Stem Cells*. 2015. Vol. 33, № 12. P. 3608–3620.
- 477.Mai L. et al. Proteomic Analysis of Hypoxia-Induced Senescence of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells // *Stem Cells Int*. 2021. Vol. 2021. P. 5555590.
- 478.Lee C.-W. et al. Improvement of Cell Cycle Lifespan and Genetic Damage Susceptibility of Human Mesenchymal Stem Cells by Hypoxic Priming // *Int J Stem Cells*. 2018. Vol. 11, № 1. P. 61–67.
- 479.Li C. et al. A New Approach for On-Demand Generation of Various Oxygen Tensions for In Vitro Hypoxia Models // *PLoS One*. 2016. Vol. 11, № 5. P. e0155921.
- 480.Place T.L., Domann F.E., Case A.J. Limitations of oxygen delivery to cells in culture: An underappreciated problem in basic and translational research // *Free Radic Biol Med*. 2017. Vol. 113. P. 311–322.
- 481.Dzhalilova D.S., Makarova O.V. The Role of Hypoxia-Inducible Factor in the Mechanisms of Aging // *Biochemistry (Mosc)*. 2022. Vol. 87, № 9. P. 995–1014.
- 482.Colombani T. et al. HIF-stabilizing biomaterials: from hypoxia-mimicking to hypoxia-inducing // *Mater Adv*. Vol. 4, № 15. P. 3084–3090.

- 483.Triantafyllou A. et al. Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) in HeLa cells by an iron-independent, but ROS-, PI-3K- and MAPK-dependent mechanism // *Free Radic Res.* 2006. Vol. 40, № 8. P. 847–856.
- 484.Nowak-Stepniowska A. et al. Insight in Hypoxia-Mimetic Agents as Potential Tools for Mesenchymal Stem Cell Priming in Regenerative Medicine // *Stem Cells International.* 2022. Vol. 2022, № 1. P. 8775591.
- 485.Hsu K.-F. et al. Hypoxia and hypoxia mimetics differentially modulate histone post-translational modifications // *Epigenetics.* 2021. Vol. 16, № 1. P. 14–27.
- 486.Fujisawa K. et al. Analysis of Metabolomic Changes in Mesenchymal Stem Cells on Treatment with Desferrioxamine as a Hypoxia Mimetic Compared with Hypoxic Conditions // *Stem Cells.* 2018. Vol. 36, № 8. P. 1226–1236.
- 487.Borcar A. et al. Metabolic preconditioning of mammalian cells: mimetic agents for hypoxia lack fidelity in promoting phosphorylation of pyruvate dehydrogenase // *Cell Tissue Res.* 2013. Vol. 351, № 1. P. 99–106.
- 488.Gao X.-X. et al. The biological effect of cobalt chloride mimetic-hypoxia on nucleus pulposus cells and the comparability with physical hypoxia in vitro // *Front Biosci (Landmark Ed).* 2021. Vol. 26, № 10. P. 799–812.
- 489.Shatrova A.N. et al. Outcomes of Deferoxamine Action on H2O2-Induced Growth Inhibition and Senescence Progression of Human Endometrial Stem Cells // *Int J Mol Sci.* 2021. Vol. 22, № 11. P. 6035.
- 490.Khoshlahni N. et al. Iron depletion with deferoxamine protects bone marrow-derived mesenchymal stem cells against oxidative stress-induced apoptosis // *Cell Stress Chaperones.* 2020. Vol. 25, № 6. P. 1059–1069.
- 491.Zhang Y.-B. et al. The Effects of CoCl₂ on HIF-1 α Protein under Experimental Conditions of Autoprogressive Hypoxia Using Mouse Models // *Int J Mol Sci.* 2014. Vol. 15, № 6. P. 10999–11012.
- 492.Advances in Hypoxia-Inducible Factor-1 α Stabilizer Deferoxamine in Tissue Engineering - PubMed [Electronic resource]. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36475887/> (accessed: 03.07.2024).
- 493.Weng Z. et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cell Senescence: Hallmarks, Mechanisms, and Combating Strategies // *Stem Cells Translational Medicine.* 2022. Vol. 11, № 4. P. 356.

494. Yang Y.-H.K. et al. Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro // *Stem Cell Res Ther.* 2018. Vol. 9, № 1. P. 131.
495. Valieva Y. et al. Senescence-Associated β -Galactosidase Detection in Pathology // *Diagnostics.* 2022. Vol. 12, № 10. P. 2309.
496. Debacq-Chainiaux F. et al. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo // *Nat Protoc.* 2009. Vol. 4, № 12. P. 1798–1806.
497. Lee B.Y. et al. Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase // *Aging Cell.* 2006. Vol. 5, № 2. P. 187–195.
498. Guerrero-Navarro L., Jansen-Dürr P., Cavinato M. Age-Related Lysosomal Dysfunctions // *Cells.* 2022. Vol. 11, № 12. P. 1977.
499. Zhang W. et al. Role of Lysosomal Acidification Dysfunction in Mesenchymal Stem Cell Senescence // *Front. Cell Dev. Biol.* 2022. Vol. 10. P. 817877.
500. Li Y. et al. Senescence of mesenchymal stem cells (Review) // *Int J Mol Med.* 2017. Vol. 39, № 4. P. 775–782.
501. Al-Azab M. et al. Aging of mesenchymal stem cell: machinery, markers, and strategies of fighting // *Cell Mol Biol Lett.* 2022. Vol. 27. P. 69.
502. Noh M.Y. et al. Mesenchymal Stem Cells Modulate the Functional Properties of Microglia via TGF- β Secretion // *Stem Cells Transl Med.* 2016. Vol. 5, № 11. P. 1538–1549.
503. Naaldijk Y. et al. Effect of systemic transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on neuropathology markers in APP/PS1 Alzheimer mice // *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2017. Vol. 43, № 4. P. 299–314.
504. Liu Y. et al. Mesenchymal stem cells enhance microglia M2 polarization and attenuate neuroinflammation through TSG-6 // *Brain Res.* 2019. Vol. 1724. P. 146422.
505. Orecchioni M. et al. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS–) vs. Alternatively Activated Macrophages // *Front. Immunol. Frontiers,* 2019. Vol. 10.
506. Jayasingam S.D. et al. Evaluating the Polarization of Tumor-Associated Macrophages Into M1 and M2 Phenotypes in Human Cancer Tissue: Technicalities and Challenges in Routine Clinical Practice // *Front. Oncol. Frontiers,* 2020. Vol. 9.

507.Campos H.C. et al. Distinct Effects of the Hippocampal Transplantation of Neural and Mesenchymal Stem Cells in a Transgenic Model of Alzheimer's Disease // Stem Cell Rev Rep. 2022. Vol. 18, № 2. P. 781–791.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

СОГЛАСОВАНО

Руководитель работ,
академик Арчаков А.И.



«28» января 2025 г.

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБМХ
Пономаренко Е.А.



«30» января 2025 г.

М.П.

ПРОТОКОЛ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЕДИНИЧНОЙ МОЛЕКУЛЫ ФЕРМЕНТА ПО АСМ-ДАНЫМ ДЛЯ СЛУЧАЯ МОДЕЛЬНОГО ОБЪЕКТА

Содержание

1. Назначение протокола
2. Область применения
3. Нормативные ссылки
4. Условия выполнения измерений
5. Методы измерений
6. Допускаемая неопределенность измерений или норма погрешности
7. Применяемые средства измерений, стандартные образцы, их метрологические характеристики и сведения об утверждении их типов
8. Операции при подготовке к выполнению измерений
9. Операции при выполнении измерений
10. Операции обработки результатов измерений
11. Требования к оформлению результатов измерений
12. Процедуры и периодичность контроля точности получаемых результатов измерений
13. Требования к квалификации операторов

1. Назначение протокола

Протокол оценки функциональной активности единичной молекулы фермента по АСМ-данным предназначен для наблюдения за изменениями свойств сорбированного фермента в процессе каталитического цикла. Измеряемым основным параметром является высота молекулы, определенная по данным АСМ-визуализации на всех стадиях функционального цикла

2. Область применения

Настоящий документ устанавливает процедуру проведения измерений и обработки данных с возможностью определения характеристик биомакромолекул, сорбированных на поверхности в виде отдельных объектов. Размер целевых молекул не может быть менее 1 нм, что в 10 раз превышает неровность поверхности 0,1 нм.

3. Нормативные ссылки

В настоящем документе использованы нормативные ссылки на следующие документы:

ГОСТ Р 12.0.001-2013. Система стандартов безопасности труда. Основные положения

Правила устройства электроустановок. - М.: Госторгиздат, 2015. - 144 с.

СанПиН 2.1.3684-21. Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий

СП 2.2.3670-20. Санитарно-эпидемиологические требования к условиям труда

ГОСТ 12.4.009-83. Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ Р 59641-2021. Средства противопожарной защиты зданий и сооружений. Средства первичные пожаротушения. Руководство по размещению, техническому обслуживанию и ремонту. Методы испытаний на работоспособность

ГОСТ 12.4.026-2015. Система стандартов безопасности труда. Цвета сигнальные,

знаки безопасности и разметка сигнальная. Назначение и правила применения. Общие технические требования и характеристики. Методы испытаний
ГОСТ Р ИСО 14644-1-2017. Национальный стандарт Российской Федерации. Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды
ГОСТ Р 58144-2018. Национальный стандарт Российской Федерации. Вода дистиллированная. Технические условия

4. Условия выполнения измерений

Лабораторный персонал должен быть в спецодежде, предохраняющей от загрязнений анализируемых образцов биоматериала тканями кожи и волос.

Проведение измерений должно проводиться в чистой комнате с организацией ламинарной вентиляции воздуха чистоты не ниже класса 5 ИСО по ГОСТ Р ИСО 14644-1-2017 в следующих условиях:

- температура окружающей среды.....(25 ± 5) 0С;
- относительная влажность воздуха не более 80%;
- атмосферное давление.....($84,0 - 106,7$ кПа) (630-800 мм рт.ст.);
- напряжение питания в сети.....(220 ± 10) В;
- освещение помещения – естественное или искусственное, не ограничивается

особыми требованиями.

Остальные условия должны соответствовать требованиям, указанным в паспорте (формуляре) на используемые средства измерений. Для контроля состояния окружающей среды и иных условий проведения измерений должны применяться средства измерений с относительными погрешностями не более 30% значений допусков к параметрам, установленным в настоящем разделе.

5. Методы измерений

Для регистрации изменений свойств сорбированного фермента в процессе каталитического цикла использован метод атомно-силовой микроскопии (АСМ). Работа осуществляется в полуконтактном режиме. В результате проведения измерений будут получены изображения топографии поверхности, содержащей отдельные молекулы белка. В качестве параметра определения используются величины высот визуализированных объектов и их площади.

Для определения олигомерного состояния сорбированных на АСМ-подложке ферментов проводится расчет в виде графика функции распределения визуализированных объектов по высотам $\rho(h)$. Для определения флуктуации высот проводится расчет стандартного отклонения величин, полученных после обработки АСМ-данных при помощи разработанного алгоритма.

Для проведения измерений по данной методике необходимо содержание основного белка в пробе 0,1 мкМ.

6. Допускаемая неопределенность измерений или норма погрешности

Точность позиционирования зонда:

- по осям XY - не хуже $\pm 0,2$ нм
- по оси Z - не хуже $\pm 0,1$ нм

7. Применяемые средства измерений, стандартные образцы, их метрологические характеристики и сведения об утверждении их типов

7.1 Средства измерений:

- Сканирующий атомно-силовой микроскоп Dimension FastScanTM (Bruker, США) с контроллером NanoScope V;
- программное обеспечение для регистрации изображений NanoScope 9.4 (Bruker, США) с функцией позиционирования зонда над заданным участком поверхности и удерживание зонда над участком не менее 60 минут (функция NanoTrackTM или аналогичная);
- жидкостная ячейка, совместимая со сканирующей головой FastScanTM с поводящими силиконовыми трубками и соответствующими шприцами для подачи растворов.

7.2 Вспомогательное оборудование:

Пробоподготовка:

- устройство для перемешивания пробирок объемом 1,5-2 мл (лабораторный шейкер, минимальная скорость – 300 об/мин);
- лабораторная центрифуга для пробирок объемом 1,5-2 мл;
- система для деионизации воды (удельное сопротивление 18,2 МОм×см);
- лабораторный аквадистиллятор (минимальный объем 4л);

- автоматические пипетки 0,1-10 мкл и 2-200 мкл.

7.3 Реактивы и расходные материалы:

- подложки слюды, толщина 0,15мм (0.006"), размер не менее 15мм*15мм;
- кремниевые зонды для атомно-силового микроскопа (характерная жесткость от 0,4 Н/м, радиус кривизны зонда от 2 нм до 5 нм);
- вода дистиллированная по ГОСТ Р 58144-2018;
- микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл;
- одноразовые наконечники 0,1-10 мкл;
- деионизованная вода;
- изопропанол для промывки жидкостной ячейки;
- фильтрованные буферные растворы, растворы компонентов ферментной системы, для которых проведен контроль на отсутствие содержания частиц с высотой более 1 нм;
- одноразовые шприцы для добавления растворов в жидкостную ячейку.

7.4 Обработка данных:

- программное обеспечение для обработки АСМ изображений NanoScore Analysis 2.0 (Bruker, США);
- программное обеспечение для построения функций распределения визуализированных объектов по высотам $\rho(h)$;
- алгоритм обработки данных, полученных в результате обработки АСМ-изображений.

8. Операции при подготовке к выполнению измерений

При подготовке к выполнению измерений проводят следующие работы:

8.1 Процедура подготовки раствора, содержащего фермент:

- Подготовка раствора белка, производится в соответствии с молекулярной массой и исходной концентрацией фермента. В случае использования модельного белка пероксидазы хрена (ПХ) используется 0,1 мкМ раствор. Конечная концентрация должна обеспечивать визуализацию единичных сорбированных объектов.

Для приготовления раствора необходимо рассчитать количество исходного вещества и объема полученного раствора в соответствии с формулой:

$$C_M = n_{\text{в-ва}} / V_{\text{р-ра}}$$

В качестве оптимальной рекомендуется выбрать концентрацию 10^{-7} М, так как ранее было показана воспроизводимость визуализации объектов в виде отдельных объектов, отнесенных к мономерной форме белка.

Исходя из расчетов, навеску (либо исходный раствор) разбавляют фильтрованным фосфатно-солевым буфером (2mM PBSD).

Примечание: Концентрация буферного раствора выбрана исходя из результатов АСМ-визуализации, так как ионной силы указанного раствора достаточно как для нековалентной сорбции фермента, так и для качественной визуализации без избыточного осаждения остатков соли на поверхности. Сохранение активности для модельного белка ПХ в таком буфере подтверждена, для другой системы необходимы дополнительные измерения.

- Для подготовки поверхности для нековалентной иммобилизации производится процедура скалывания слюдяной подложки для обеспечения атомарно ровной и чистотой поверхности.

- В случае, если для более прочной сорбции фермента требуется ковалентная иммобилизация, возможно использовать подложку, модифицированную (3-аминопропил)триэтоксисиланом (APTES) с использованием метода осаждения из паровой фазы.

8.2 Проведение измерений

8.2.1. Общая настройка и измерения высот в жидкости.

Перед началом работы необходимо произвести общую настройку прибора.

- Выбор и установка соответствующего зонда для АСМ.
- Установить кантилевер в соответствующий держатель микроскопа в соответствии с инструкцией к прибору.
- Установить жидкостную ячейку на держатель после установки кантилевера
- Настройки лазера, резонансной частоты и калибровка кантилевера в соответствии с инструкцией к прибору.
- Заполнение ячейки и подводящих трубок буферным раствором.
- Процесс измерения высот в полуконтактном режиме в соответствии с инструкцией к прибору.
- Размещение подложки с адсорбированными ферментами помещается на

столик микроскопа.

- Выбор области сканирования с однородным распределением объектов, устанавливается размер сканирования 5x5 мкм и частота сканирования 1 Гц.

- Сканирование в режиме Tapping mode в соответствии с инструкцией к прибору.

- Выбор участка с равномерным распределением объектов по поверхности, отсутствие дефектов поверхности.

- Установка в выбранной области скана размером 2x2 мкм, частота сканирования 1 Гц или более в зависимости от качества получаемого изображения.

Примечание: при удовлетворительном результате подстройки параметров сканирования возможен переход в режим саморегуляции подстройки ScanAsyst, который упрощает получение большего количества фреймов.

- Активация функции NanoTrack™, которая осуществляет удерживание области сканирования в заданном участке по осям X, Y.

- Регистрация изображений для получения коллекции сканов в течение не менее 10 минут.

- Добавление в систему жидкостной ячейки с помощью шприца компонентов ферментной системы (последовательно субстрат, кофактор или ингибитор) в зависимости от дизайна эксперимента.

- Регистрация изображений для получения коллекции сканов в течение не менее 10 минут после добавления каждого компонента реакции.

- После проведения измерений жидкостная ячейка удаляется и промывается деионизованной водой и/или изопропанолом.

9. Операции обработки результатов измерений

9.1 Обработка результатов, полученных на АСМ

9.1.1 Обработка изображений

Полученные изображения топографии обрабатываются при помощи стандартного программного обеспечения NanoScope Analysis 2.0 (Bruker, США). Для этого необходимо открыть исходный файл в формате .spm. Для устранения шумов или иных артефактов, искажающих информацию на изображении,

необходимо произвести процедуру выравнивания. Для этого нужно выбрать опцию «Filters» > «Flatten» в строке меню или нажать на иконку «Flatten» на панели инструментов. Следующий шаг - выбрать порядок сглаживания. Для того чтобы запустить команду «Flatten» необходимо нажать клавишу «Execute». Выровненное изображение появится на экране дисплея. Для выравнивания большого количества изображений используется автопрограмма, где оператором задается последовательные шаги действий для выполнения задачи.

Для оценки высот отдельных объектов, зарегистрированных в процессе сканирования, используется функция «Section», иконка которой также находится на панели инструментов. Для этого необходимо провести сечение интересующего объекта, либо, при необходимости, сечение всего изображения. В правой части экрана формируется график высот, соответствующей линии сечения. Для дальнейшего статистического анализа производится выгрузка информации о полученных высотах со всех изображений. Детальный обсчет высот производится в специальном программном обеспечении.

Для представления результата строится график функции распределения визуализированных объектов по высотам $p(h)$, которая формируется в любом программном обеспечении, позволяющим производить необходимые вычисления (например, Microsoft Excel).

9.1.2 Получение параметров высоты и/или площади визуализированных объектов.

Далее производится автоматическая обработка данных специальным алгоритмом, способным обрабатывать большой пул последовательных изображений.

Для этого необходимо задать диапазон интересующих высот объектов, в соответствии с графиком функции распределения визуализированных объектов по высотам $p(h)$.

Далее формируется координата объекта, от которой отталкиваются дальнейшие вычисления (например, средняя высота объектов по скану). После чего вычисляется стандартное и среднеквадратичное отклонения, в соответствии с выбранной координатой.

9.1.3 Оценка функциональной активности по АСМ-данным

Полученные стандартные и среднеквадратичные отклонения принимаются за величины, соответствующие флуктуациям высот. Формируется график изменения флуктуации высот в зависимости от времени и (или) стадий каталитического цикла. Исходя из графика проводится оценка функциональную активность единичной молекулы фермента по АСМ-данным.

10. Требования к оформлению результатов измерений

Результаты измерений высоты объектов оформляют в виде распечатанных графиков функции распределения и графиков изменения флуктуации высот в зависимости от времени и (или) стадий каталитического цикла.

В протоколе должны быть приведены следующие сведения:

- дата приготовления биологических проб;
- дата проведения измерений;
- значение концентрации общего белка в пробе;
- молекулярный вес;
- последовательность стадий ферментной реакции;
- должности, фамилии, инициалы и подписи сотрудников, проводивших пробоподготовку, АСМ-измерения и обработку результатов.

11. Процедуры и периодичность контроля точности получаемых результатов измерений

- Для точности получаемых результатов измерений проводится калибровка АСМ-зонда на калибровочной решетке не реже 1 раза для 10 экспериментальных дней;
- Контроль чистоты используемых растворов для АСМ-системы проводятся перед каждой экспериментальной серией.

12. Требования к квалификации операторов

К подготовке проб, выполнению измерений и обработке их результатов допускаются сотрудники с опытом работы в биохимической лаборатории не менее одного года, обладающие соответствующим высшим образованием (либо специалисты под контролем сотрудника с соответствующим высшим образованием), владеющие техникой и навыками работы на атомно-силовом

микроскопе и вспомогательном оборудовании и освоившие настоящую методику измерений.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

ПАРАМЕТРЫ РАСЧЕТА ИНФОРМАЦИОННЫХ МОДЕЛЕЙ ТЕОРЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПРОТЕОФОРМ ЧЕЛОВЕКА И МОДЕЛЬНЫХ ОРГАНИЗМОВ

PTM - количество аминокислотных последовательностей, содержащих посттрансляционные модификации; PTMg - количество генов, соответствующих белкам с посттрансляционными модификациями; PTMav - среднее количество вариантов последовательностей, содержащих PTM, на один ген (PTM/PTMg); AS - количество аминокислотных последовательностей, образованных в результате альтернативного сплайсинга; ASg - количество генов, подвергающихся альтернативному сплайсингу; ASav - среднее количество сплайс-вариантов на один ген (AS/ASg); SAP - количество аминокислотных последовательностей, содержащих одноаминокислотные полиморфизмы; SAPg - количество генов, содержащих однонуклеотидные замены, реализуемые в одноаминокислотные полиморфизмы; SAPav - среднее количество вариантов последовательностей, содержащих ОАП, на один ген (SAP/SAPg).

Модельный организм	Идентификатор таксономии	PTM	PTMg	PTMav	AS	ASg	ASav	SAP	SAPg	SAPav
<i>Apis mellifera</i> (Honeybee)	7460	49	23	2,1	4	2	2	21	7	3
<i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)	3702	6170	2728	2,3	5549	3226	1,7	820	131	6,3
<i>Caenorhabditis elegans</i>	6239	488	225	2,2	2858	996	2,9	47	16	2,9
<i>Callithrix jacchus</i> (White-tufted-ear marmoset)	9483	365	64	5,7	17	7	2,4	2	1	2
<i>Canis lupus familiaris</i> (Dog)	9615	2503	445	5,6	108	47	2,3	60	41	1,5
<i>Cavia porcellus</i> (Guinea pig)	10141	572	125	4,6	43	17	2,5	8	6	1,3
<i>Chlorocebus aethiops</i> (Green monkey)	9534	408	64	6,4	18	7	2,6	2	1	2
<i>Danio rerio</i> (Zebrafish)	7955	627	235	2,7	497	225	2,2	15	6	2,5
<i>Drosophila melanogaster</i> (Fruit fly)	7227	4906	1382	3,5	2600	797	3,3	1576	304	5,2
<i>Equus caballus</i> (Horse)	9796	810	139	5,8	17	8	2,1	45	17	2,6
<i>Escherichia coli</i>	83333	712	473	1,5	27	13	2,1	430	132	3,3
<i>Gallus gallus</i> (Chicken)	9031	1368	360	3,8	449	171	2,6	106	43	2,5
<i>Heterocephalus glaber</i> (Naked mole rat)	10181	7	4	1,8	0	0	0	0	0	0
<i>Macaca mulatta</i>	9544	920	149	6,2	53	20	2,6	33	12	2,8
<i>Mus musculus</i> (Mouse)	10090	50031	8923	5,6	13759	5078	2,7	1319	426	3,1

Продолжение таблицы

Модельный организм	Идентификатор таксономии	PTM	PTMg	PTMav	AS	Asg	Asav	SAP	SAPg	SAPav
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Rabbit)	9986	3151	567	5,6	156	59	2,6	75	34	2,2
<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>japonica</i> (Rice)	39947	397	239	1,7	630	302	2,1	25	10	2,5
<i>Ovis aries</i> (Sheep)	9940	1016	225	4,5	42	17	2,5	97	35	2,8
<i>Panax ginseng</i> (Korean ginseng)	4054	11	5	2,2	4	2	2	0	0	0
<i>Pinus koraiensis</i> (Korean pine)	88728	11	5	2,2	0	0	0	0	0	0
<i>Podospora anserina</i>	515849	1	1	1	0	0	0	1	1	1
<i>Rattus norvegicus</i> (Rat)	10116	26723	4710	5,7	2770	1010	2,7	280	113	2,5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (strain ATCC 204508 / S288c) (Baker's yeast)	559292	7290	2358	3,1	254	127	2	508	129	3,9
<i>Schizosaccharomyces</i> <i>pombe</i> (strain 972 / ATCC 24843)	284812	2637	1111	2,4	54	28	1,9	14	6	2,3
<i>Staphylococcus aureus</i>	1280	947	866	1,1	0	0	0	56	13	4,3
<i>Sus scrofa</i> (Pig)	9823	4787	836	5,7	141	64	2,2	120	55	2,2
<i>Triticum aestivum</i> (Wheat)	4565	79	32	2,5	0	0	0	43	15	2,9
<i>Xenopus laevis</i>	8355	987	257	3,8	291	131	2,2	42	15	2,8
<i>Zea mays</i> (Maize)	4577	142	73	1,9	48	23	2,1	112	17	6,6

ПРИЛОЖЕНИЕ В

СОГЛАСОВАНО

Руководитель работ,
академик Арчаков А.И.



«28» января 2025 г.

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБМХ
Пономаренко Е.А.



«30» января 2025 г.

М.П.

СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП) “ЗАБОР КРОВИ И ВЫДЕЛЕНИЕ ЭДТА-ПЛАЗМЫ”

1. Цель создания СОП состоит в формировании этапов получения биологического материала (крови и плазмы) в целях дальнейшего хранения (биобанкирования) и передачи в исследовательские лаборатории.

В ходе работы мы руководствовались:

- правилами надлежащей лабораторной практики, СанПиН 2.1.3.2630-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность»;

- ГОСТ Р 53079.4-2008 «Технологии медицинские лабораторные. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа». Введен в действие с 01.01.2010;

- ISO 15189:2015 «Лаборатории медицинские. Требования к качеству и компетентности»;

- методическими рекомендациями «Организация преаналитического этапа при централизации лабораторных исследований», принятые на XVI форуме «Национальные дни лабораторной медицины России – 2012», Кишкун А.А., Гильманов А.Ж. и соавторы.

2. Требования к работам и оборудованию.

Все работы, проводимые в условиях лаборатории, должны вестись в соответствии с правилами пожарной безопасности и охраны труда. При работе обеспечиваются условия, предотвращающие заражение персонала инфекционными агентами из первичного биоматериала.

Все оборудование проходит процедуру калибровки сотрудниками лаборатории с периодичностью и с использованием методов, как это указано производителем. Все расходные материалы и реактивы должны иметь соответствующие сертификаты качества и храниться соответственно спецификации.

Ответственность за выполнение данной процедуры несут все сотрудники, участвующие в исследовании.

Перечень необходимого оборудования и расходных материалов для выполнения стандартной операционной процедуры представлен в таблице А1.

3. Оборудование и материалы.

Таблица А1 - Перечень необходимого оборудования и расходных материалов

№	Наименование	Примечание
1	Вакуумная пробирка	Вакуумная пробирка с антикоагулянтом K2EDTA объемом 6 мл. (1 шт);
2	Вакуумная система сбора крови: одноразовый держатель для игл; игла;	- одноразовый держатель для игл BD Vacutainer (фирма Becton Dickinson International, США) - игла черная 22Gx1 1/2" BD Vacutainer (фирма Becton Dickinson International, США) Или аналоги
3	Емкость для сбора колюще-режущих медицинских отходов	Применяется в процедурных кабинетах и лабораториях. КБСУ для медицинских отходов класса Б.
4	Штативы для пробирок	-
5	Жгут	-
6	Перчатки медицинские	Стерильные хирургические перчатки латексные, неопудренные, с нитриловым покрытием.
7	Дезинфицирующие салфетки	Салфетки спиртовые (70% этиловый спирт)
8	Кожный антисептик для обработки рук	-
9	Пипетка-дозатор	Автоматическая пипетка-дозатор переменного объема 100-1000 мкл
10	Наконечники для пипетки	Наконечники объемом 100-1000 мкл
11	Пробирки, объемом не менее 1,5 мл	Криопробирки (LVL SAFE® XLX 2000 или аналог) или микроцентрифужные пробирки эппендорф, устойчивые к заморозке, объемом не менее 1,5 мл

Продолжение таблицы А1

12	Центрифуга	Лабораторная центрифуга СМ-6МТ для пробирок и вакутейнеров, ELMI, Латвия или аналог
13	Система криохранения	Морозильник или морозильный ларь (температура

4. Описание процедуры.

Забор крови производится натощак (последний прием пищи не менее чем за 12 часов до взятия крови).

- 1) Представить себя пациенту;
- 2) Провести идентификацию;
- 3) Объяснить цель и ход процедуры;
- 4) Выбрать вакутейнер с соответствующим цветом крышки; маркировать пробирки согласно правилам идентификации пациентов;
- 5) Наложить жгут;
- 6) Провести обработку рук согласно методическим рекомендациям по обработке рук сотрудников медицинских организаций РФ;
- 7) Надеть перчатки, обработать спиртовым раствором;
- 8) Взять стерильную медицинскую иглу для взятия крови №21G или 22G левой рукой, правой рукой вывернуть и снять защитный колпачок;
- 9) Ввернуть в иглодержатель освободившийся конец иглы в резиновом чехле и завинтить до упора;
- 10) Обработать место прокола спиртовой салфеткой;
- 11) Снять цветной защитный колпачок и ввести иглу в вену;
- 12) Взять иглодержатель левой рукой, а в правую руку взять вакуумную пробирку и вставить ее крышкой в иглодержатель. Удерживая выступы держателя указательным и средним пальцами правой руки, большим пальцем надеть пробирку на иглу до упора.
- 13) Ослабить жгут;
- 14) После заполнения пробирки до необходимого объема извлечь ее из держателя;

15) Аккуратно перемешать содержимое заполненной пробирки, переворачивая ее не менее 8 раз. Если у пациента требуется взять несколько проб крови, вставьте следующую пробирку в держатель и повторить все манипуляции, начиная с п. 12;

16) Утилизировать иглу и иглодержатель КБСУ для медицинских отходов класса «Б»;

17) Отобрать при помощи пипетки кровь в количестве 1-2 аликвот (объемом 1000 мкл) в криопробирку, промаркировать аликвоту согласно номеру пациента в исследовании. Поместить на хранение в морозильную камеру с температурным режимом -80оС.

18) Остальной объем крови используется для выделения плазмы сразу после забора крови. ВАЖНО! Пробирки с кровью с момента взятия до момента выделения ЭДТА-плазмы должны находиться при комнатной температуре.

19) Пробирки с кровью центрифугируют при 3000 об/мин в течении 10 минут.

20) После центрифугирования, с помощью дозатора, аликвоты плазмы распределить по криопробиркам в количестве не менее 1 мл и немедленно закрыть крышками.

21) Пробирки заморозить при температуре -80оС для длительного хранения.

22) Снять перчатки и утилизировать в КБСУ для медицинских отходов класса «Б»;

23) Провести обработку рук согласно методическим рекомендациям по обработке рук сотрудников медицинских организаций РФ.

Все образцы собираются и хранятся в Биобанке в соответствии с международными требованиями и практикам ISBER (Международного общества биологических и экологических хранилищ).

5. Примечания.

1) Пациент может бояться самой процедуры венопункции. Поэтому важно спокойно и доверительно, простыми словами объяснить ему, как берется кровь и что дискомфорт и болезненные ощущения обычно исчезают после введения иглы в вену.

2) Все пробирки с кровью момента взятия до момента выделения ЭДТА-плазмы находятся при комнатной температуре.

3) Не встряхивайте пробирку: резкое смешивание может вызвать пенообразование и гемолиз.

4) Гемолиз (повреждение эритроцитов во время взятия крови) может сделать пробу непригодной для анализа. Гемолиз может происходить при быстрой эвакуации крови через тонкую иглу или при сильном встряхивании пробирки. При использовании обычного шприца иглу удаляют до помещения пробы в контейнер.

5) Наложение жгута на длительное время может искажать результаты анализа. Нужно избегать этого и не забирать кровь, если жгут используется более 1 мин. Попытайтесь взять кровь из вены на второй руке.

6. Ссылки

А) СанПиН 2.1.3.2630-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность».

Б) ГОСТ Р 53079.4-2008 «Технологии медицинские лабораторные. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа». Введен в действие с 01.01.2010.

В) ISO 15189:2015 «Лаборатории медицинские. Требования к качеству и компетентности».

Г) Методические рекомендации «Организация преаналитического этапа при централизации лабораторных исследований», принятые на XVI форуме «Национальные дни лабораторной медицины России – 2012», Кишкун А.А., Гильманов А.Ж. и соавторы.

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

СОГЛАСОВАНО

Руководитель работ,
академик Арчаков А.И.



«28» сентября 2025 г.

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБМХ
Пономаренко Е.А.



«30» сентября 2025 г.
М.П.

Руководитель Биобанка,
Институт изучения старения
Кубрикова Алена Андреевна



"26" сентября 2024 г.

А К Т

ПЕРЕДАЧИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ

от "26" сентября 2024 г.

**Мною, руководителем Биобанка Кубриковой Аленой Андреевной переданы, а
м.н.с. лаборатории структурной протеомики ИБМХ Наход Валерией Игоревной**

(ФИО и должность принимающего)

приняты биологические образцы:

№	ID донора	возраст ная группа	По л	Дата рожден ия (возраст)	Тип образ ца	Кол- во аликв от (объе м, мл)	Общ ий объе м, мл	Баркод	Тип заморож ки
1	576	Молоды е до 20 лет	м	03.11.20 00	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7000418 516	-80С
2	620	Молоды е до 20 лет	м	08.06.20 04	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7000601 979	-80С
3	666	Молоды е до 20 лет	м	22.03.20 01	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7000152 156	-80С

4	670	Молоды е до 20 лет	м	02.08.20 01	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7000037 929	-80С
5	776	Молоды е до 20 лет	м	08.12.20 03	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7000598 445	-80С
6	1115	Молоды е до 20 лет	м	20.04.20 02	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7000172 610	-80С
7	1123	Молоды е до 20 лет	м	01.01.20 05	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7000172 620	-80С
8	1128	Молоды е до 20 лет	м	31.12.20 04	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7000173 210	-80С
9	1151	Молоды е до 20 лет	м	21.11.20 04	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7002583 598	-80С
10	563	Молоды е до 20 лет	ж	20.04.20 01	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7000418 480	-80С
11	631	Молоды е до 20 лет	ж	29.10.20 01	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7000417 435	-80С
12	635	Молоды е до 20 лет	ж	14.07.20 04	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7000417 413	-80С
13	889	Молоды е до 20 лет	ж	15.08.20 03	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7000043 701	-80С
14	910	Молоды е до 20 лет	ж	06.09.20 01	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7000166 899	-80С
15	972	Молоды е до 20 лет	ж	20.12.20 00	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7000082 346	-80С
16	986	Молоды е до 20 лет	ж	06.03.20 03	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7000082 434	-80С

17	1120	Молоды е до 20 лет	ж	06.10.20 03	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7000173 495	-80С
18	1144	Молоды е до 20 лет	ж	06.03.20 01	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7002585 125	-80С
19	1160	Молоды е до 20 лет	ж	01.11.20 05	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7002585 505	-80С
20	925	Пожилы е старше 80 лет	м	06.08.19 33	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7000043 780	-80С
21	989	Пожилы е старше 80 лет	м	08.06.19 39	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7000080 095	-80С
22	996	Пожилы е старше 80 лет	м	11.07.19 42	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7000037 614	-80С
23	997	Пожилы е старше 80 лет	м	23.05.19 42	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7002661 007	-80С
24	1100	Пожилы е старше 80 лет	м	03.02.19 40	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7002631 440	-80С
25	1102	Пожилы е старше 80 лет	м	28.12.19 41	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7000172 828	-80С
26	1149	Пожилы е старше 80 лет	м	13.08.19 41	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7002583 834	-80С
27	1152	Пожилы е старше 80 лет	м	05.10.19 39	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7002583 588	-80С
28	1158	Пожилы е старше 80 лет	м	21.05.19 38	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7002585 764	-80С
29	1181	Пожилы е старше 80 лет	м	05.01.19 35	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7002589 231	-80С

30	1019	Пожилы е старше 80 лет	ж	24.09.19 42	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7002661 508	-80С
31	1030	Пожилы е старше 80 лет	ж	24.02.19 42	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7002727 627	-80С
32	1052	Пожилы е старше 80 лет	ж	02.01.19 42	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7002729 012	-80С
33	1059	Пожилы е старше 80 лет	ж	09.09.19 43	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7002729 292	-80С
34	1074	Пожилы е старше 80 лет	ж	09.05.19 42	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7002646 270	-80С
35	1075	Пожилы е старше 80 лет	ж	21.04.19 43	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7002645 095	-80С
36	1107	Пожилы е старше 80 лет	ж	14.05.19 42	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7000173 025	-80С
37	1132	Пожилы е старше 80 лет	ж	16.11.19 43	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7000173 130	-80С
38	1137	Пожилы е старше 80 лет	ж	16.10.19 43	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7002584 636	-80С
39	1150	Пожилы е старше 80 лет	ж	29.07.19 43	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7002583 881	-80С
40	529	Средни й возраст от 22 до 79 лет	м	10.03.19 96	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV7000599 867	-80С
41	532	Средни й возраст от 22 до 79 лет	м	14.12.19 87	ЭДТ А плазм а	1	1-1,5	LV5011044 039	-80С

42	534	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	21.08.19 92	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000337 844	-80С
43	549	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	22.10.19 96	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV5011044 111	-80С
44	569	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	22.01.19 98	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000418 467	-80С
45	578	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	02.06.19 83	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000418 115	-80С
46	585	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	01.09.19 94	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000418 575	-80С
47	606	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	03.04.19 95	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000417 935	-80С
48	615	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	13.02.19 77	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000601 205	-80С
49	623	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	29.04.199 4	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000599 915	-80С
50	633	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	11.11.19 96	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000418 233	-80С
51	636	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	19.09.19 51	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000417 421	-80С

52	640	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	27.06.19 78	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000417 630	-80С
53	650	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	22.08.19 72	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000034 902	-80С
54	660	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	16.02.19 93	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000417 364	-80С
55	668	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	04.04.20 00	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000416 156	-80С
56	669	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	08.06.19 92	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000037 957	-80С
57	705	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	18.02.19 83	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000037 111	-80С
58	719	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	06.10.19 77	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000600 134	-80С
59	722	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	08.09.19 49	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000603 433	-80С
60	766	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	20.09.19 59	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000599 250	-80С
61	813	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	21.11.19 95	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV5011120 732	-80С

62	903	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	29.05.19 61	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000027 521	-80С
63	909	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	29.12.19 67	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000026 480	-80С
64	922	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	22.05.19 97	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7002609 649	-80С
65	947	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	21.06.19 73	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000027 753	-80С
66	963	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	10.12.19 62	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000029 251	-80С
67	539	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	27.07.19 63	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV5011044 062	-80С
68	1038	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	04.12.19 49	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7002727 068	-80С
69	1095	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	26.08.19 61	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7002633 040	-80С
70	771	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	13.11.19 72	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000599 302	-80С
71	526	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	09.10.19 97	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000599 860	-80С

72	531	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	25.05.19 72	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000083 240	-80С
73	533	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	12.08.19 76	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000084 155	-80С
74	535	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	02.07.20 00	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV5011044 128	-80С
75	540	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	07.04.19 83	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV5011044 134	-80С
76	550	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	26.07.19 92	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000419 069	-80С
77	566	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	02.12.19 66	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000418 121	-80С
78	568	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	27.09.19 99	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000418 595	-80С
79	582	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	21.05.19 77	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000418 557	-80С
80	604	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	16.04.19 96	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000417 947	-80С
81	608	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	22.09.19 77	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000419 382	-80С

82	634	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	09.02.20 00	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000417 582	-80С
83	641	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	28.11.19 87	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000600 706	-80С
84	651	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	25.12.19 91	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000034 999	-80С
85	659	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	09.12.19 97	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000037 942	-80С
86	662	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	25.02.19 53	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000417 243	-80С
87	691	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	17.05.19 83	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000061 026	-80С
88	694	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	16.09.19 77	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000061 014	-80С
89	757	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	01.04.19 63	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000336 451	-80С
90	713	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	14.11.19 61	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000061 355	-80С
91	896	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	19.08.20 00	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000032 704	-80С

92	915	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	01.04.19 68	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7002609 885	-80С
93	945	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	28.05.19 63	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000027 701	-80С
94	971	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	09.06.19 53	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000080 225	-80С
95	974	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	08.08.19 63	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000082 407	-80С
96	991	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	27.09.19 50	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000080 030	-80С
97	1057	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	22.07.19 47	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7002729 418	-80С
98	1113	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	23.07.20 00	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000172 597	-80С
99	1178	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	14.11.19 96	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000173 574	-80С
10 0	1185	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	09.10.20 00	ЭДТ А плазма	1	1-1,5	LV7000173 592	-80С

Наход Валерией Игоревной проведен осмотр, передаваемых биологических образцов на наличие нарушения целостности упаковки/пробирок/маркировки, наличие гемолиза, хилеза и др. Недостатки не выявлены

(указать выявленные недостатки)

Биологические образцы получены 26 сентября 2024 г. в рамках договора № 11К от 14 августа 2024г.

Хранение биологических образцов осуществлялось при температуре -80°C (г. Москва, ул. 1-ая Леонова, д. 16)

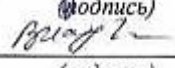
Транспортировка биологических образцов осуществлялась в термоконтейнере на сухом льду.

Время отправки биологических образцов _____

Время доставки биологических образцов _____

Дата передачи "26" сентября 2024 г.

Передал: Кудрикова А.А. / 
(ФИО) (подпись)

Принял: Макаев Вл. / 
(ФИО) (подпись)

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

СОГЛАСОВАНО

Руководитель работ,
академик Арчаков А.И.



«28» ноября 2025 г.

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБМХ
Пономаренко Е.А.



«30» ноября 2025 г.
М.П.

Руководитель Биобанка,
Институт изучения старения
Кубрикова Алена Андреевна

"19" ноября 2024 г.

А К Т

ПЕРЕДАЧИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ

от "19" ноября 2024 г.

**Мною, руководителем Биобанка Кубриковой Аленой Андреевной переданы, а
м.н.с. лаборатории структурной протеомики ИБМХ Наход Валерией Игоревной**

(ФИО и должность принимающего)

приняты биологические образцы:

№	ID донора	возрастная группа	Пол	Дата рождения (возраст)	Тип образца	Кол-во аликвотов (объем, мл)	Общий объем, мл	Баркод	Тип заморозки
1	929	Молодые до 20 лет	м	02.09.1997	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV7000027163	-80С
2	870	Молодые до 20 лет	м	02.01.2001	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV7002608341	-80С
3	1126	Молодые до 20 лет	м	27.07.2000	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV7000173125	-80С
4	100	Молодые до 20 лет	м	26.08.1998	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV7000033731	-80С
5	395	Молодые до 20 лет	м	13.03.2002	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV7000510816	-80С
6	350	Молодые до 20 лет	ж	21.12.2004	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV7000153515	-80С

7	671	Молодые до 20 лет	ж	13.03.2003	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV7000037975	-80С
8	543	Молодые до 20 лет	ж	11.10.2000	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV5011044152	-80С
9	905	Молодые до 20 лет	ж	31.10.2000	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV7002609477	-80С
10	1114	Молодые до 20 лет	ж	12.03.2001	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV7000172607	-80С
11	703	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	31.05.1980	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV7000034252	-80С
12	752	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	07.06.1980	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV7000603478	-80С
13	624	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	07.12.1976	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV7000599751	-80С
14	956	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	03.11.1972	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV7000033910	-80С
15	621	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	23.03.1972	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV7000601986	-80С
16	761	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	02.05.1971	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV7000599249	-80С
17	938	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	08.05.1970	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV7000027021	-80С
18	1195	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	25.06.1966	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV7000173927	-80С
19	725	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	05.04.1966	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV7000599026	-80С
20	1179	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	19.08.1981	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV7000173742	-80С
21	524	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	09.04.1986	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV7000599530	-80С

2 2	551	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	05.10.199 2	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV50110440 84	-80С
2 3	542	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	07.11.199 2	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV50110440 63	-80С
2 4	607	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	04.11.199 5	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV70004169 35	-80С
2 5	798	Средний возраст от 22 до 79 лет	м	21.08.199 5	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV70005986 15	-80С
2 6	672	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	10.07.199 7	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV70000379 94	-80С
2 7	914	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	26.09.199 7	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV70026099 51	-80С
2 8	545	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	14.02.199 6	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV50110440 76	-80С
2 9	525	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	21.07.199 2	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV70005998 40	-80С
3 0	865	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	15.08.198 7	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV70000476 24	-80С
3 1	1188	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	08.11.198 7	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV70026856 34	-80С
3 2	1193	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	05.08.198 1	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV70001741 64	-80С
3 3	548	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	13.02.198 5	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV50110440 12	-80С
3 4	949	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	15.11.197 1	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV70026096 01	-80С
3 5	966	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	20.10.196 9	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV70000339 80	-80С

3 6	937	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	19.06.196 2	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV70000275 30	-80С
3 7	587	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	19.03.196 1	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV70004184 59	-80С
3 8	1171	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	22.10.197 2	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV70025848 95	-80С
3 9	614	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	03.09.197 6	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV70004171 03	-80С
4 0	764	Средний возраст от 22 до 79 лет	ж	30.11.197 7	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV70003365 94	-80С
4 1	1190	Пожилые старше 80 лет	м	06.01.193 8	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV70026857 10	-80С
4 2	894	Пожилые старше 80 лет	м	26.06.193 6	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV70026076 78	-80С
4 3	1175	Пожилые старше 80 лет	м	26.02.193 7	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV70025891 94	-80С
4 4	1004	Пожилые старше 80 лет	ж	06.01.193 5	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV70000281 07	-80С
4 5	1103	Пожилые старше 80 лет	ж	21.12.194 1	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV70001730 37	-80С
4 6	1027	Пожилые старше 80 лет	ж	20.07.194 0	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV70027269 77	-80С
4 7	1049	Пожилые старше 80 лет	ж	16.06.193 9	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV70027291 03	-80С

4 8	1156	Пожилые старше 80 лет	ж	29.06.193 9	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV70025857 72	-80С
4 9	1002	Пожилые старше 80 лет	ж	07.08.193 8	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV70026616 07	-80С
5 0	1001	Пожилые старше 80 лет	ж	27.09.193 9	ЭДТА плазма	1	1-1,5	LV70026613 54	-80С

Наход Валерией Игоревной проведен осмотр, передаваемых биологических образцов на наличие нарушения целостности упаковки/пробирок/маркировки, наличие гемолиза, хилеза и др. Недостатки не выявлены

(указать выявленные недостатки)

Биологические образцы получены 19 ноября 2024 г. в рамках договора №11К от 14 августа 2024г.

Хранение биологических образцов осуществлялось при температуре -80⁰С (г. Москва, ул. 1-ая Леонова, д. 16)

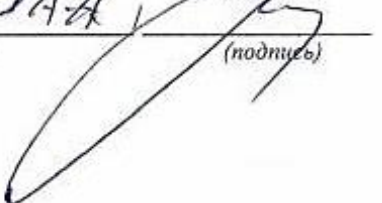
Транспортировка биологических образцов осуществлялась в термоконтейнере на сухом льду.

Время отправки биологических образцов 12:20

Время доставки биологических образцов _____

Дата передачи "19" ноября 2024 г.

Передал: Кудрякова А. А. 
(ФИО) (подпись)

Принял: Степанов А. А. 
(ФИО) (подпись)

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

СОГЛАСОВАНО

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель работ,
академик Арчаков А.И.

Директор ИБМХ
Пономаренко Е.А.


« 28 » сентября 2025 г.



« 30 » сентября 2025 г.

М.П.

АКТ №1

о создании коллекции биоматериала с метаданными

г. Москва

« 20 » ноября 2024 г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.М. Ореховича» (далее - ИБМХ), именуемое в дальнейшем «Головной исполнитель», в лице Заместителя директора ИБМХ по научной работе Плешаковой Т.О., действующей на основании Доверенности № 25 от 04.07.2024 г., и Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (далее – ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (Пироговский Университет)), именуемой в дальнейшем «Соисполнитель», в лице Директора обособленного структурного подразделения - Российский геронтологический научно-клинический центр (далее – ОСП РГНКЦ) Ткачевой Ольги Николаевны, действующей на основании Доверенности № 400 от 30.11.2023 г., с другой стороны, вместе именуемые «Стороны», составили акт о нижеследующем:

1. В целях выполнения научно-исследовательских работ по теме: «Влияние соединений, обладающих геропротективными свойствами, на единичные биомакромолекулы, модельные объекты и организм человека» в рамках Договора №11К/223 от 14.08.2024 г. создана коллекция биоматериала и передана Головному исполнителю.
2. Общая информация о биоколлекции:
Тип образцов: ЭДТА плазма
Количество образцов: 150 шт.
Сопутствующая информация: метаданные, включая клинико-антропометрическую и социо-демографическую характеристику доноров биоматериала.
Назначение коллекции: реализация НИР в рамках Соглашения между Министерством науки и высшего образования Российской Федерации №075-15-2024-643 от 12.07.2024 г.
Работы, выполненные Соисполнителем, полностью соответствуют требованиям Договора №11К/223 от 14.08.2024 г.
Настоящий акт составлен в двух экземплярах, один экземпляр хранится у Соисполнителя, другой у Головного исполнителя. Оба экземпляра имеют равную юридическую силу.

ГОЛОВНОЙ ИСПОЛНИТЕЛЬ:

Заместитель директора ИБМХ
по научно-организационной работе

М.П.


Плешакова Т.О.

СОИСПОЛНИТЕЛЬ:

Директор ОСП РГНКЦ
ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова
Минздрава России (Пироговский
Университет)

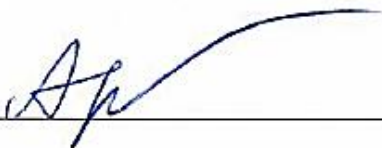
М.П.


Ткачев О.Н.

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

СОГЛАСОВАНО

Руководитель работ,
академик Арчаков А.И.



«28» января 2025 г.

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБМХ
Пономаренко Е.А.



«30» января 2025 г.

ПРОТОКОЛ РОБОТИЗИРОВАННОЙ ПРОБОПОДГОТОВКИ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА В ФОРМАТЕ 96 ЛУНОЧНОГО ПЛАНШЕТА

Содержание

1. Назначение протокола
2. Область применения
3. Условия выполнения роботизированной пробоподготовки
4. Требования к реактивам
5. Требования к оборудованию
6. Требования к процедуре проведения автоматической пробоподготовки с использованием роботизированной станции Agilent Bravo
7. Перечень вспомогательных материалов
8. Вспомогательные работы, в том числе приготовление растворов для проведения лизиса и гидролиза
9. Требования к оформлению результатов работ
10. Требования к квалификации операторов

1. Назначение методики измерений.

Данный документ «Протокол роботизированной подготовки комплексных биологических образцов для протеомного анализа в формате 96-луночного планшета» описывает процедуру подготовки образца к МС анализу с использованием автоматической станции. Подготовка образцов к масс-спектрометрическому анализу включает в себя множество этапов. При выполнении

этого процесса вручную существует высокая вероятность ошибки, которая негативно отразится на аналитической точности результатов. Пробоподготовка с использованием роботизированной станции обеспечивает высокую точность и значительно повышает производительность методики. Тщательная разработка протокола, подбор условий инкубации, реагентов, учет особенностей биологического материала может увеличить воспроизводимость методики и снизить вероятность ошибки на этапе подготовки образца. Подготовка образца включает стадию солюбилизации белка образца, его экстракции и ферментативный гидролиз по общеизвестному протоколу «гидролиз белков трипсином в растворе».

2. Область применения

Данный протокол роботизированной подготовки образцов для протеомного анализа подходит для широкого спектра биологических образцов, прежде всего, для образцов человеческого биоматериала: сыворотка и плазма крови человека.

3. Условия выполнения измерений

Лабораторный персонал должен быть в спецодежде, предохраняющей от загрязнений анализируемых образцов биоматериала тканями кожи и волос.

Проведение измерений должно проводиться в чистой комнате с организацией ламинарной вентиляции воздуха чистоты не ниже класса 9 ИСО по ГОСТ Р ИСО 14644-1-2000 в следующих условиях:

- температура окружающей среды $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$;
- относительная влажность воздуха не более 80 % при температуре $(25 \pm 5)^\circ\text{C}$;
- атмосферное давление $(84,0 - 106,7)$ кПа $(630-800)$ мм рт.ст.;
- напряжение питания в сети (220 ± 10) В;
- частота питающей сети (50 ± 1) Гц.
- освещение помещения естественное или искусственное, не ограничивается особыми требованиями.

4. Требования к реактивам

Реактивы, используемые в анализе должны обеспечивать соответствовать

высокой степени очистки, чтобы обеспечить соответствующую точность и воспроизводимость последующих масс спектрометрических измерений.

Ацетонитрил A062717 (Fisher Scientific, США);

Кислота уксусная ледяная х.ч. по ГОСТ 61-75;

Вода очищенная деионизованная по ГОСТ 6709-72;

Кислота муравьиная ч. по ГОСТ 5848-73;

Вода очищенная Lichrosolv® (Merck, США);

Натрия фосфат однозамещённый, ч.по ГОСТ 245-76

Натрия фосфат двузамещённый,х.ч. по ГОСТ 4172-76

Натрия хлористый, х.ч. ГОСТ 4171-76;

Трис(2-карбоксиэтил)фосфин (Fisher Scientific, США);

Дезоксихолат натрия (Sigma Aldrich, США);

Трипсин свиной модифицированный (Promega, США);

Мочевина (Sigma Aldrich, США);

2-хлорацетамид (Sigma Aldrich, США);

Примечание 1 – допускается использование реактивов других марок после их проверки путем проведения всей процедуры анализа для холостого опыта и оценки полученных результатов с учетом характеристик погрешности методики измерений.

5. Требования к оборудованию

Специальных требований, включая проведение ежегодной поверки, к оборудованию, используемому для роботизированной подготовки образца, не установлено.

6. Требования к процедуре проведения автоматической пробоподготовки с использованием роботизированной станции Agilent Bravo

1. Подготовить планшеты с реагентами:
2. Лизирующий буфер, алкилирующий агент, щелочной буфер, раствор фермента, раствор муравьиной кислоты.
3. Подготовить планшет с образцами
4. Подготовить планшеты с носиками

5. Включить автоматическую станцию, включить ПК и открыть программу VWorks, ввести логин и пароль оператора для доступа к управлению станцией.
6. Открыть файл протокола гидролиза для автоматической станции и провести инициализацию станции (файл протокола гидролиза содержит все параметры метода и последовательность действий для автоматической рабочей станции, см. Приложение 1).
7. Запустить файл протокола гидролиза для автоматической станции Agilent Bravo.
8. На первом этапе необходимо подготовить планшет с лизирующим буфером и поместить его в станцию на позицию 2. Также необходимо подготовить планшет с образцами сыворотки крови человека в объеме 5 мкл и поместить на позицию 6. На позиции 1 необходимо разместить планшет с 96 чистыми носиками на 180 мкл (рисунок 1).

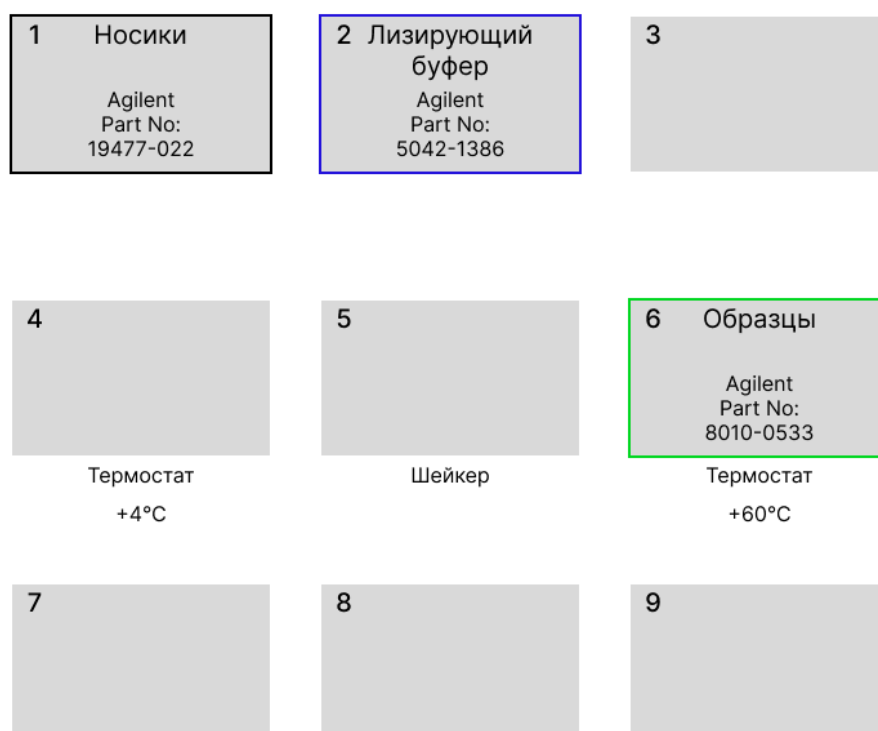


Рисунок 1 – Схема расположения планшетов в автоматической станции Agilent Bravo на этапе добавления лизирующего буфера к образцам.

На данном этапе голова станции перемещается в позицию 1 и опускается к планшету для надевания носиков. Затем она перемещается в позицию 2 и набирает 10 мкл лизирующего буфера. После этого станция перемещается в позицию 6 и добавляет лизирующий буфер к образцам с перемешиванием

9. После добавления станция перемещается в положение 1 и сбрасывает носики. Затем снова перемещается в положение 6, захватывает планшет и перемещает его в положение 5 для перемешивания на шейкере, затем возвращает его в положение 6 и включает термостат на +60°C на 30 минут в позиции 6 и на +4°C в позиции 4.
10. На втором этапе необходимо поместить планшет с раствором ТЭАБ в положении 3 и планшет с раствором с 2-хлорацетамидом в положении 8 и поставить новый планшет с носиками в положение 1. Температура термостата в положении 6 - +20°C (рисунок 2).

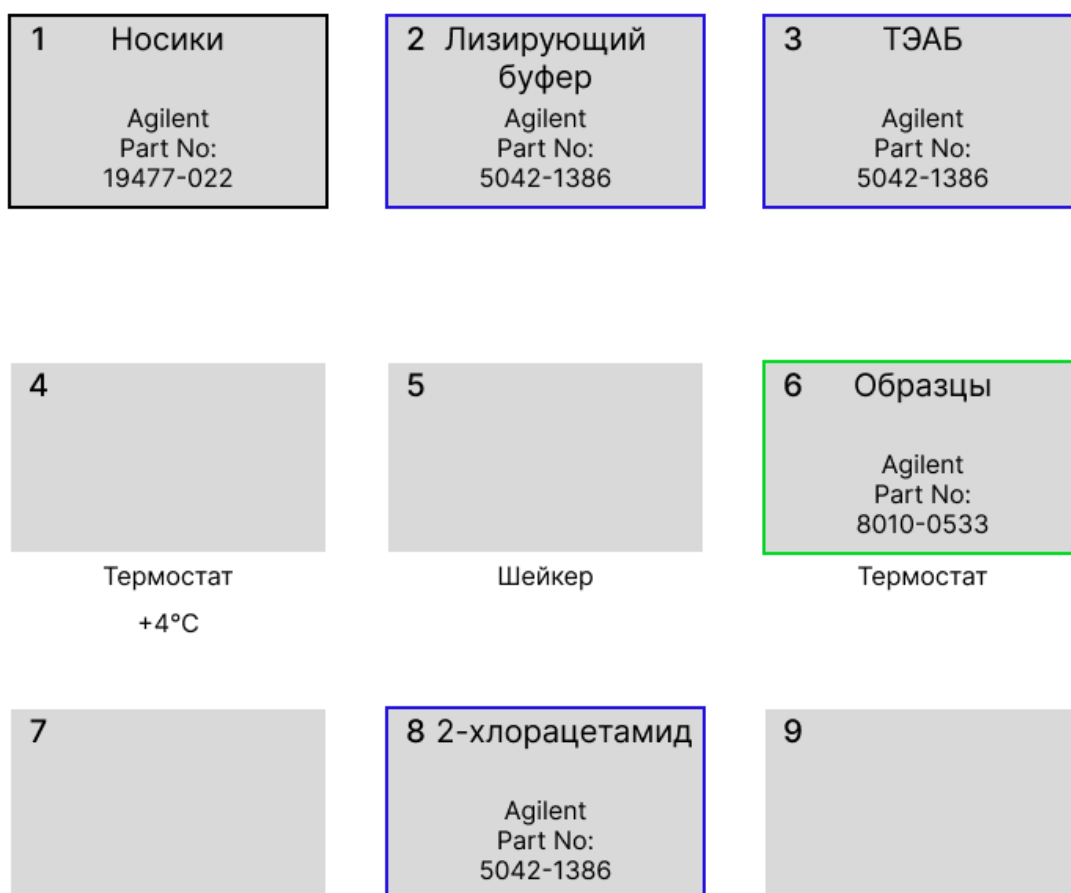


Рисунок 2 – Схема расположения планшетов в автоматической станции Agilent Bravo на этапе добавления алкилирующего агента к образцам

11. Голова станции перемещается в позицию 1 и опускается к планшету для надевания носиков. Затем она перемещается в позицию 3 и набирает 10 мкл раствора ТЭАБ. После этого станция перемещается в позицию 6 и добавляет раствор ТЭАБ к образцам с перемешиванием. Голова перемещается в положение 8, забирает 8 мкл раствора 2-хлорацетамида и возвращается к позиции 6 с образцами и добавляет раствор с перемешиванием.
12. После добавления станция переместится в положение 1 и сбросит носики. Затем снова переместится в положение 6, захватит планшет и переместит его в положение 5 для перемешивания на шейкере, затем вернет его в положение 6. Проводится инкубация образцов при температуре +20°C, 30 минут.
13. На следующем этапе необходимо поместить планшет с раствором трипсина в положении 4 и поставить новый планшет с носиками в положение 1. Температура термостата в положении 6 - +38°C (рисунок 3).

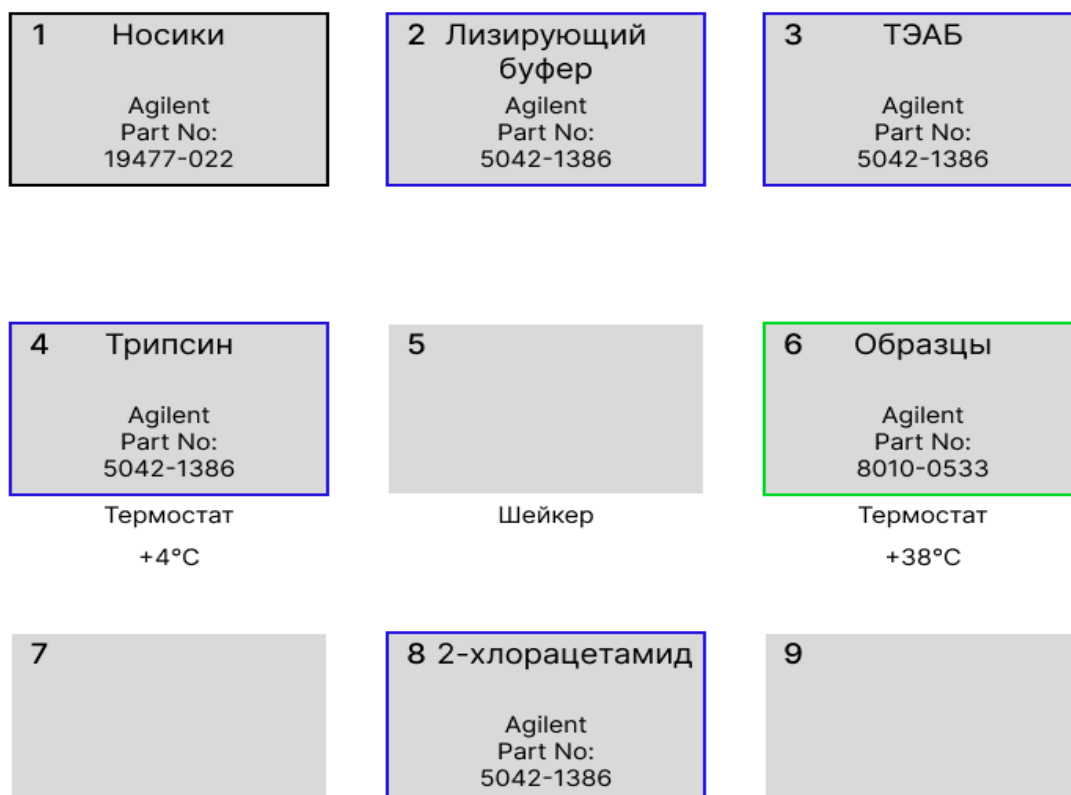


Рисунок 3 – Схема расположения планшетов в автоматической станции Agilent Bravo на этапе добавления раствора трипсина к образцам

14. Голова станции перемещается в позицию 1 и опускается к планшету для надевания носиков. Затем она перемещается в позицию 3 и набирает 100 мкл раствора ТЭАБ. После этого станция перемещается в позицию 6 и добавляет раствор ТЭАБ к образцам с перемешиванием. Голова перемещается в положение 4 и забирает 10 мкл раствора трипсина и добавляет к образцам в положении 6 с перемешиванием.
15. После добавления станция переместится в положение 1 и сбросит носики. Затем снова переместится в положение 6, захватит планшет и переместит его в положение 5 для перемешивания на шейкере, затем вернет его в положение 6. Проводится инкубация образцов при температуре +38°C, 4 часа.
16. По истечении 4 часов голова перемещается в положение 6, захватывает планшет и перемещает его в положение 5 для перемешивания на шейкере, затем вернет его в положение 6. Проводится инкубация образцов при температуре +38°C, 4 часа.
17. На последнем этапе необходимо поместить планшет с раствором муравьиной кислоты в положении 7 и поставить новый планшет с носиками в положение 1. Температура термостата в положении 6 - +4°C (рисунок 4).

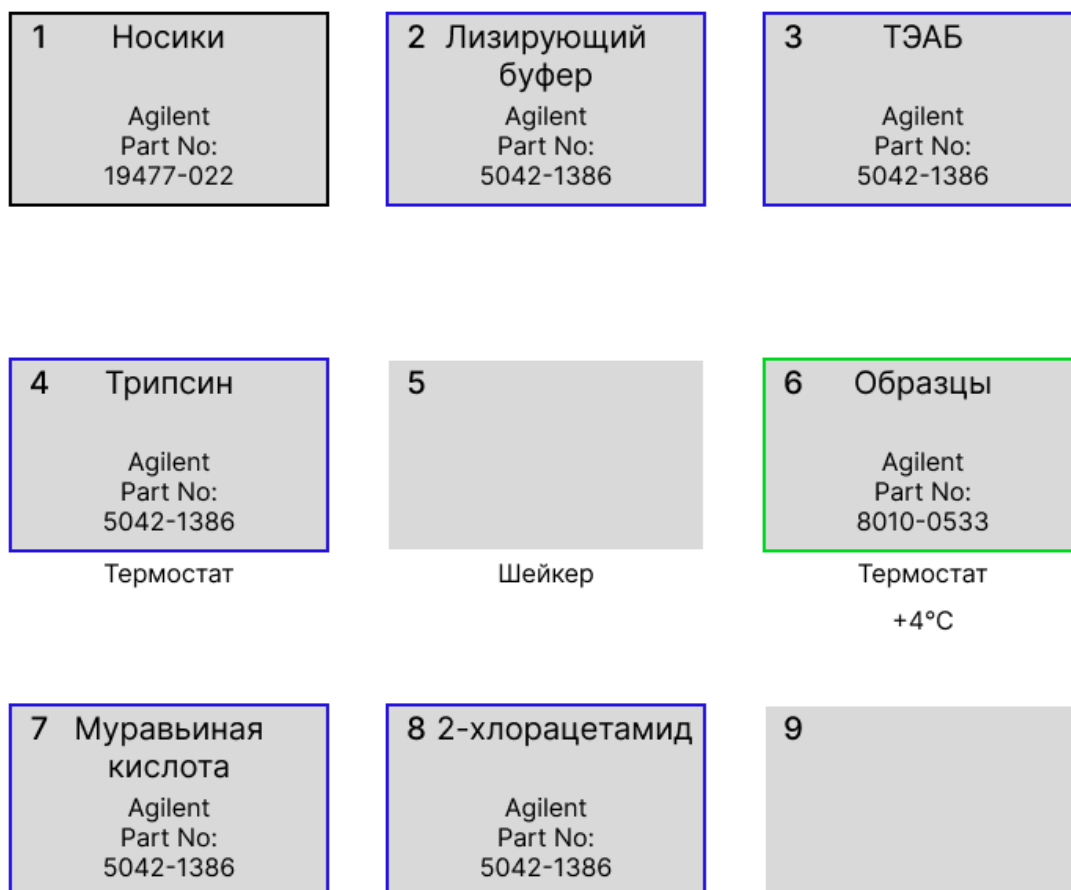


Рисунок 4 – Схема расположения планшетов в автоматической станции Agilent Bravo на этапе добавления раствора муравьиной кислоты к образцам

18. Голова станции перемещается в позицию 1 и опускается к планшету для надевания носиков. Затем она перемещается в позицию 7 и набирает 20 мкл раствора муравьиной кислоты. После этого станция перемещается в позицию 6 и добавляет раствор муравьиной кислоты к образцам с перемешиванием.
19. После добавления станция переместится в положение 1 и сбросит носики. Затем снова переместится в положение 6, захватит планшет и переместит его в положение 5 для перемешивания на шейкере, затем вернет его в положение 6.
20. Окончание протокола гидролиза автоматической станции Agilent Bravo.
21. Демонстрация работы данного метода записана в формате видео (см. Приложение 2).

7. Перечень вспомогательных материалов.

- 1) Автоматические дозаторы переменного объема 20-200 мм³ с шагом 0,1 мм³,

с точностью $\pm 0,6\%$; 100-1000 мм³ с шагом 1 мм³, с точностью $\pm 3\%$ по ГОСТ 10223-82;

2) Планшет для образцов:

Agilent, 96 – луночный планшет, Part No: 8010-0533.

3) Планшет с носиками:

Agilent, 96 – луночный планшет, Part No: 19477-022.

4) Планшет для реагентов:

Agilent, 96 – луночный планшет, Part No: 5042-1386.

8. Вспомогательные работы, в том числе приготовление растворов для проведения лизиса и гидролиза

Приготовление растворов

Лизирующий буфер, алкилирующий агент, щелочной буфер, раствор фермента, раствор муравьиной кислоты.

Лизирующий буфер: 4 М мочевины; 0,1% дезоксихолат натрия; 100 мМ ПБС; 10% ацетонитрил; 5 мМ трискарбоксиэтилфосфин, деионизованная вода.

Алкилирующий агент: 200 мМ 2-хлорацетамид, 50 мМ триэтиламмония бикарбонат, деионизованная вода.

Щелочной буфер: 100 мМ триэтиламмония бикарбонат, деионизованная вода.

Раствор фермента: модифицированного свиного трипсина 100 нг/мкл, деионизованная вода, уксусная кислота 30 мМ.

Раствор муравьиной кислоты: 10% муравьиная кислота, деионизованная вода.

9. Требования к оформлению результатов измерений (протокола СОП)

По окончании работы прибора оператор оформляет таблицу, которая содержит следующие данные.

- дата приготовления образцов
- количество образцов
- расположение образцов в планшете согласно схеме добавления образцов
- должности, фамилии, инициалы сотрудников, проводивших пробоподготовку.

10. Требования к квалификации операторов

К подготовке проб, выполнению измерений и обработке их результатов допускаются штатные сотрудники лаборатории с опытом работы в биохимической лаборатории не менее одного года, обладающие соответствующим высшим образованием (либо специалисты под контролем сотрудника с соответствующим высшим образованием), владеющие техникой и навыками работы на роботизированной станции и вспомогательном оборудовании и освоившие настоящую методику пробоподготовки.

ПРИЛОЖЕНИЕ И

СОГЛАСОВАНО

Руководитель работ,
академик Арчаков А.И.



«28» января 2025 г.

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБМХ
Пономаренко Е.А.



«30» января 2025 г.

М.П.

ПРОТОКОЛ ДЛЯ УЛЬТРАКОРОТКИХ МЕТОДОВ ПАНОРАМНОГО ПРОТЕОМНОГО АНАЛИЗА

СОДЕРЖАНИЕ

1. Назначение протокола
2. Область применения
3. Условия выполнения работ
4. Термины и определения
5. Требования к реактивам
6. Требования к оборудованию
7. Требования к процедуре проведения масс спектрометрического анализа
8. Перечень вспомогательных материалов
9. Вспомогательные работы, в том числе приготовление растворов для проведения масс спектрометрического анализа
10. Операции при выполнении масс спектрометрического анализа
11. Требования к оформлению результатов протеомного анализа
12. Требования к процедуре подготовки масс-спектрометра к работе
13. Требования к квалификации операторов

1. Назначение протокола

Данный документ «Молекулярное профилирование протеомного состава (панорамный протеомный анализ) биологического образца с использованием ультракоротких градиентов хроматографического разделения» описывает процедуру масс-спектрометрического анализа комплексных биологических образцов, включая сыворотку и плазму крови. Масс-спектрометрический анализ осуществляется на хромато-масс-спектрометрах высокого разрешения типа Orbitrap и/или Sciex Q-TOF с применением метода панорамного сканирования, при котором ионы-предшественники выделяются в заранее определенные окна изоляции и фрагментируются; затем все фрагментированные ионы в каждом окне анализируются для определения структуры пептида (режим Data Independent Acquisition).

2. Область применения

Высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemным масс-спектрометрическим детектированием высокого разрешения используется для определения протеомного состава биологического образца. Подготовка образца включает экстракцию белка образца и его ферментативный гидролиз трипсином. Затем проводят измерение масс зарядового состояния родительских ионов, их накопление, фрагментацию, и измерение масс зарядового состояния дочерних ионов. Протокол подходит для качественной и полуколичественной оценки белков с известной точной аминокислотной последовательностью.

3. Условия выполнения работ

Лабораторный персонал должен быть в спецодежде, предохраняющей от загрязнений анализируемых образцов биоматериала тканями кожи и волос.

Проведение измерений должно проводиться в чистой комнате с организацией ламинарной вентиляции воздуха чистоты не ниже класса 9 ИСО по ГОСТ Р ИСО 14644-1-2000 в следующих условиях:

- температура окружающей среды $(20 \pm 5)^{\circ}\text{C}$;
- относительная влажность воздуха не более 80 % при температуре $(25 \pm 5)^{\circ}\text{C}$;

- атмосферное давление (84,0 –106,7) кПа (630-800) мм рт.ст.;
- напряжение питания в сети (220±10) В;
- частота питающей сети (50±1) Гц.
- освещение помещения естественное или искусственное, не ограничивается особыми требованиями.

Остальные условия должны соответствовать требованиям, указанным в паспорте (формуляре) на используемые средства измерений. Для контроля состояния окружающей среды и иных условий проведения измерений должны применяться средства измерений с относительными погрешностями не более 30% значений допусков к параметрам, установленным в настоящем разделе.

4. Термины и определения

В настоящей методике применены термины с соответствующими определениями.

Протеомный состав - совокупность всех белков исследуемого организма.

Родительский ион - ионизованный пептид, полученный в результате ферментативного гидролиза белков образца.

Изоляция - процесс выделения полосы m/z , соответствующей родительскому иону из широкого окна MS1 для последующей фрагментации.

Фрагментация - процесс разрушения родительского иона инертным газом.

Дочерний ион - ион, полученный в результате фрагментации родительского иона.

Время удерживания - время, за которое достигается максимум интенсивности хроматографического пика, после ввода образца в систему.

FDR – False Discovery Rate – определяет количество возможных ложноположительных identifications в результатах биоинформатической обработке данных панорамной масс спектрометрии.

5. Требования к реактивам

Реактивы, используемые в анализе должны обеспечивать соответствовать высокой степени очистки, чтобы обеспечить соответствующую точность и воспроизводимость масс спектрометрических измерений.

Ацетонитрил A062717 (Fisher Scientific, США);
Вода очищенная деионизованная по ГОСТ 6709-72;
Кислота муравьиная ч. по ГОСТ 5848-73;
Вода очищенная Lichrosolv® (Merck, США);
Метанол для ВЭЖХ и спектроскопии, например J.T. Baker, США, 8402;
MRFA пептид (Fisher Scientific, США);
Кофеин (Fisher Scientific, США);
Ultramark 1621 (Fisher Scientific, США);
Н-бутиламин;

Примечание 1 – допускается использование реактивов других марок после их проверки путем проведения всей процедуры анализа для холостого опыта и оценки полученных результатов с учетом характеристик погрешности методики измерений.

6. Требования к оборудованию

Оборудование, используемое для масс-спектрометрического анализа и вспомогательных процедур, должно быть откалибровано и обеспечивать заявленную производителем точность измерений.

7. Требования к процедуре проведения масс-спектрометрического анализа

Хромато-масс-спектрометрический анализ должен проводиться в двух технических повторах. Масс-спектрометрический детектор высокого разрешения с орбитальной ловушкой (Q Exactive HF, «Thermo Scientific», США) или типа Q-TOF (ZenoTOF 7600 system, «SCIEX», США) должен обеспечивать следующие параметры:

- источник ионизации –ESI;
- напряжение на капилляре – от 2,1 до 4.5 кВ;
- температура капилляра – от 240°C до 450°C;
- режим положительной ионизации;
- диапазон сканируемых масс на уровне MS1: 300 m/z - 1500 m/z;
- разрешение на уровне сканирования прекурсорных ионов MS1: не менее

25 000;

- максимальное время накопления для уровня MS1: не более 50 мс;
- диапазон сканирования на уровне MS2 определяется динамически в зависимости от m/z прекурсорного иона, нижняя граница зафиксирована и составляет не более 200 m/z ;
- разрешение на уровне сканирования фрагментных ионов MS2 не менее 15 000;
- окно изоляции прекурсорных ионов от $\pm 2 m/z$ до $\pm 200 m/z$;
- максимальное последовательное разрешенное количество tandemных сканирований, изолируемых за один цикл работы прибора не менее 20
- DIA сканирование MS2 ионов в диапазоне 100-1300 m/z , полученных в результате фрагментации MS1-прекурсоров, разделенных по величине m/z на 40 «окон» переменной ширины.
- перекрытие смежных «окон» на 1 m/z .
- время накопления для каждого «окна» - 0,02 сек

2) Хроматограф Ultimate 3000 RSLC («Thermo Scientific», США) или его аналог, который состоит из следующих блоков: насоса высокого давления (до 800 бар), загрузочного насоса высокого давления (до 500 бар), термостата автоматизированного инжектора, термостата хроматографической колонки с интегрированным перепускным 10-ти канальным клапаном высокого давления (до 1000 бар) переключения потоков, автоматизированного инжектора с установленной петлей до 20 мм³ и 6-ти канальным клапаном высокого давления (до 1000 бар). Хроматографическое разделение должно осуществляться при следующих параметрах: образец загружается колонку ACQUITY UPLC BEH C18 (Waters, США) в положение клапана 1-2 загрузочным насосом при скорости потока 300 мм³/мин в течение 1 минуты, на всем протяжении анализа насос работает в изократическом режиме. Затем клапан переключается в положение 10-1 и направляет поток насоса в источник ионизации масс-спектрометра. Схема изменения подачи хроматографических фаз «А» и «Б» и скорость потока в ходе анализа приведены ниже в Таблице 1 и 2 для ультракоротких градиентов 15 минут (преимущественно. для анализа на масс-спектрометре высокого разрешения с орбитальной ловушкой) и 12 минут (преимущественно. для анализа на масс-спектрометре высокого

разрешения Q-TOF), соответственно.

Хроматографическая фаза «А» (0,1% раствор муравьиной кислоты в деионизованной воде)

Хроматографическая фаза «Б» (80% ацетонитрил, 0,1% раствор муравьиной кислоты в деионизованной воде).

Таблица 1 – Параметры градиента элюции пептидов с аналитической колонки для ультракороткого градиента 15 минут*

Время, мин	Подача хроматографической фазы «А» (%)	Подача хроматографической фазы «Б» (%)	Скорость потока, см ³ /мин
<i>Время градиента для разделения пептидной смеси:</i>			
0	98	2	0,3
1	98	2	0,3
14	65	35	0,3
<i>Время промывки и кондиционирования колонки</i>			
15	2	98	0,3
17	2	98	0,3
18	98	2	0,3
20	98	2	0,3

* градиентом считается часть хромато-масс-спектрометрического анализа при котором происходит элюция пептидов, промывка и кондиционирование колонки (15-20 мин) градиентом не является. Изменения подачи хроматографических фаз происходят в линейном режиме.

Таблица 2 – Параметры градиента элюции пептидов с аналитической колонки для ультракороткого градиента 12* минут

Время, мин	Подача хроматографической фазы «А» (%)	Подача хроматографической фазы «Б» (%)	Скорость потока, см ³ /мин
<i>Время градиента для разделения пептидной смеси:</i>			
0	98	2	0,4
0,5	98	2	0,4
12	65	35	0,4
<i>Время промывки и кондиционирования колонки</i>			
13	2	98	0,4
16	2	98	0,4
17	98	2	0,4
20	98	2	0,4

* градиентом считается часть хромато-масс-спектрометрического анализа, при котором происходит элюция пептидов, промывка и кондиционирование колонки (13-20 мин) градиентом не является. Изменения подачи хроматографических фаз происходят в линейном режиме.

8. Перечень вспомогательных материалов.

- 1) Концентратор вакуумный Concentrator Plus (Eppendorf, США).
- 2) Центрифуга Eppendorf 5424R (Eppendorf, США).
- 3) Шприц стеклянный, номинальным объемом 500 мм³ (Hamilton, Australia).
- 4) Раствор для калибровки масс-спектрометра в положительном режиме ионизации или аттестованная смесь с установленными метрологическими характеристиками.
- 5) Весы лабораторные электронные специального (I) класса точности по ГОСТ 24104-01, с наибольшим пределом взвешивания 320 г. (№ Госреестра 25469-03);
- 6) Автоматические дозаторы переменного объема 20-200 мм³ с шагом 0,1 мм³, с точностью $\pm 0,6\%$; 100-1000 мм³ с шагом 1 мм³, с точностью $\pm 3\%$ по ГОСТ 10223-82;
- 7) Полипропиленовые пробирки (типа эппендорф) объемом 2000 мм³ по ТУ 62-2-300-80;

8) Пробирки из боросиликатного стекла с UV-защитой номинальным объемом 2 см³;

9) Вставки прозрачные из деактивированного стекла номинальным объемом 0,2 см³;

10) Колбы мерные по ГОСТ 1770-74 вместимостью 500 см³, 250 см³, 2 класса точности.

9. Вспомогательные работы, в том числе приготовление растворов для проведения масс спектрометрического анализа

Приготовление хроматографических фаз:

Хроматографическая фаза «А»: добавить 250 см³ деионизованной воды в чистый стеклянный мерный цилиндр, добавить 500 мм³ 98+% чистой муравьиной кислоты и добавить деионизованной воды до отметки 500 см³. Перенести все в чистую стеклянную колбу или бутылку для растворов.

Хроматографическая фаза «Б»: добавить 400 см³ ацетонитрила в чистый стеклянный мерный цилиндр, добавить 500 мм³ 98+% чистой муравьиной кислоты добавить деионизованной воды до отметки 500 см³ деионизованной водой. Перенести все в чистую стеклянную колбу или бутылку для растворов.

Хроматографическая фаза «С»: добавить 250 см³ деионизованной воды в чистый стеклянный мерный цилиндр, добавить 25 см³ ацетонитрила, добавить 500 мм³ 98+% чистой муравьиной кислоты, добавить 50 мм³ трифторуксусной кислоты 99%, и добавить деионизованной воды до отметки 500 см³ деионизованной водой. Перенести все в чистую стеклянную колбу или бутылку для растворов.

Приготовление раствора для калибровки масс-спектрометра в положительном режиме ионизации:

Раствор состоит из смеси кофеина (m/z 138, 195), MRFA пептида (m/z 524), Ultramark 1621 (m/z 1022, 1122, 1222, 1322, 1422, 1522, 1622, 1722, 1822), н-бутиламина (m/z 74), растворенного в ацетонитриле, деионизованной воде, метаноле с добавлением 1% уксусной кислоты.

Матричный раствор кофеина:

Приготовить навеску 1 мг кофеина и растворить в 1 см³ метанола.

Матричный раствор MRFA пептида:

Приготовить навеску 1 мг MRFA пептида и растворить в общем объеме 330 мм³ 50:50 метанола в деионизованной воде. Перенести 50 мм³ в чистую пробирку. Добавить 1,45 см³ 50:50 метанола в деионизованной воде.

Матричный раствор Ultramark 1621:

Растворить 10 мм³ раствора Ultramark 1621 в 10 см³ ацетонитрила.

Матричный раствор н-бутиламина:

Растворить 5 мм³ н-бутиламина в 9995 мм³ 50:50 метанола в деионизованной воде.

Приготовления раствора для калибровки.

Смешать 20 мм³ матричного раствора кофеина, 100 мм³ матричного раствора MRFA, 100 мм³ матричного раствора Ultramark 1621, 100 мм³ матричного раствора н-бутиламина, 100 мм³ ледяной уксусной кислоты, 5 см³ ацетонитрила. Довести полученную смесь до 10 см³ 50:50 метанолом в деионизованной воде.

10. Операции при выполнении анализа

Сохранить последовательность действий в отдельный файл с расширением *.sld*, затем нажать кнопку “Start analysis” в программном обеспечении для начала последовательности действий, записанной в файле.

11. Требования к оформлению результатов протеомного анализа

Результаты определения качественного состава белков (протеома) образца оформляют в виде электронной таблицы.

В таблице должны быть приведены следующие сведения:

- дата приготовления образцов
- дата проведения масс-спектрометрического анализа;
- количество образцов
- название образцов
- концентрация общего белка в каждом образце;
- положение образца в автосэмплере;
- должности, фамилии, инициалы сотрудников, проводивших процедуру масс-спектрометрического анализа.

12. Требования к процедуре подготовки масс-спектрометра к работе

Регулярная калибровка масс прибора обеспечивает точность измерений. Она проводится каждые 24 часа с использованием раствора для калибровки масс-спектрометра в режиме положительной ионизации, состав которого указан выше. Кроме того, калибруются параметры электроники, точность изоляции, точность анализатора и радиочастотное поле квадруполь с частотой, установленной производителем.

14. Требования к квалификации операторов

К подготовке проб, выполнению измерений и обработке их результатов допускаются штатные сотрудники лаборатории с опытом работы в биохимической лаборатории не менее одного года, обладающие соответствующим высшим образованием (либо специалисты под контролем сотрудника с соответствующим высшим образованием), владеющие техникой и навыками работы на масс-спектрометре и вспомогательном оборудовании и освоившие настоящий протокол протеомного анализа.

ПРИЛОЖЕНИЕ К

СОГЛАСОВАНО

Руководитель работ,
академик Арчаков А.И.



«28» января 2025 г.

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБМХ
Пономаренко Е.А.



«30» января 2025 г.

М.П.

ПРОТОКОЛ БИОИНФОРМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ДАННЫХ ПАНОРАМНОГО ПРОТЕОМНОГО АНАЛИЗА

СОДЕРЖАНИЕ

1. Назначение протокола
2. Область применения
3. Термины и определения
4. Допускаемая неопределенность обработки данных
5. Требования к оборудованию и программному обеспечению
6. Требования к процедуре анализа результатов масс-спектрометрических измерений
7. Требования к оформлению результатов
8. Требования к квалификации операторов

1. Назначение протокола

Данный документ «Биоинформатический анализ данных панорамного масс-спектрометрического анализа» описывает процедуру машинной обработки полученных данных при масс-спектрометрическом анализе комплексных биологических образцов с использованием ультракоротких градиентов хроматографического разделения. Масс-спектрометрический анализ осуществляется с применением метода панорамного сканирования, при котором с ионы-предшественники выделяются в заранее определенные окна изоляции и фрагментируются; затем все фрагментированные ионы в каждом окне анализируются на масс-спектрометре высокого разрешения (режим Data Independent Acquisition (DIA)). Полученные данные при панорамном масс-спектрометрическом анализе представляют собой библиотеку спектров родительских ионов и спектры их фрагментации. Сравнение экспериментальных масс-спектров пептидных ионов с теоретическими позволяет идентифицировать последовательность пептида и определить к какому белку принадлежит данная последовательность пептида. Это позволяет определить наличие конкретного белка в образце.

2. Область применения

Метод подходит для качественной и полуколичественной оценки белков с известной точной аминокислотной последовательностью.

3. Термины и определения

В настоящей методике применены термины с соответствующими определениями.

Родительский ион - ионизованный пептид, полученный в результате ферментативного гидролиза белков образца.

Фрагментация - процесс разрушения родительского иона инертным газом.

Дочерний ион - ион, полученный в результате фрагментации родительского иона.

FDR – False Discovery Rate – определяет количество возможных ложноположительных идентификаций в результатах биоинформатической обработке данных панорамной масс спектрометрии.

4. Допускаемая неопределенность обработки данных

Допускаемая уровень погрешности в идентификации белков определяется параметрами поисковой системы, а именно FDR. Согласно данному протоколу допустимо использовать значение $FDR = 1\%$, что означает, что до 1% белков могут быть ошибочно определены как положительные, то есть идентифицированные.

5. Требования к оборудованию и программному обеспечению

Допускается использование как стандартного персонального компьютера, так и вычислительного сервера, включая серверы с виртуализацией рабочих мест.

Общие требования:

Установка программного обеспечения DIA-NN в Windows рекомендуется в папку по умолчанию, предложенную программой установки.. Для этого необходимо загрузить программу установки с расширением .exe и запустить ее. Программа DIA-NN совместима с Windows 10 или 11 или с Windows Server 2016, 2019, 2022.

На системе должен быть установлен .NET Core 8.0

Системные требования к персональному компьютеру:

Минимальный размер оперативной памяти - 4 ГБ

Processor: Intel® Core i7-2600 Processor (8M Cache,3.40 GHz)

ОС: Windows® 7 Professional(64-Bit)

Основной жесткий диск: 256GB SSD Solid State Drive

Дополнительный жесткий диск: 2TB (7.2k rpm) Serial ATA II with NCQ and 16MB Data Burst Cache

Видеокарта: 512MB AMD Radeon HD 6350

USB 3.0: USB 3.0 PCI-Card

6. Требования к процедуре анализа результатов масс-спектрометрических измерений

Результаты анализа обрабатываются в программном обеспечении “DIA-NN”. Для дальнейшего анализа необходимо использовать первичные данные, полученные после масс спектрометрического анализа, например с расширением .raw в случае получения данных на масс-спектрометре типа Orbitrap.

Данные масс-спектрометрии DIA могут быть проанализированы двумя способами: с помощью поиска по базе данных последовательностей (режим «без библиотеки») или с помощью «спектральной библиотеки» - набора известных спектров и времен удерживания для выбранных пептидов. Процедура выбора способа приведена ниже.

- выберите файлы необработанных масс-спектрометрических данных в формате *.raw*.

- добавьте одну или несколько баз данных последовательностей в формате UniProt.

- при необходимости использовать спектральную библиотеку выберите библиотеку.

- в качестве альтернативы для анализа без библиотеки выберите опцию FASTA digest for library-free search/library generation, укажите имя основного выходного файла на панели Output и нажмите Run.

По окончании анализа сохраненный файл *report.tsv* в качестве основного выходного файла (по умолчанию он находится в папке установки DIA-NN) будет содержать список всех идентифицированных ионов-прекурсоров, а также различные виды количеств, метрики качества и аннотации. Выходной файл *report.pg_matrix.tsv* будет содержать количества групп белков, *report.gg_matrix.tsv* - количества групп генов, *report.pr_matrix.tsv* - количества ионов-прекурсоров.

Настройки поисковой машины в программном обеспечении “DIA-NN” рекомендуется использовать по умолчанию:

- включить функцию MBR
- ферментативный гидролиз трипсином;
- максимальное количество пропуска сайтов расщепления трипсином - 1;
- точность измерения масс родительских ионов 0.0 (определяется автоматически);
- точность измерения MS1 0,0 (определяется автоматически);
- окно сканирования 40 (если указать 00, то определяется автоматически)
- диапазон длин пептида: 7-30;
- диапазон величины заряда родительских ионов: 1-4;
- диапазон *m/z* родительских ионов: 300-1800
- диапазон масс фрагментов: 200-1800

Модификации:

- окисление метионина, сдвиг массы +15,994 как возможная модификация;
- карбамидометилирование цистеина, сдвиг массы +57,021 как фиксированная модификация;

Для валидации сопоставлений (образования пар) спектров и пептидов использовать величину FDR (False Discovery Rate) = 1,0%. Для каждого целевого предшественника в спектральной библиотеке генерируется ложный предшественник, если он не представлен в библиотеке. По умолчанию это делается путем замены значений m/z ионов фрагментов целевого предшественника в предположении, что аминокислоты, примыкающие к терминам пептидов, были мутированы (используется шаблон мутации GAVLIFMPWSCTYHKRQEND to LLLVVLLLLTSSSSLNDQE)..

7. Требования к оформлению результатов

Результаты определения качественного состава белков с полуколичественной оценкой содержания белков оформляют в виде электронной таблицы.

8. Требования к квалификации операторов

К выполнению процедур биоинформатического анализа и обработке результатов допускаются штатные сотрудники лаборатории с опытом работы не менее одного года, обладающие соответствующим высшим образованием (либо специалисты под контролем сотрудника с соответствующим высшим образованием), владеющие техникой и навыками работы с программным обеспечением DIA-NN.

ПРИЛОЖЕНИЕ Л

Список из 17 исследований, в которых ранее сообщалось о возрастной зависимости белков плазмы или сыворотки крови.

№	PMID публикации	Год	Страна	Метод	Биоматериал	Количество возраст-ассоциированных белков	Количество образцов	Возраст, лет (диапазон или среднее $\pm$ стандартное отклонение)	Пол, количество образцов или %
1	26619799	2015	Швеция	Olink	сыворотка и плазма	77	974	14 - 94	510 женщин, 464 мужчин
2	29992704	2018	США	SOMAscan	плазма	217	240	22 – 93	женщины и мужчины
3	33210602	2020	Швеция	SOMAscan	плазма	651	997	21 - 102	45% мужчины, 55% женщины
4	31806903	2020	США	SOMAscan	плазма	373	4263	18 – 95	2146 женщин, 2117 мужчин
5	38747160	2024	США	Olink	плазма	128	53021	39 - 70	н/д
6	25123647	2015	США	SOMAscan	плазма	13	206; 677	65,30 $\pm$ 6,92; 76,96 $\pm$ 7,06	206 (100%) женщин; 420 (62%) женщины

Продолжение таблицы

№	PMID публикации	Год	Страна	Метод	Биоматериал	Количество возраст-ассоциированных белков	Количество образцов	Возраст, лет (диапазон или среднее $\pm$ стандартное отклонение)	Пол, количество образцов или %
7	32311500	2020	н/д	Мета-анализ различных протеомных методов	Плазма, печень, латеральная широкая мышца бедра, сыворотка, слезная жидкость, слюна, дермальные фибробласты, эпителиальная ткань толстой кишки, Т-клетки, спинномозговая жидкость, лимфоциты и предшественники, предшественники гранулоцитов, мезенхимальные стволовые/стромальные клетки, моча, лобная кора, обонятельная щель, моноциты/ макрофаги и предшественники	32	36 различных протеомных анализов, 3301 человек	18–76	н/д
8	39117878	2024	Великобритания	Olink	плазма	204	45,441	30–79	54% женщины
9	33031577	2020	США	SOMAscan	плазма	529	4,263; 3,301	18–95; 18-76	н/д
10	36911498	2023	США, Исландия	Данные 6 исследований с помощью технологии SOMAscan	сыворотка и плазма	273	6 исследований (66798 человек)	49 $\pm$ 16,7; 34 $\pm$ 13,4; 75.8 $\pm$ 6,7; 55 $\pm$ 17; 105,7 $\pm$ 3,6; 70,6 $\pm$ 7,8	150 (17% женщины); 745 (55% женщины); 1025 (56% женщины); 35 559 (57% женщины); 142 (51% женщины); 29 (41% женщины)

Продолжение таблицы

№	PMID публикации	Год	Страна	Метод	Биоматериал	Количество возраст-ассоциированных белков	Количество образцов	Возраст, лет (диапазон или среднее $\pm$ стандартное отклонение)	Пол, количество образцов или %
11	33730416	2021	Швеция, США, Великобритания, Испания, Китай, Польша, Франция, Германия	ЖХ-МС/МС, SOMAscan, PEA, O-Link	плазма и другие биоматериалы	232	33 публикации, 12 посвященных плазме человека, 9 - 14 различных биоматериалов человека и 12 публикаций, охватывающих 21 различный вид биоматериала	14 - 103	н/д
12	29399943	2018	США	ЖХ-МС/МС, SRM	сыворотка	44	2473	73,6 $\pm$ 5,8	2473 мужчины
13	32100723	2020	Испания	ЖХ-МС/МС	плазма	49	18	100–103; 67–81	Здоровые долгожители (n=9, 5 женщин); контрольная группа (n=9, 5 женщин)
14	31601169	2019	Китай	ЖХ-МС/МС	плазма	74	8	87,25 $\pm$ 9,287; 26,25 $\pm$ 2,986	Женщины и мужчины
15	30485681	2018	Китай	ЖХ-МС/МС	плазма	175	66	32-56	40 женщин, 26 мужчин
16	31139026	2019	Китай	ЖХ-МС/МС	плазма	17	66	33-56	40 женщин, 26 мужчин
17	37341993	2023	Швеция	ЖХ-МС/МС, MRM	плазма	612	103	55,30 $\pm$ 17,50	12 женщин, 91 мужчина

ПРИЛОЖЕНИЕ М

СОГЛАСОВАНО

Руководитель работ,
академик Арчаков А.И.



«20» ноября 2024 г.

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБМХ
Пonomarenko E.A.



«30» ноября 2025 г.
М.П.

АКТ

ПОЛУЧЕНИЯ (СИНТЕЗА) ПЕПТИДНЫХ СТАНДАРТОВ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОГО МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ

г. Москва

19.11.2024 г.

Настоящим удостоверяется, что в рамках Соглашения № 075-15-2024-643 от 12 июля 2024 года, заключенного с Федеральным государственным бюджетным научным учреждением "Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича" согласно п.1.10 ПГ синтезированы 49 пептидных изотопно-меченных стандарта для направленного масс-спектрометрического профилирования которые отвечают требованиям п. 3.10, п.4.10 и п.5.10 ТЗ. Перечень пептидов с указанием изотопно-меченого остатка, степени чистоты, определенной при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии, концентрации, определенной при помощи аминокислотного анализа, и количества каждого пептида приведены ниже.

Маркировка пептида в синтезе	Аминокислотная последовательность пептида*	ID белка	Степень чистоты, %	Концентрация пептида пМ/мкл	Количество пептида, мкг
03_A1	IALGGLFPASNL R	P04278	99,9	170,4	247,4
03_A2	VPTGGVEEGLLE R	P01880	99,9	73,3	100,1
03_A6	NFPSPVDAA F R	P02790	99,3	40,7	100,2
03_B9	YLTLNTEST R	P06276	95,4	155,6	187,9
03_D4	YAATSQVLLPS K	P01871	99,0	48,7	125,2
03_E10	FQSVFTV T R	P02747	95,9	198,1	216,8
03_E8	NIQSLEVIG K	P02775	99,9	180,6	200,2
03_G1	TEGDGVYTLNNE K	P00738	96,9	69,8	101,1
03_G8	LLDSLPSD T R	P05155	99,9	150,6	169,7
04_B9	LSSGLVTAALY G R	P43251	99,9	99,0	130,5
04_C4	SNALDIIFQTDLTGQ K	P09871	95,4	103,1	182,7
04_C5	VPGTSTSATLTGLT R	P02751	98,7	28,8	127,2
04_G7	LEQGENVFLQATD K	P02746	98,5	44,3	141,8
04_H9	AIGYLNTGY Q R	P01023	99,9	83,8	106,0
06_A11	LQGTLPVEA R	P01031	95,6	436,5	477,4
06_B11	DGAGDVA F V K	P02787	98,3	55,7	109,8
07_B4	ANRPFLV F I R	P01008	99,9	761,9	473,4
07_G4	STGSWSTL K	P00751	99,1	1473,5	478,7
07_H2	GPSVFPLAPCS R	P01861	99,7	233,9	290,2
08_F3	ATNYNAGD R	P61626	99,1	380,9	377,6
82_1_C4	GSESGIFTNT K	P02671	98,4	464,2	266,6
82_2_A1	LSGLLDLAL G K	P04745	98,3	164,4	182,1
82_2_A2	ATEHLSTLSE K	P02647	99,9	188,0	230,1
82_2_C1	TGISPLAL I K	P04114	96,8	722,6	368,8
82_2_C3	IVVVTAGV R	P07195	99,9	132,2	122,1
07_H3	FSGTWYAMA K	P02753	99,9	520,2	304,2
03_A9	NALALFVL P K	P05543	95,3	164,6	180,0
03_C10	TPLTATLS K	P01876	95,9	414,3	389,2
03_C4	GPSVFPLAPSS K	P01857	99,1	461,9	226,9
03_D12	FDPSLT Q R	P08697	99,7	150,3	146,4
03_E5	HSIFTPETN P R	P00747	96,1	79,8	104,5
03_G9	VEHSDLSFS K	P61769	96,4	121,1	140,0
03_H12	FSVVY A K	P02765	95,3	258,0	211,9
03_H9	SALVLQYL R	P00740	98,6	45,2	145,5
04_A5	DASGATFTWTPSSG K	P01877	99,3	340,7	172,7
04_B5	DNENVVNEYSSELE K	P02675	98,7	259,0	460,2
04_B7	LVAYYTLIGAS Q R	P01024	99,9	65,4	199,0
04_D5	YVGGQE ^H FAHLLIL R	P02763	99,9	158,1	278,7
04_E7	DSTYSLSSTLTLS K	P01834	99,9	115,5	174,5

Продолжение таблицы

Маркировка пептида в синтезе	Аминокислотная последовательность пептида*	ID белка	Степень чистоты, %	Концентрация пептида пМ/мкл	Количество пептида, мкг
04_F8	GAYPLSIEPIG VR	P00450	98,7	97,2	134,3
04_H8	YEASILTHDSS IR	P02679	99,9	81,6	122,6
06_F6	AADDTWEPFAS GK	P02766	99,9	317,0	444,7
07_A2	YLS ¹³ DHSFLVSQ GDR	P04275	98,9	318,0	259,8
07_A3	ALQDQLVLVA AK	P01019	97,6	154,4	197,1
07_A4	LSITGTYD LK	P01009	99,9	943,6	351,8
08_B2	GWVTDGFSS LK	P02656	99,9	84,5	101,7
10_A05	GTYSTTVT GR	P08519	98,4	348,3	366,6
82_1_D2	ALDFAVGEY NK	P01034	99,9	147,2	181,8
82_2_D1	VYFAGF PR	P07225	98,2	218,6	211,2

Примечание: *- жирным шрифтом выделена изотопно меченая аминокислота (содержащая тяжелые атомы углерода C13 и азота N15).

Руководитель работ,

д.б.н., зав. лаб. системной биологии

 В.Г. Згода

Исполнитель работ,

к.б.н., с.н.с. лаб. системной биологии

 Т.Е. Фарафонова

ПРИЛОЖЕНИЕ Н
ХРОМАТОГРАММЫ, ПОДТВЕРЖДАЮЩИЕ ЧИСТОТУ
СТАНДАРТОВ, РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗМЕРЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ
СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ.

Результаты хромато-масс-спектрометрического анализа пептидов приведены на рисунках 1-49.

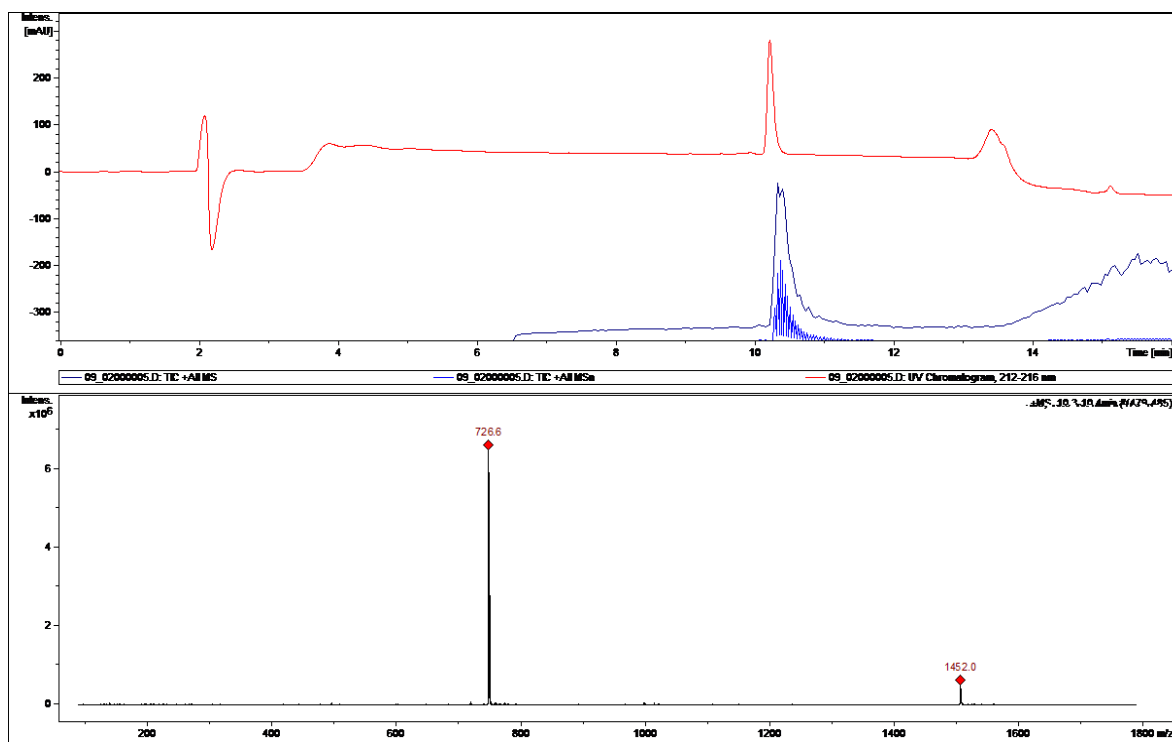


Рисунок 1 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 03_A1 (IALGGLFPASNLR)

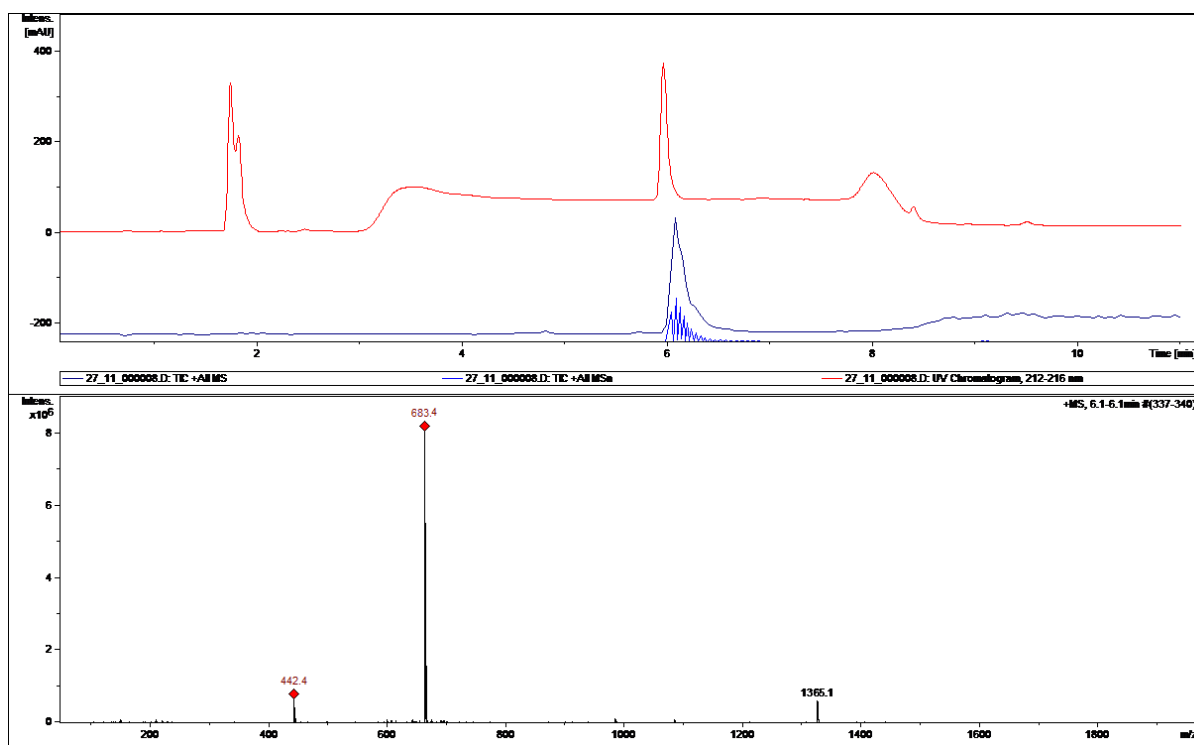


Рисунок 2 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 03_A2 (VPTGGVEEGLLER)

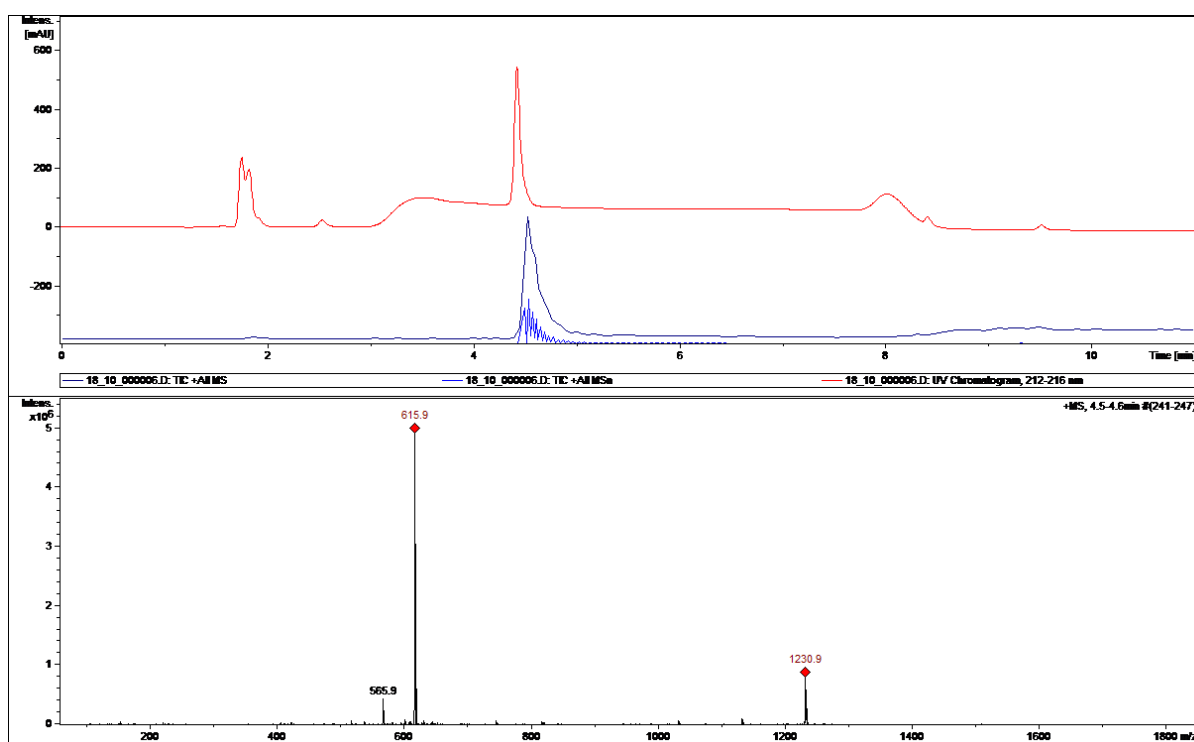


Рисунок 3 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 03_A6 (NFPSPVDAAFR)

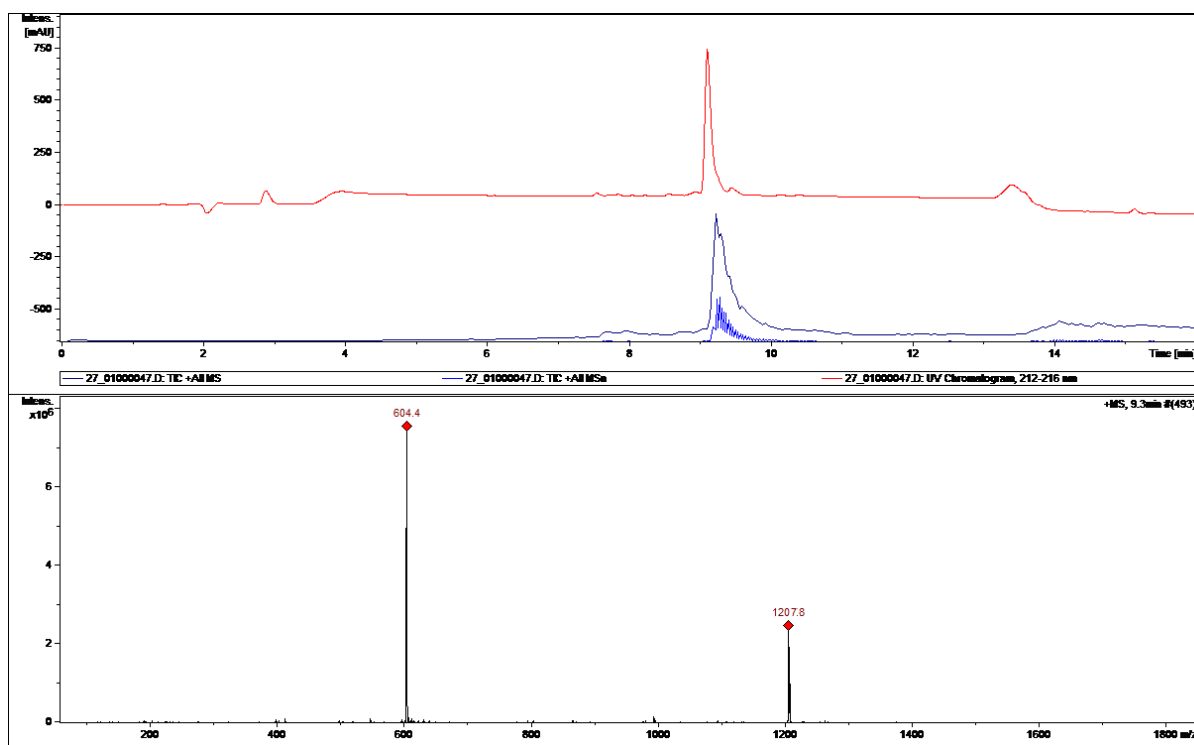


Рисунок 4 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 03_B9 (YLTLNTESTR)

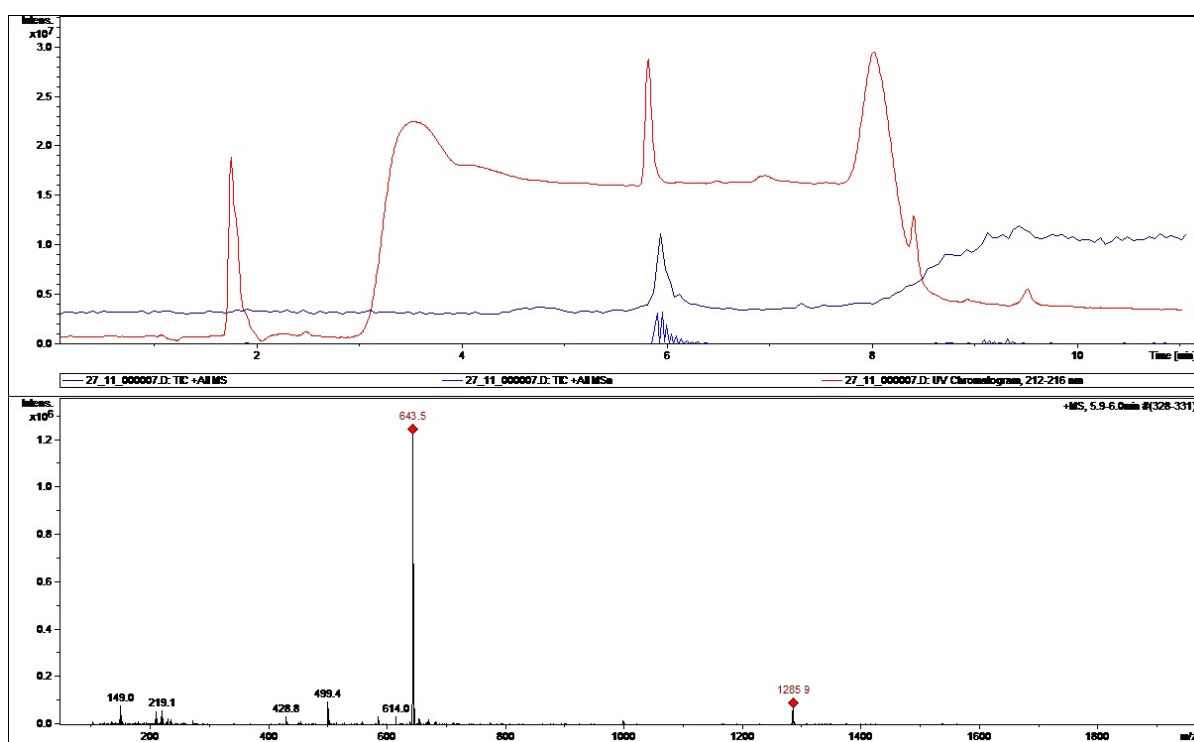


Рисунок 5 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 03_D4 (YAATSQVLLPSK)

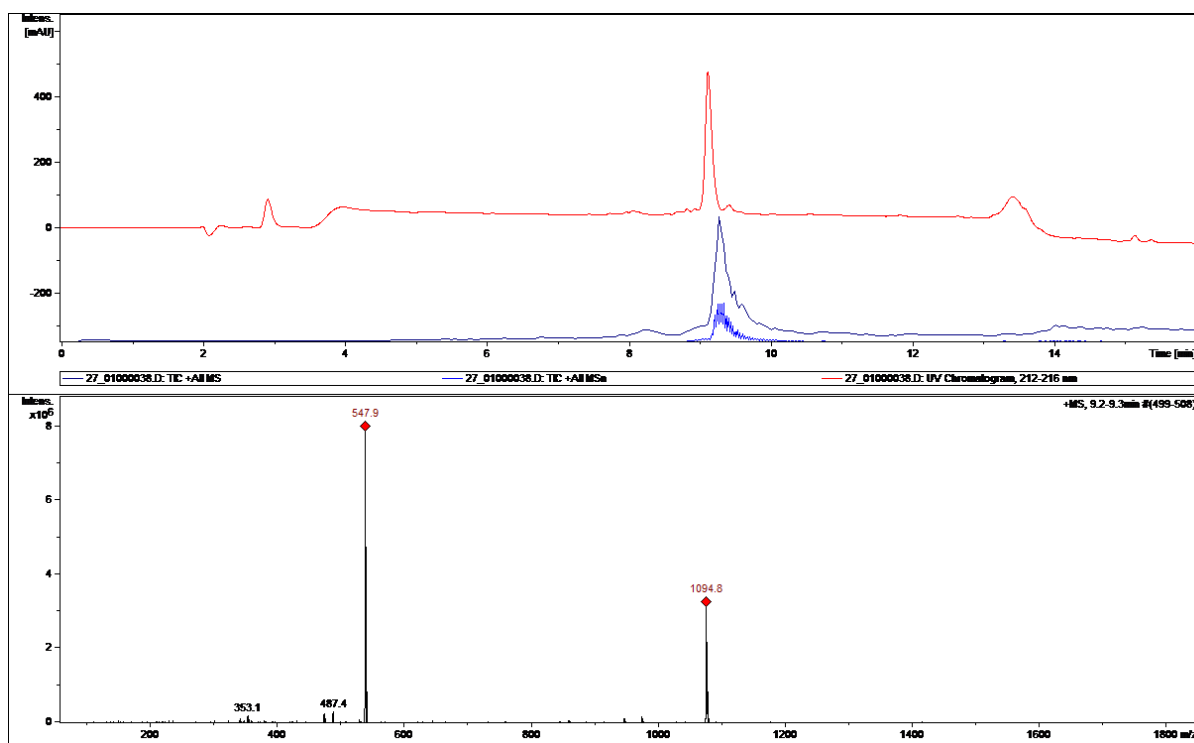


Рисунок 6 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 03_E10 (FQSVFTVTR)

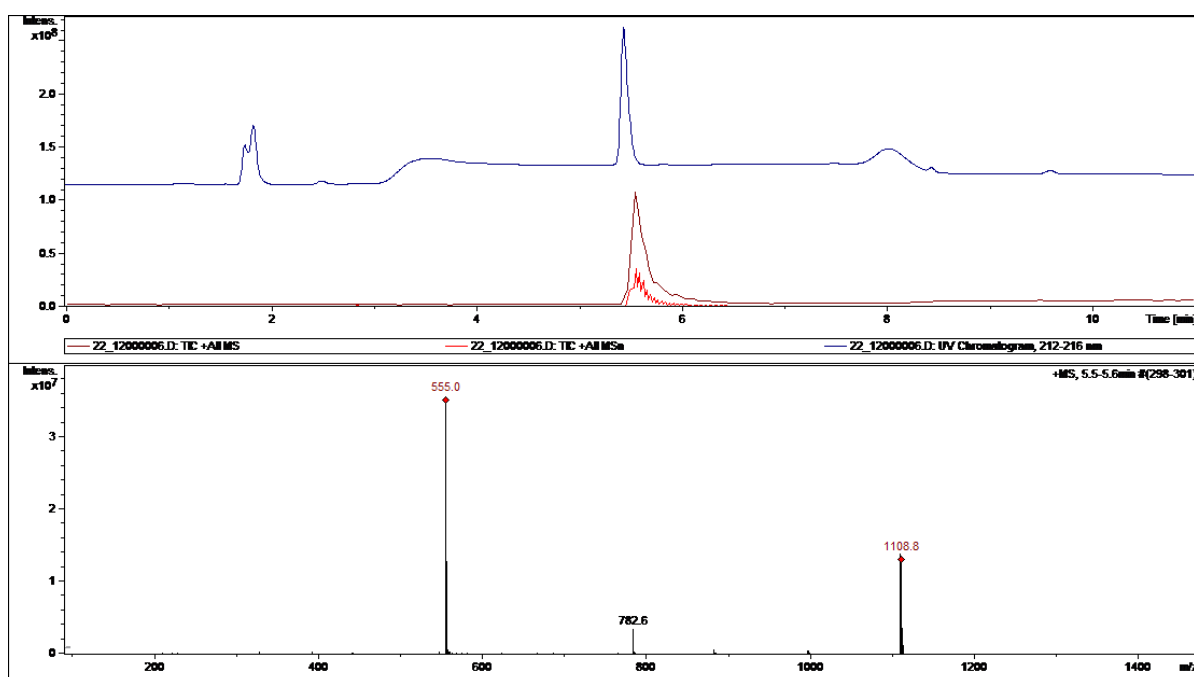


Рисунок 7 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 03_E8 (NIQSLEVIQK)

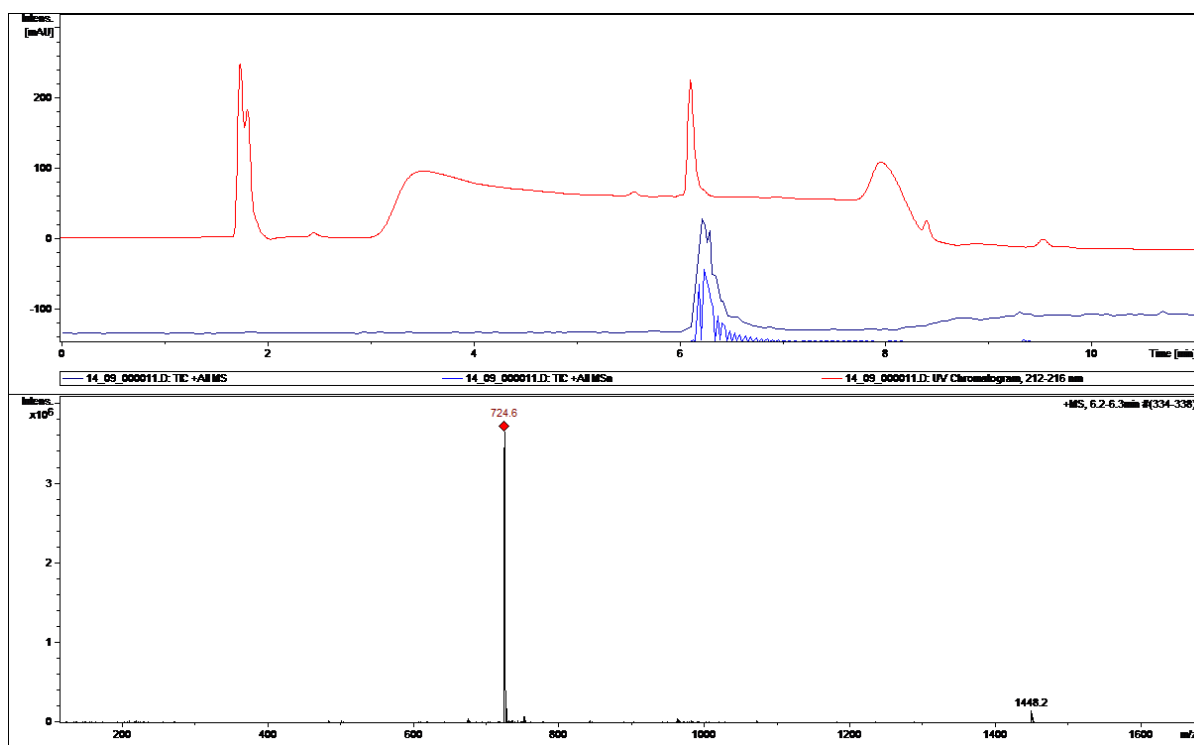


Рисунок 8 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 03_G1 (TEGDGVYTLNNEK)

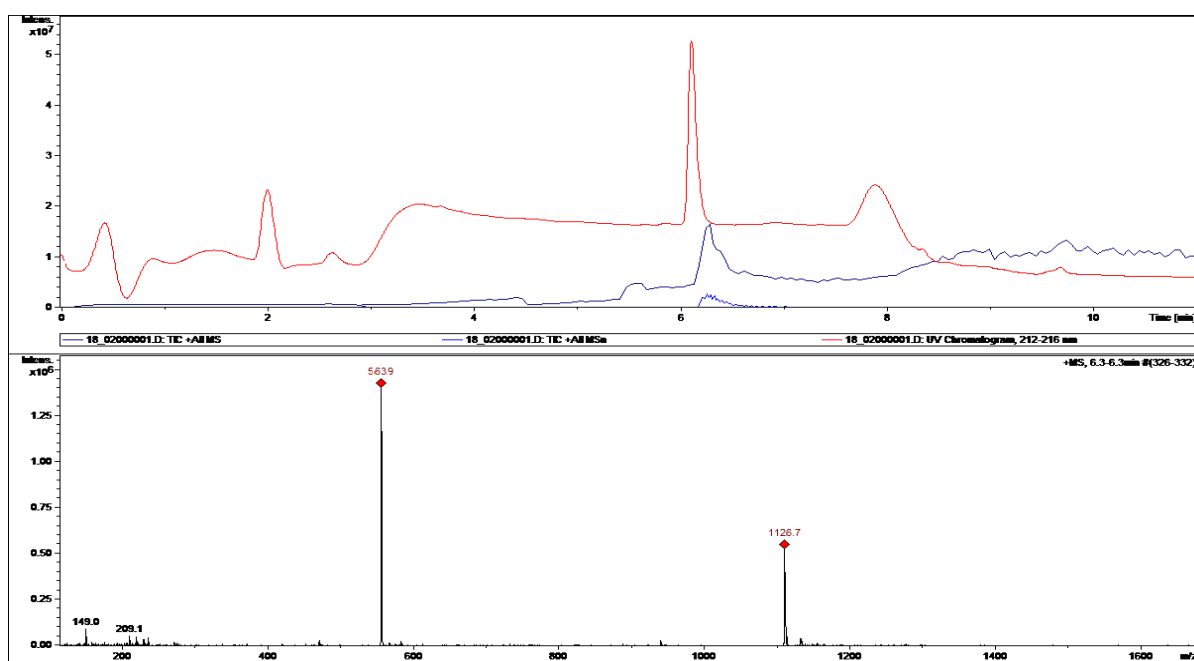


Рисунок 9 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 03_G8 (LLDSLPSDTR)

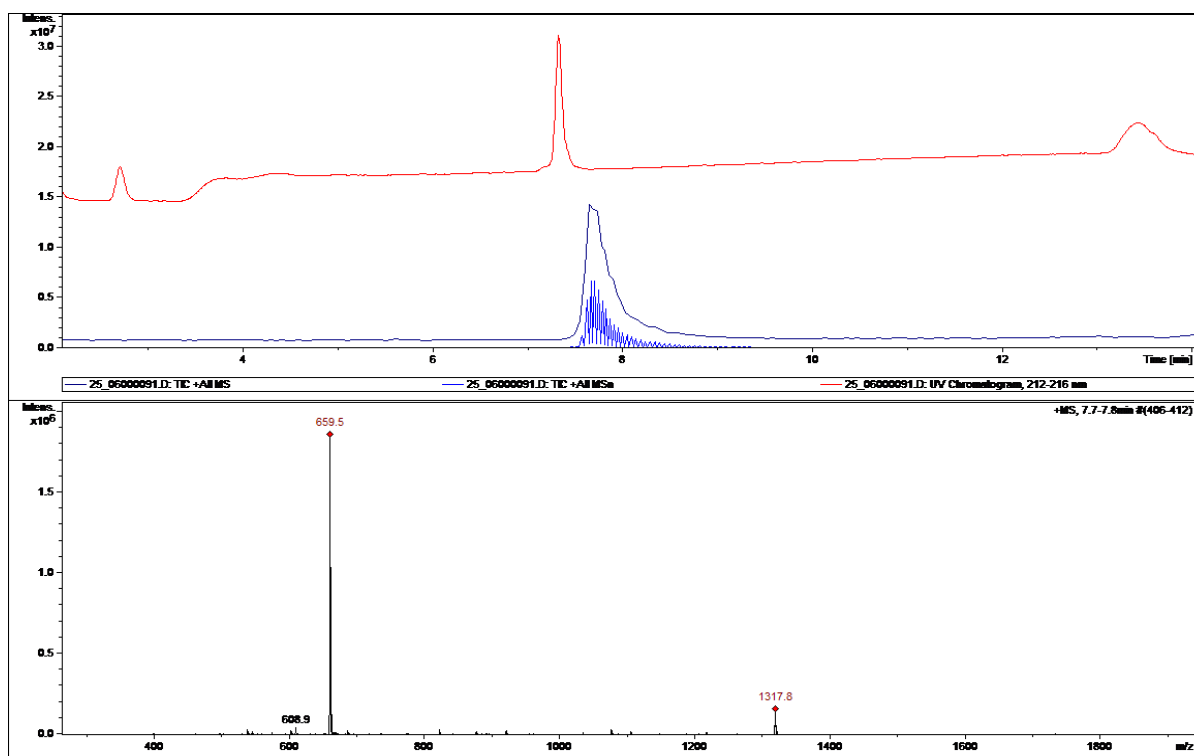


Рисунок 10 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 04_B9 (LSSGLVTAALYGR)

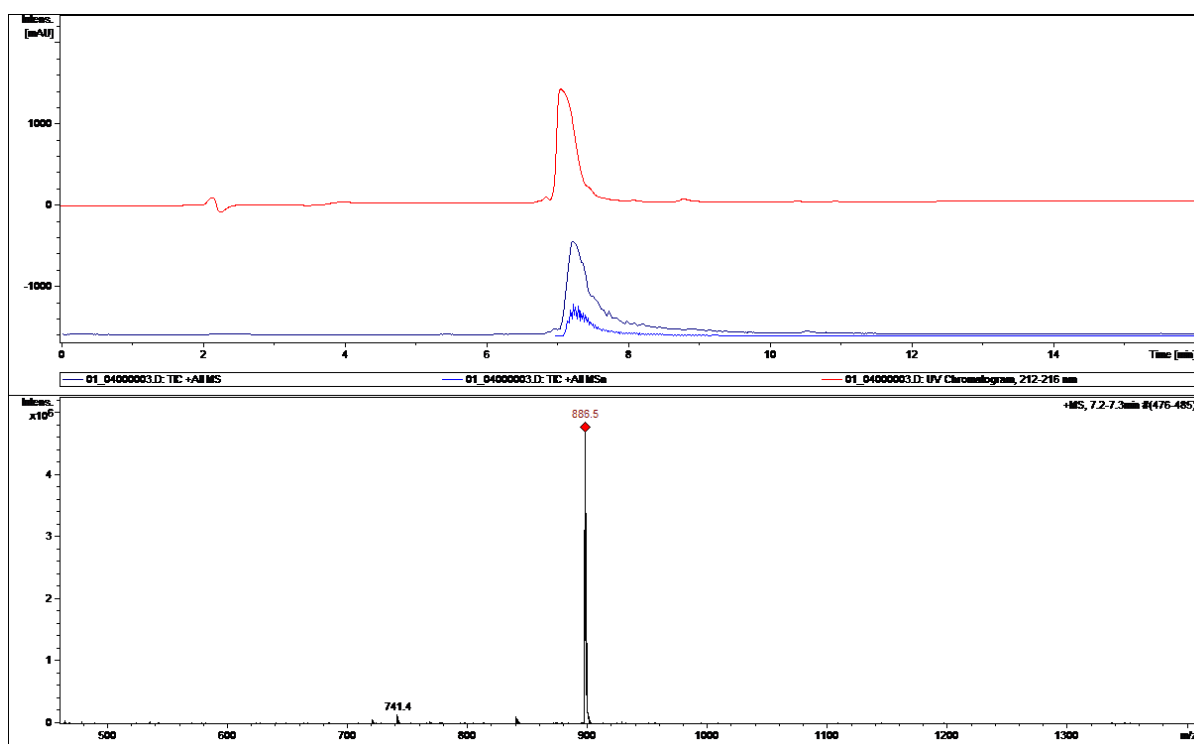


Рисунок 11 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 04_C4 (SNALDIIFQTDLTGQK)

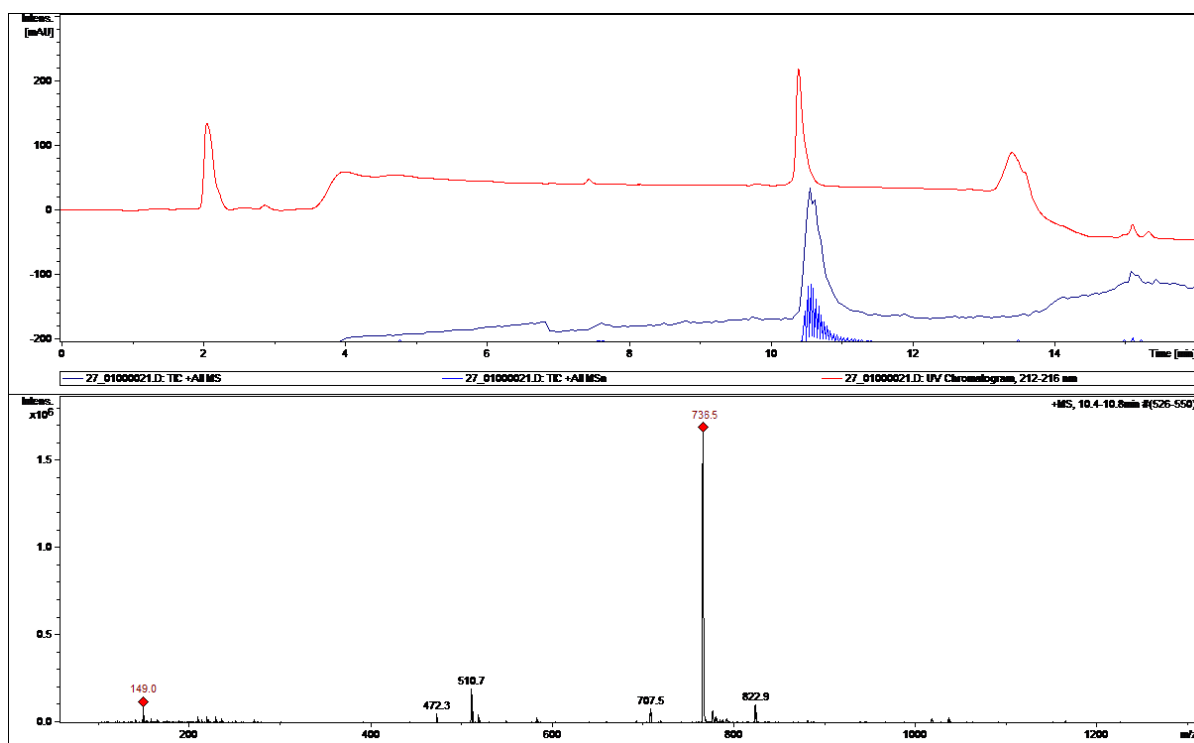


Рисунок 12 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 04_C5 (VPGTSTSATLTGLTR)

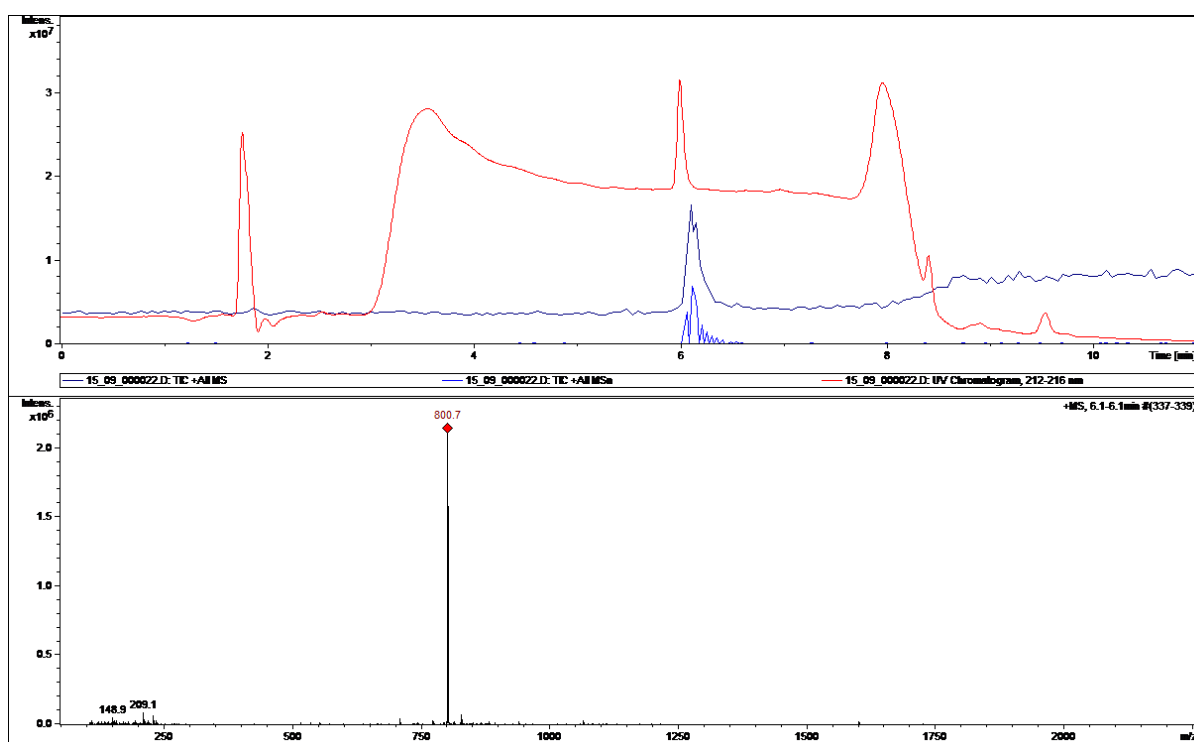


Рисунок 13 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 04_G7 (LEQGENVFLQATDK)

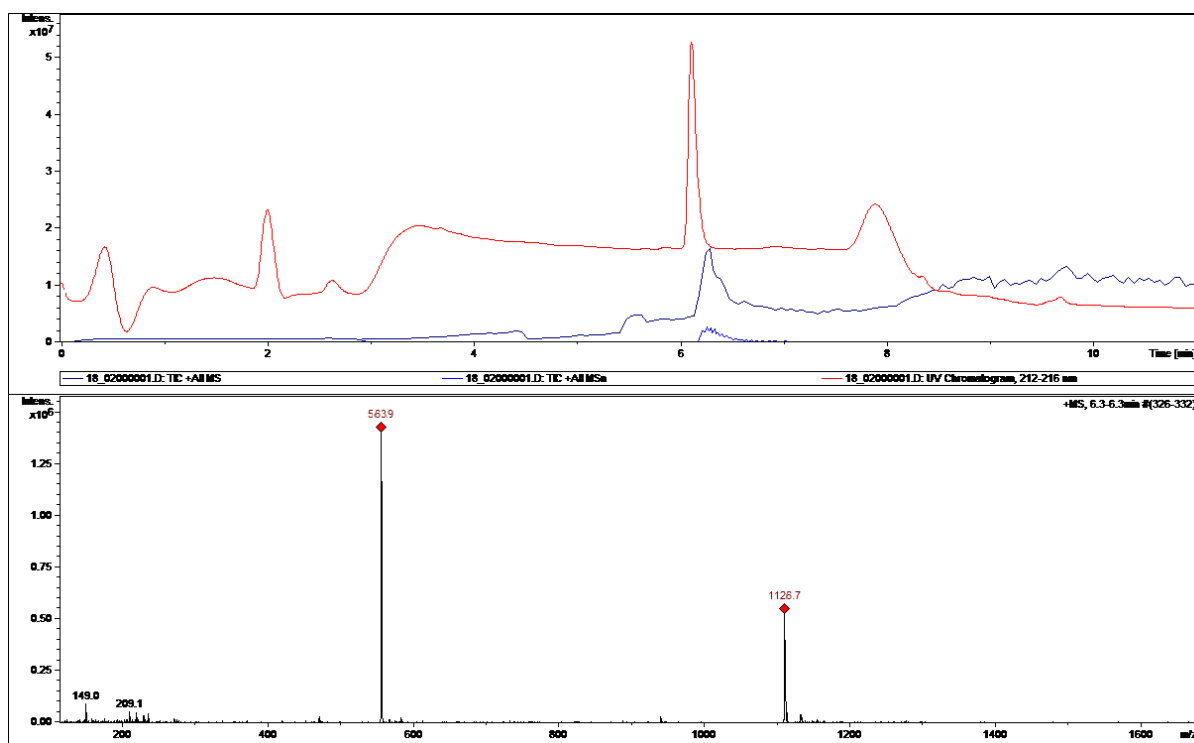


Рисунок 14 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 04_H9 (AIGYLNTGYQR)

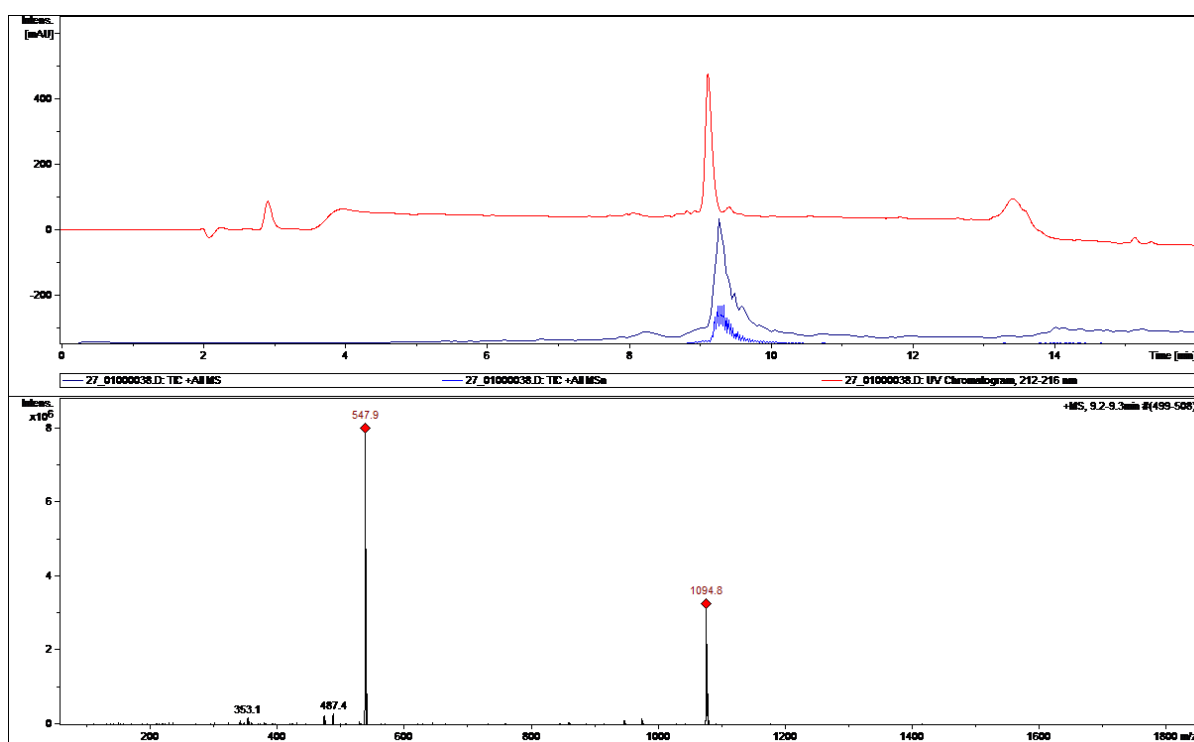


Рисунок 15 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 06_A11 (LQGTLPVEAR)

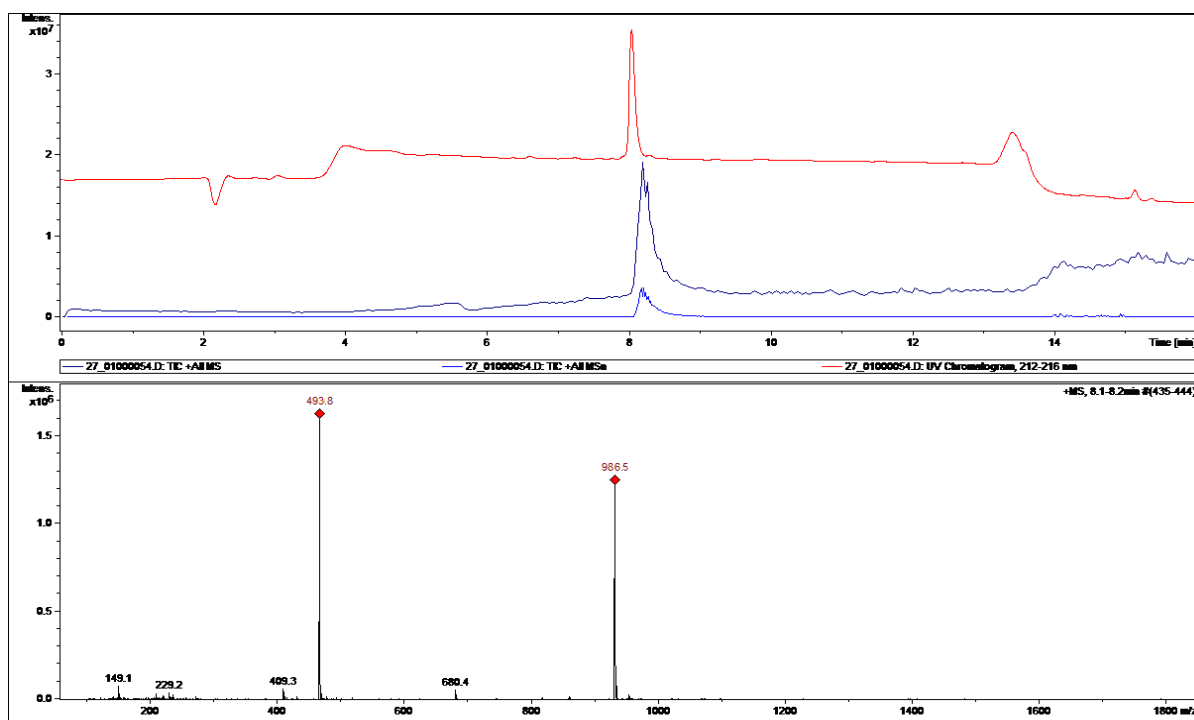


Рисунок 16 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 06_B11 (DGAGDVAFVK)

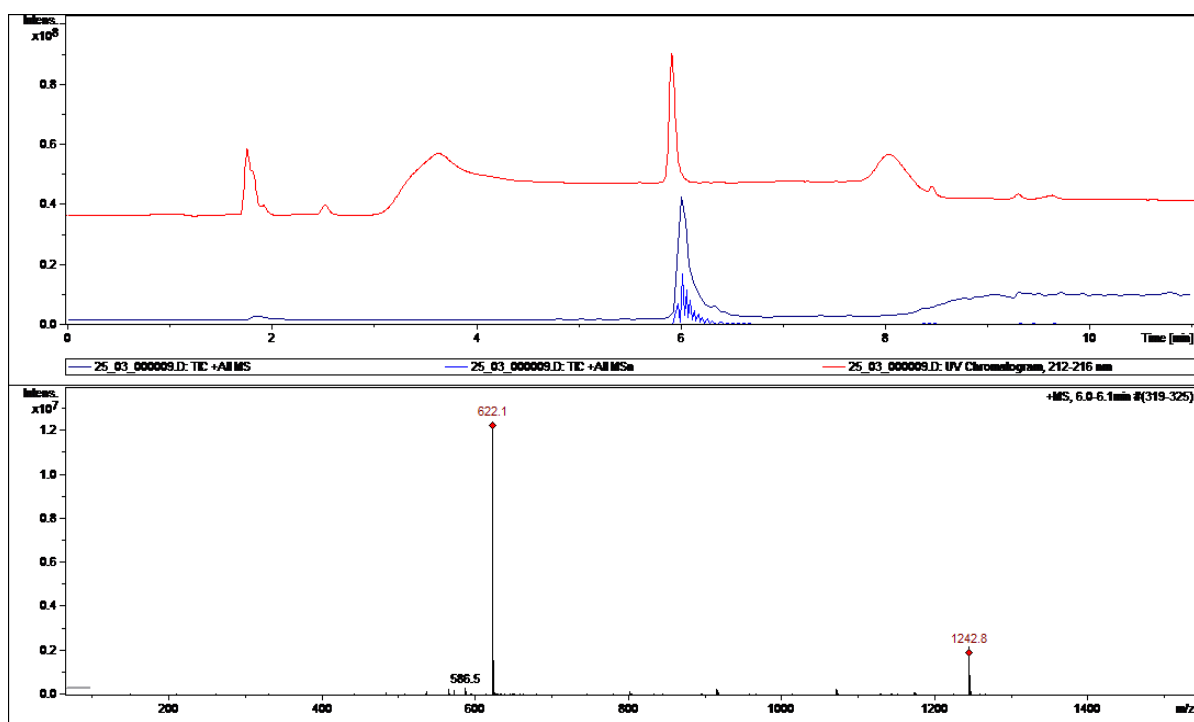


Рисунок 17 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 07_B4 (ANRPFLVFIR)

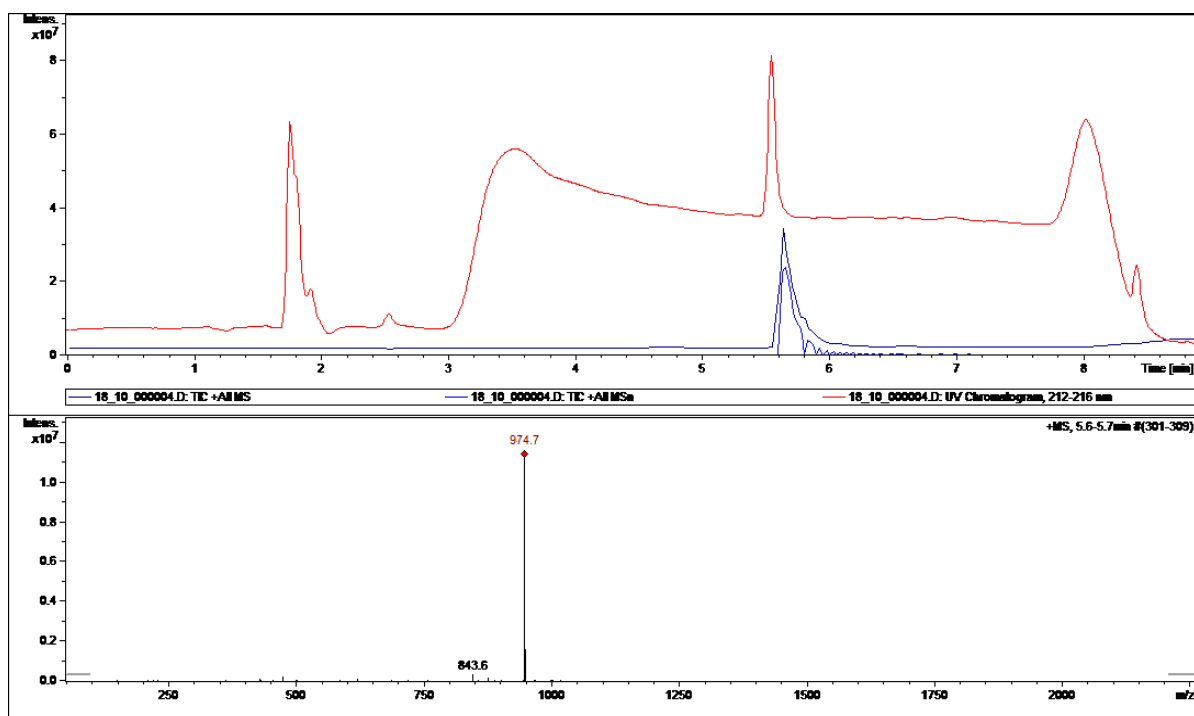


Рисунок 18 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 07_G4 (STGSWSTLK)

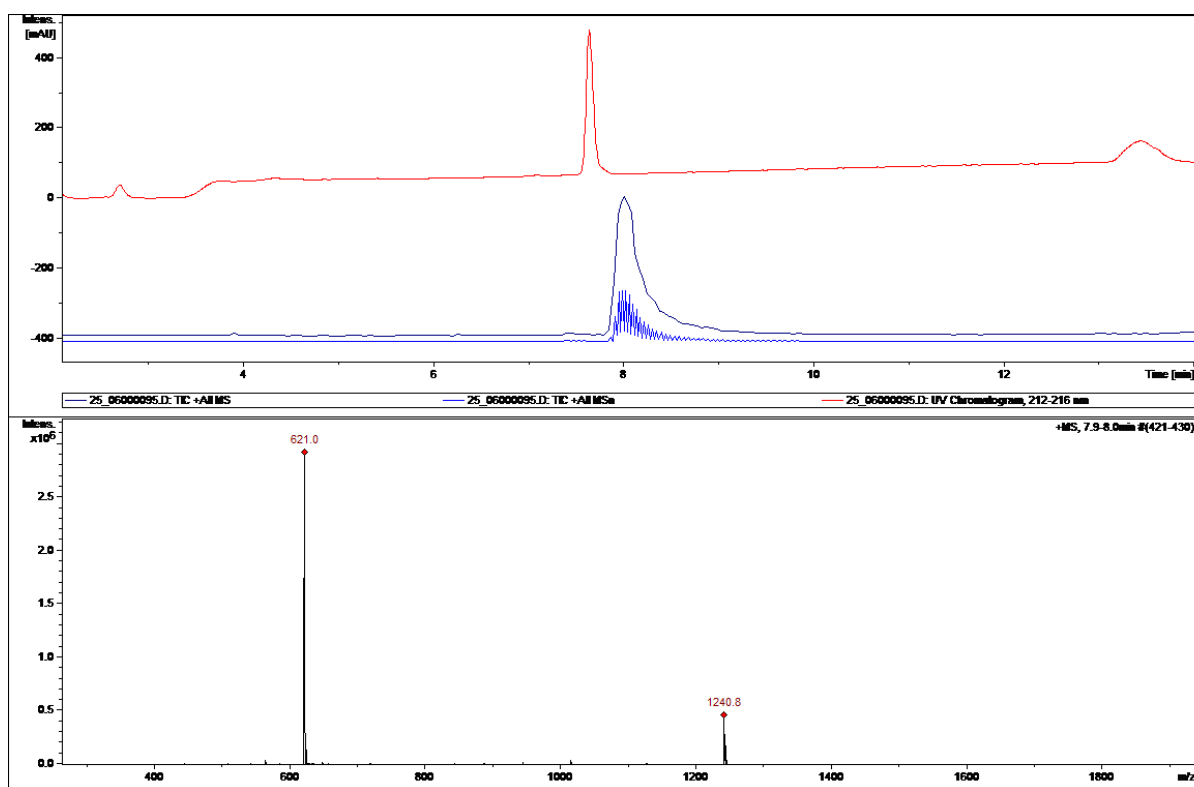


Рисунок 19 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 07_H2 (GPSVFPLAPCSR)

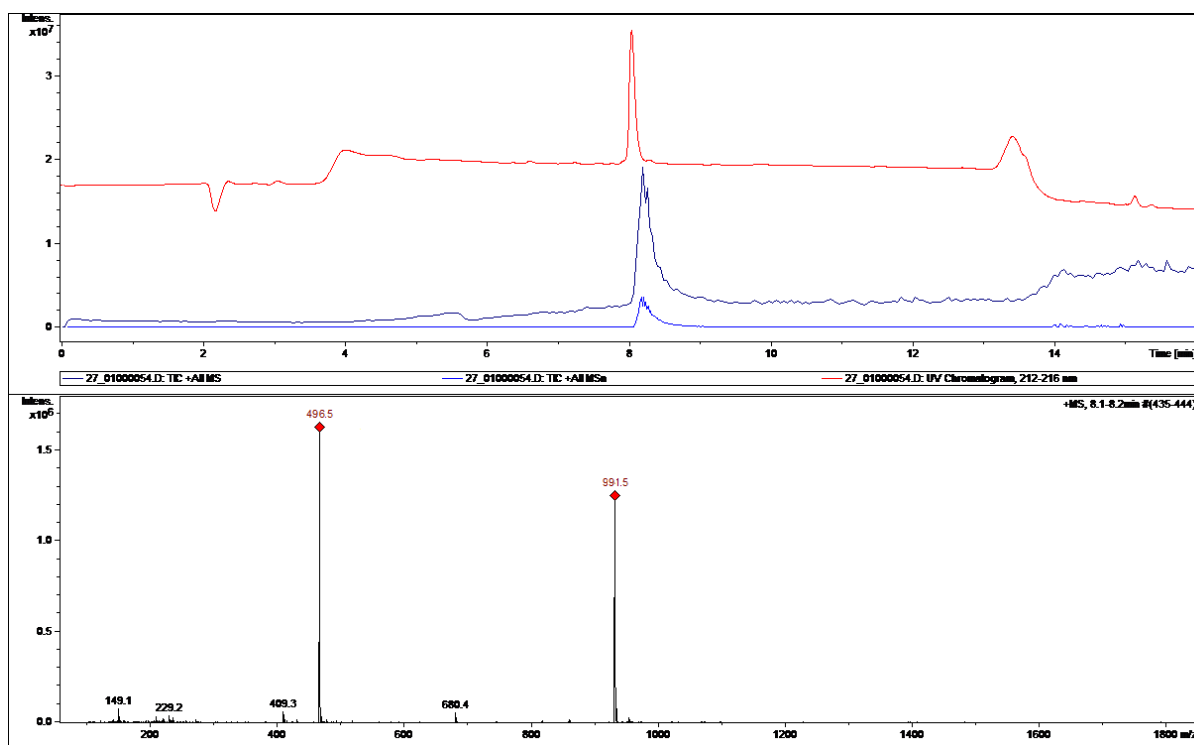


Рисунок 20 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 08_F3 (ATNYNAGDR)

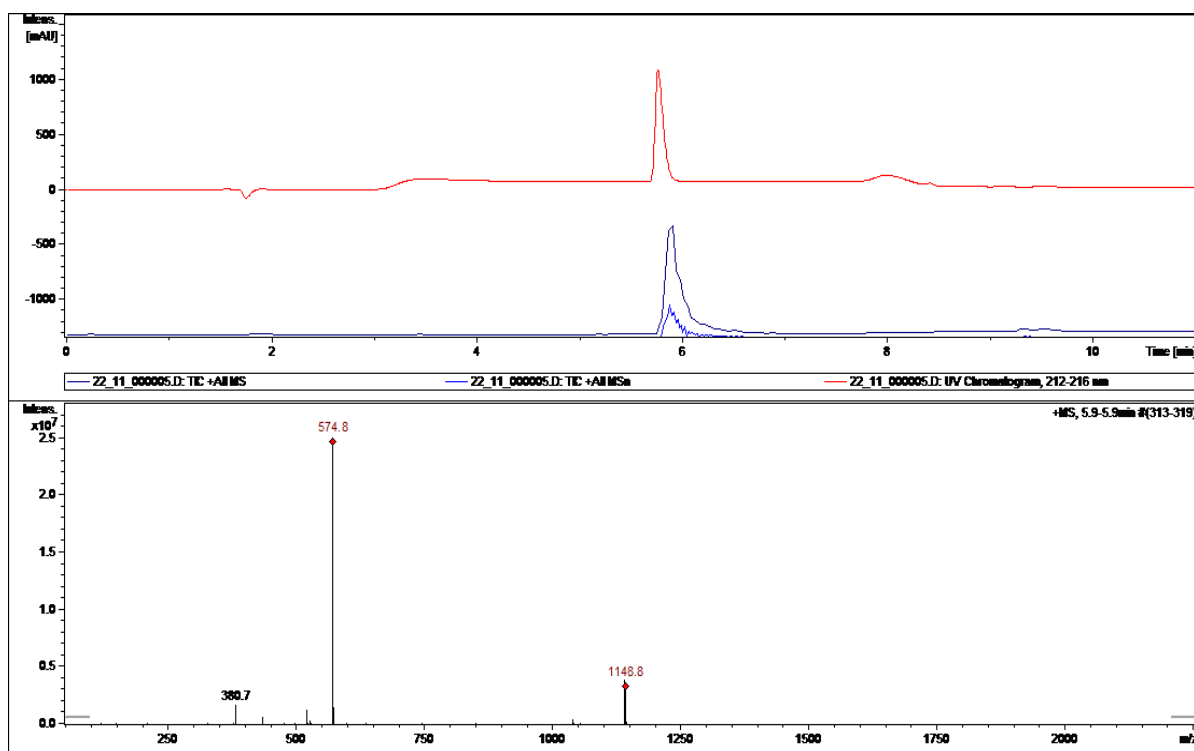


Рисунок 21 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 82_1_C4 (GSESGIFTNTK)

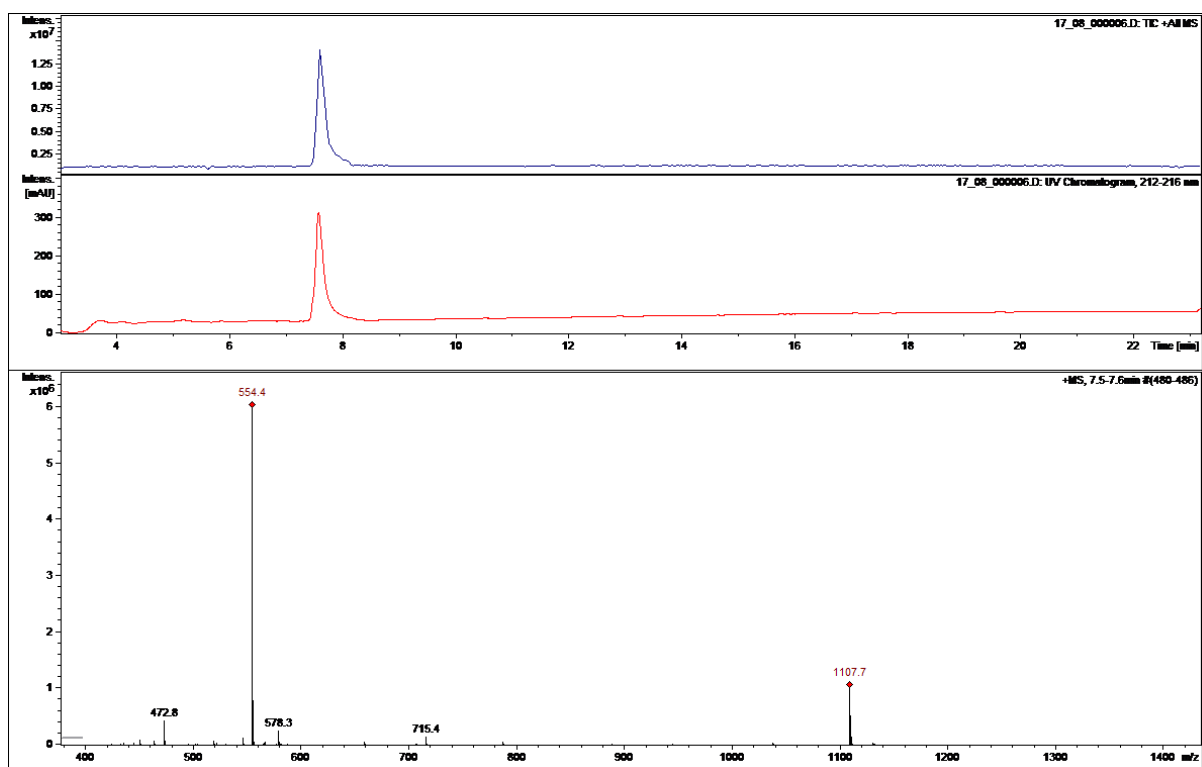


Рисунок 22 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 82_2_A1 (LSGLLDLALGK)

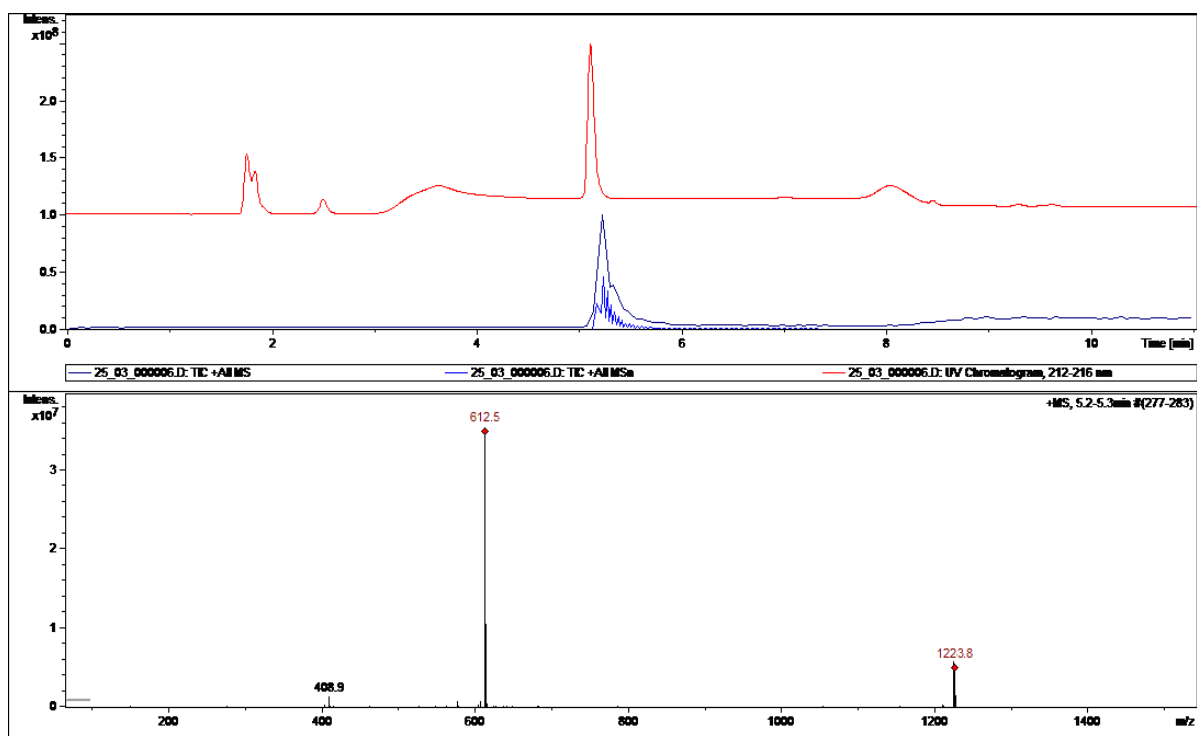


Рисунок 23 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 82_2_A2 (ATEHLSTLSEK)

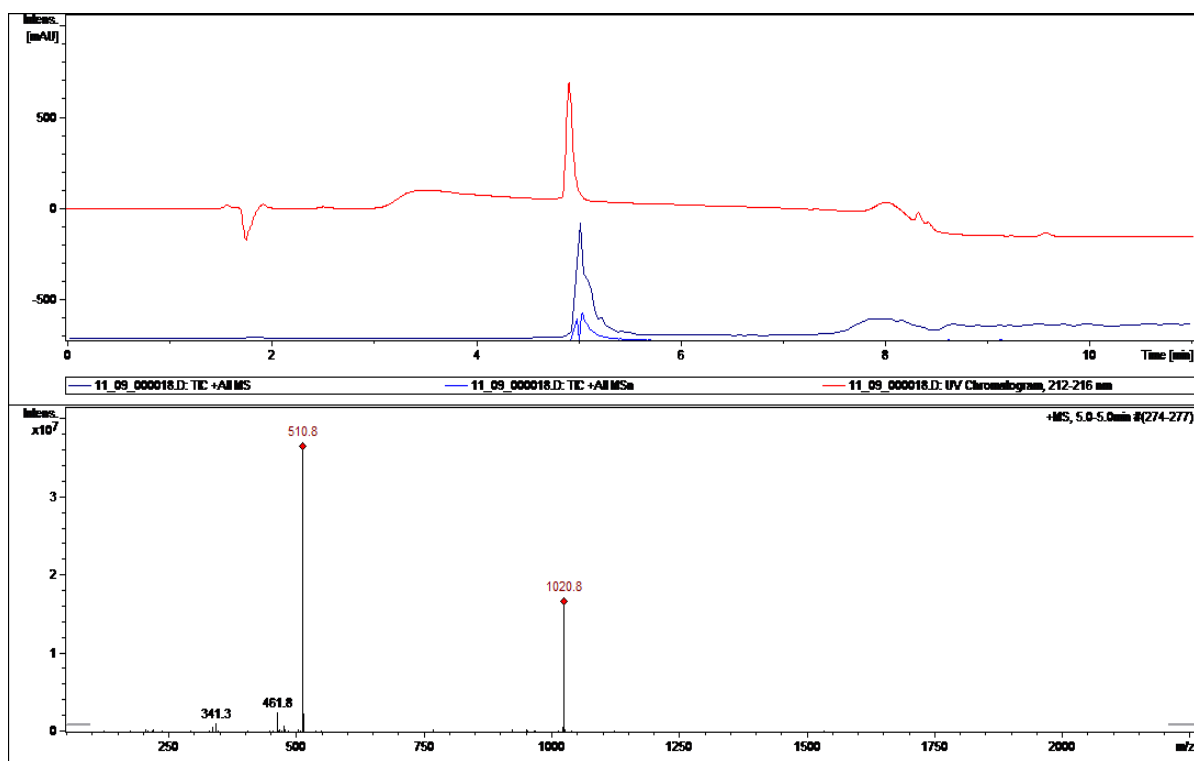


Рисунок 24 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 82_2_C1 (TGISPLALIK)

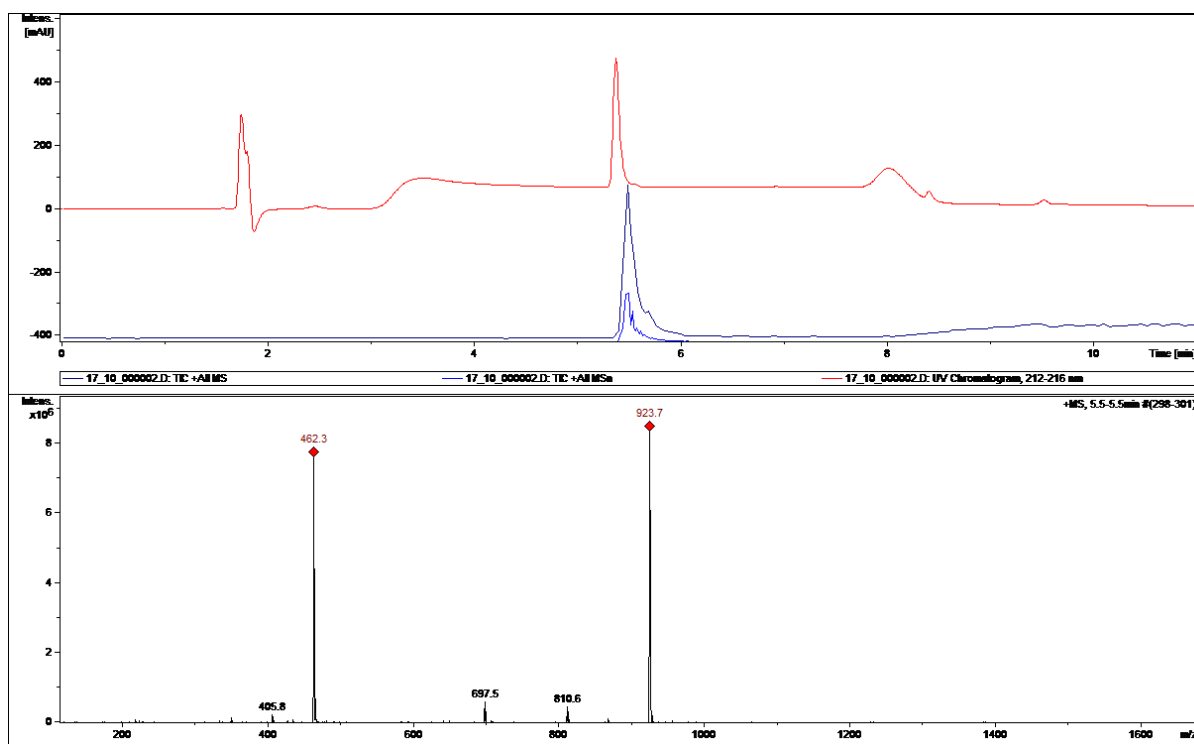


Рисунок 25 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 82_2_C3 (IVVVTAGVR)

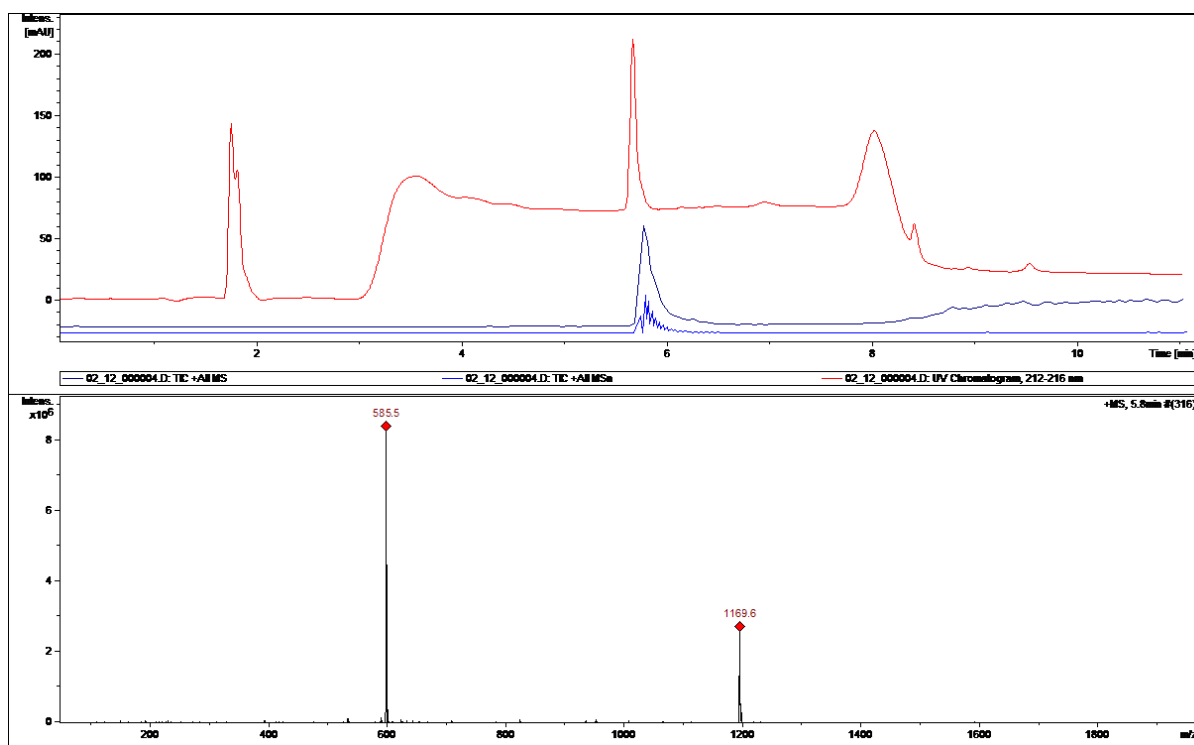


Рисунок 26 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 07_H3 (FSGTWYAMAK)

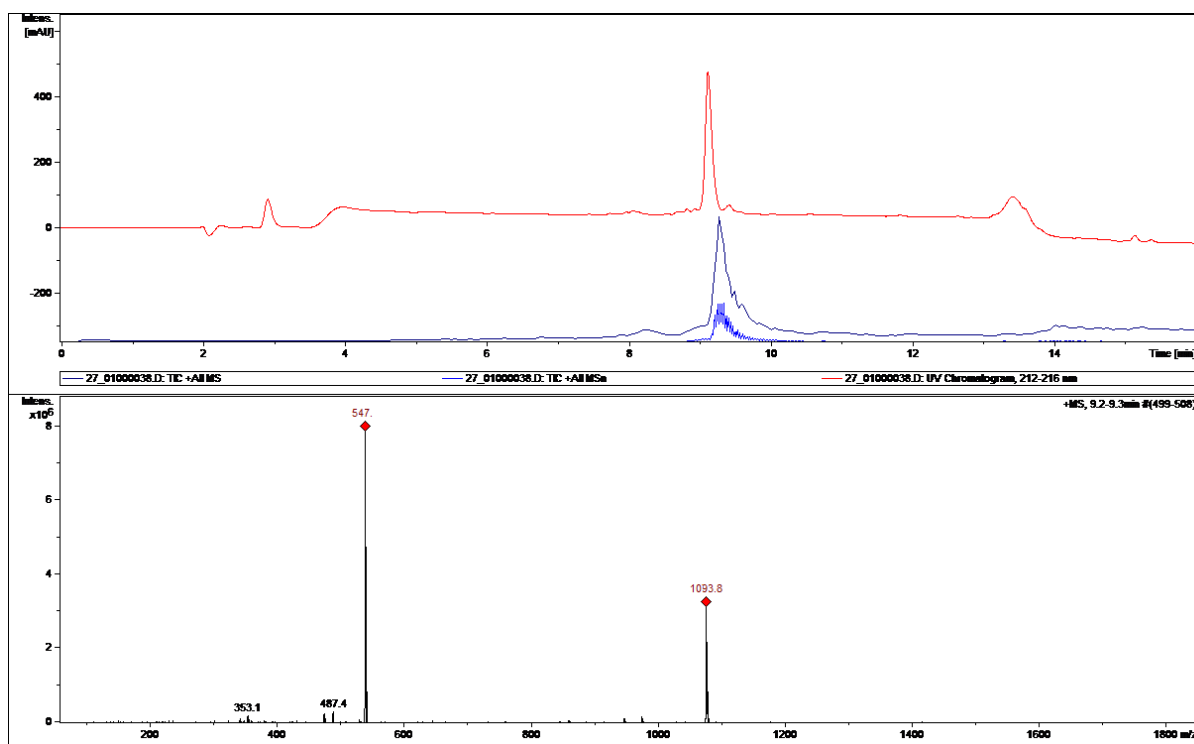


Рисунок 27 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 03_A9 (NALALFVLPK)

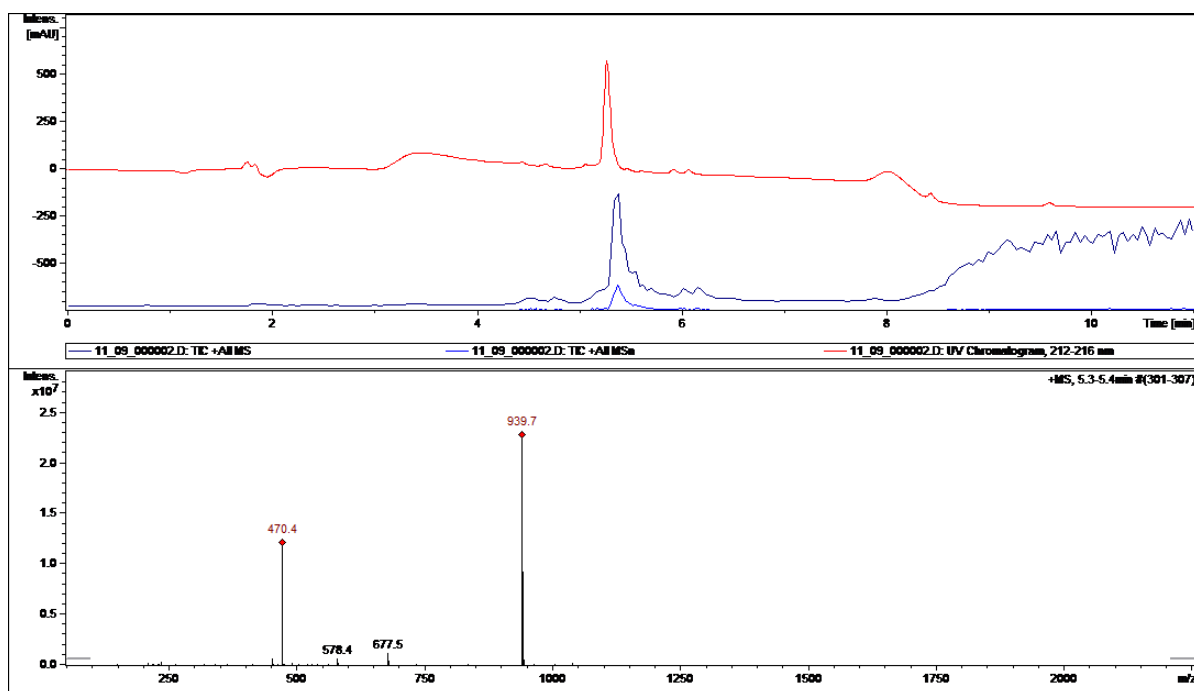


Рисунок 28 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 03_C10 (TPLTATLSK)

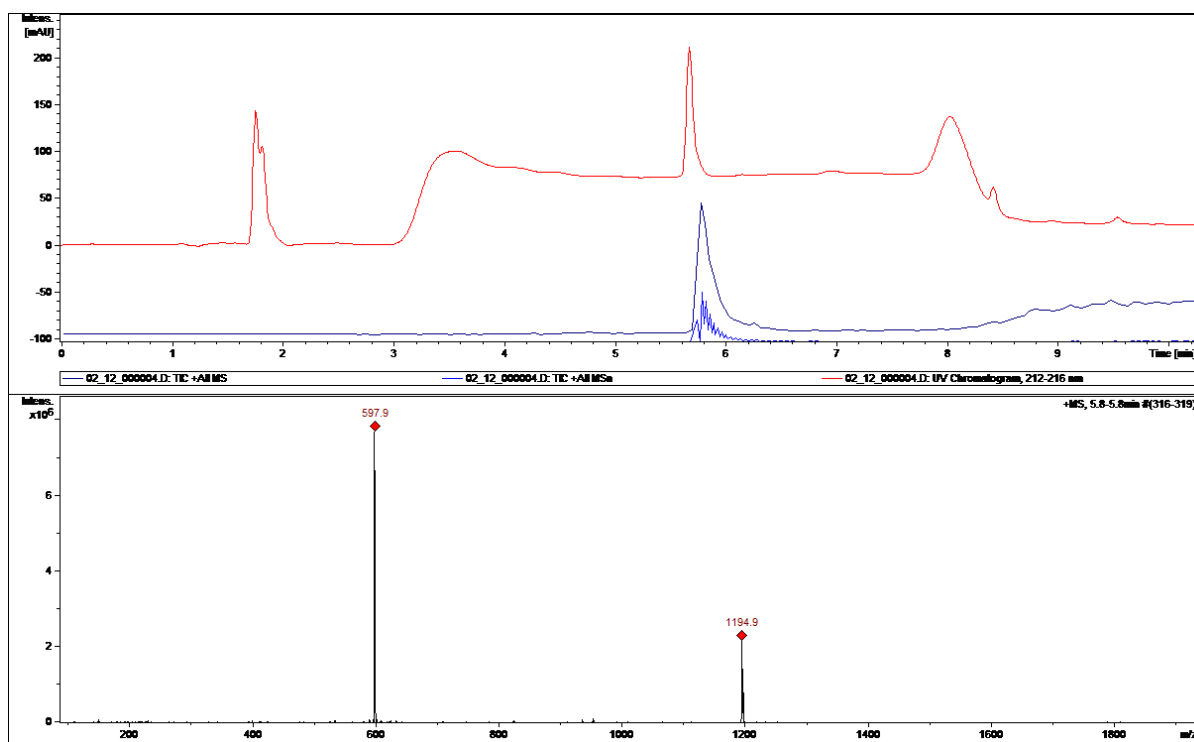


Рисунок 29 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 03_C4 (GPSVFPLAPSSK)

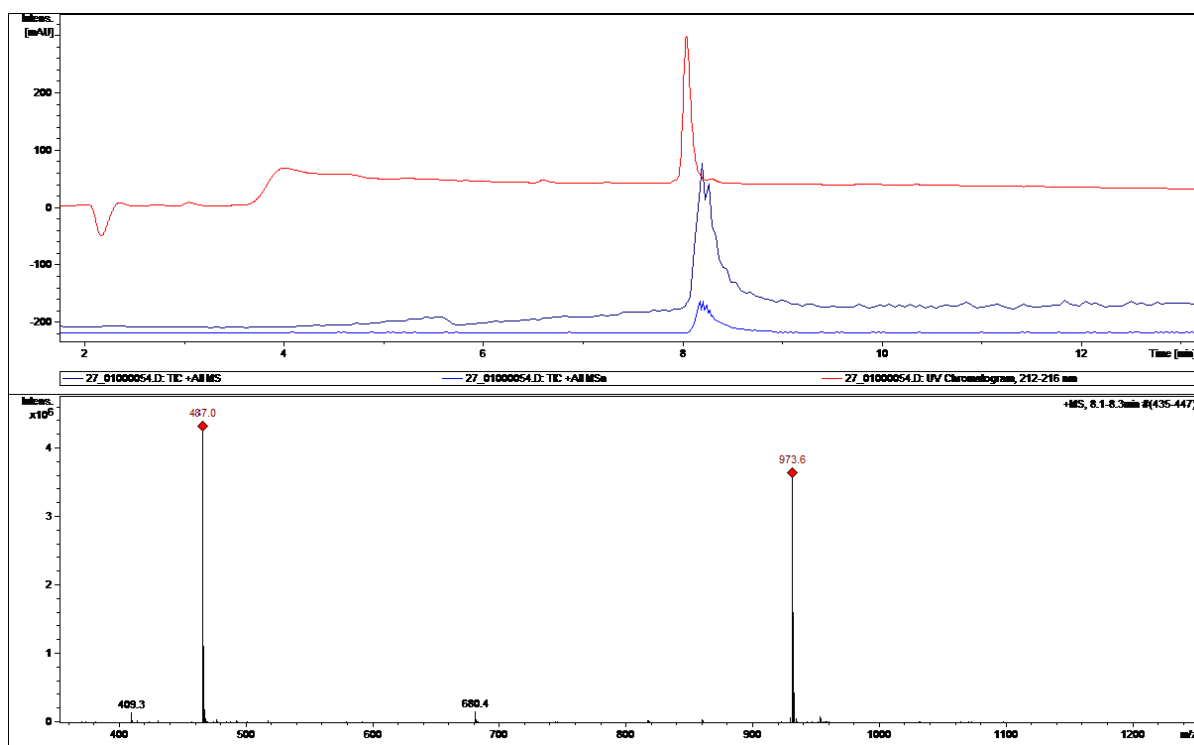


Рисунок 30 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 03_D12 (FDPSLTQR)

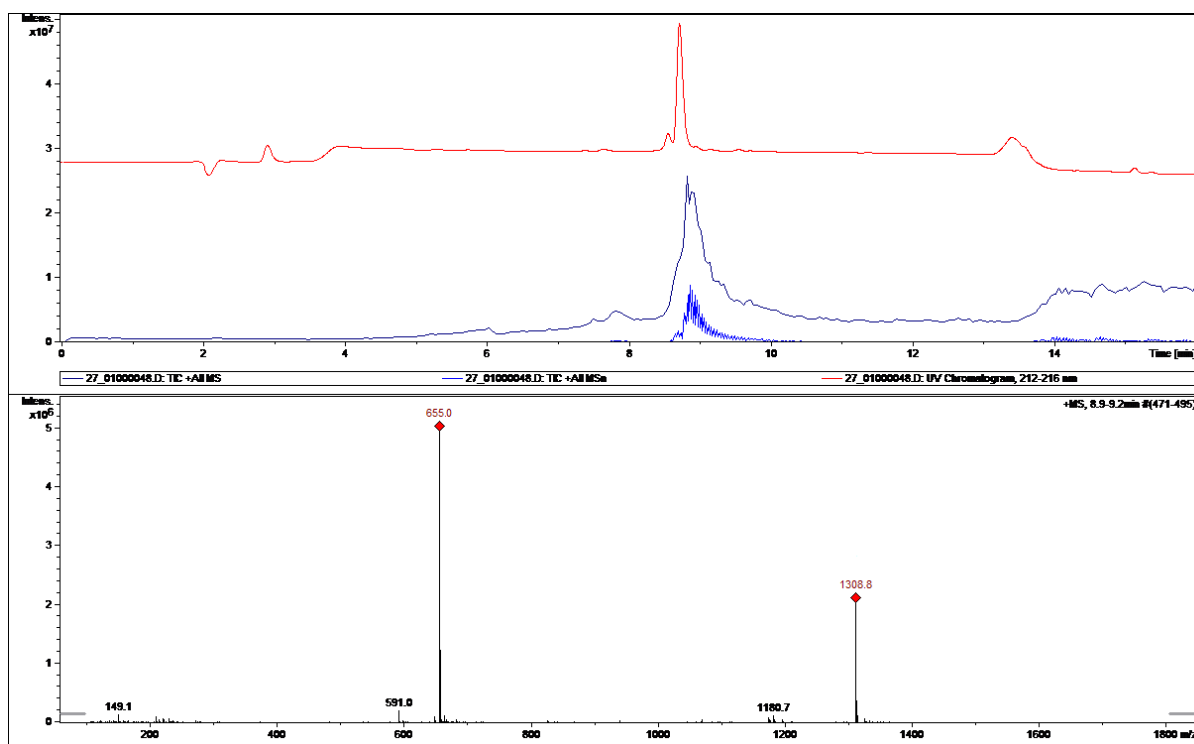


Рисунок 31 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 03_E5 (HSIFTPETNPR)

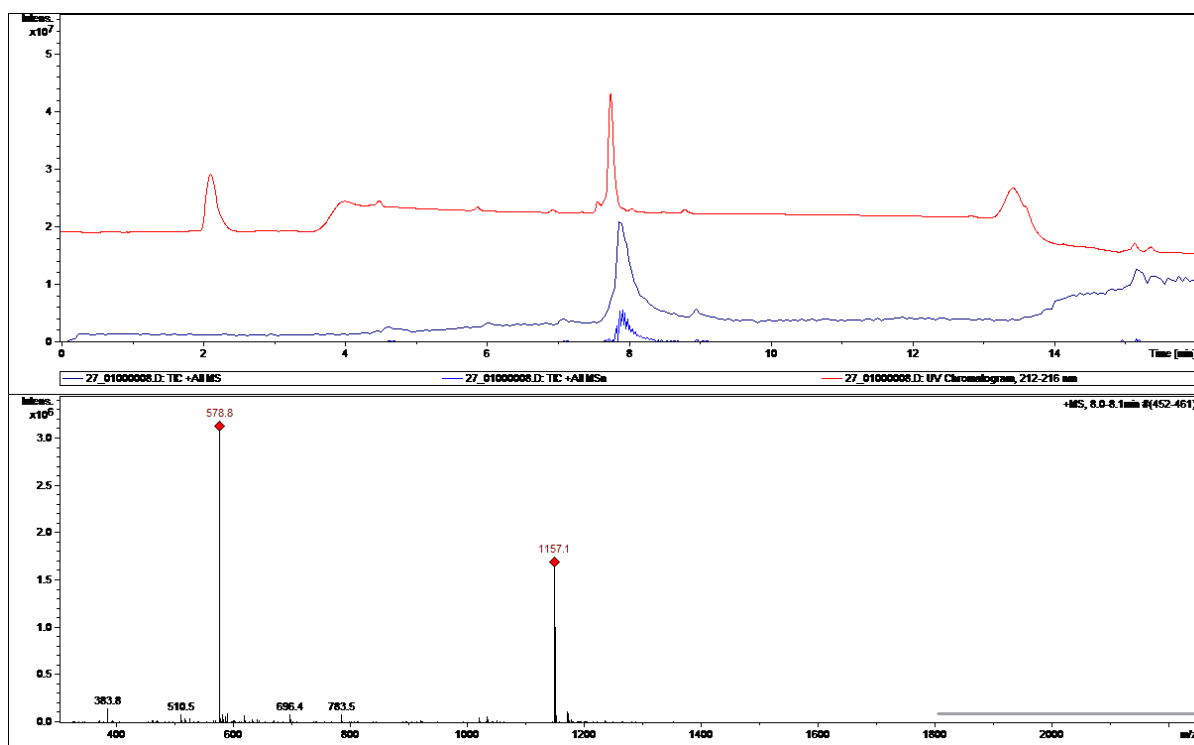


Рисунок 32 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 03_G9 (VEHSDLSFSK)

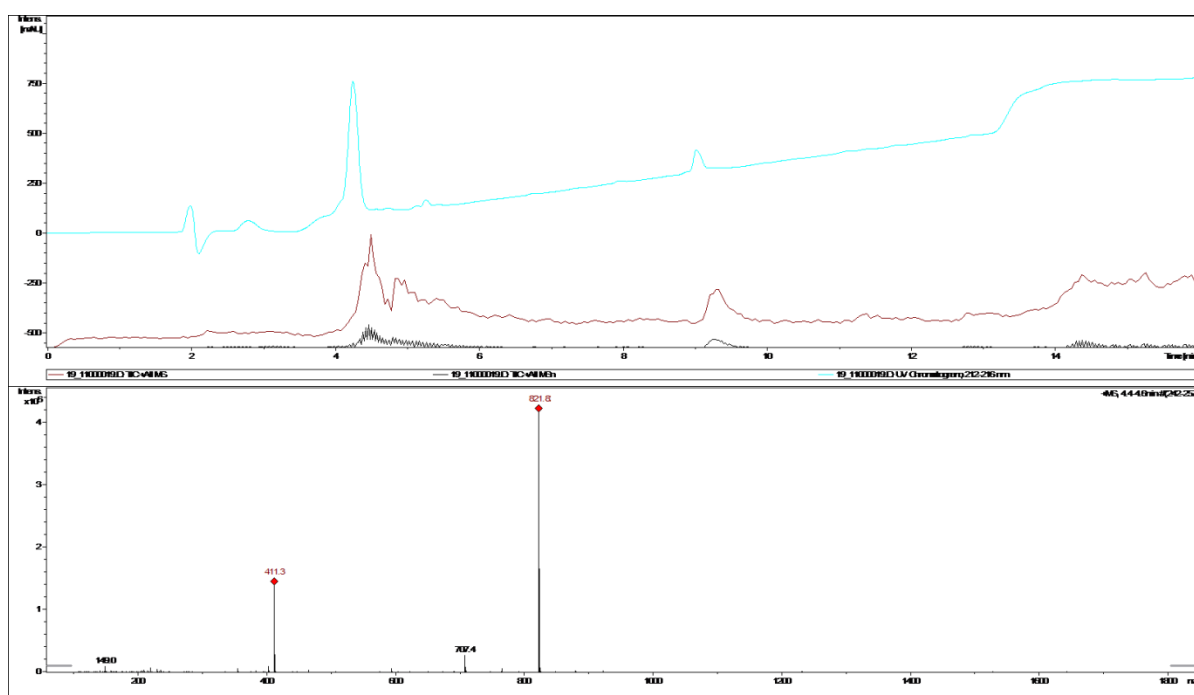


Рисунок 33 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 03_H12 (FSVVYAK)

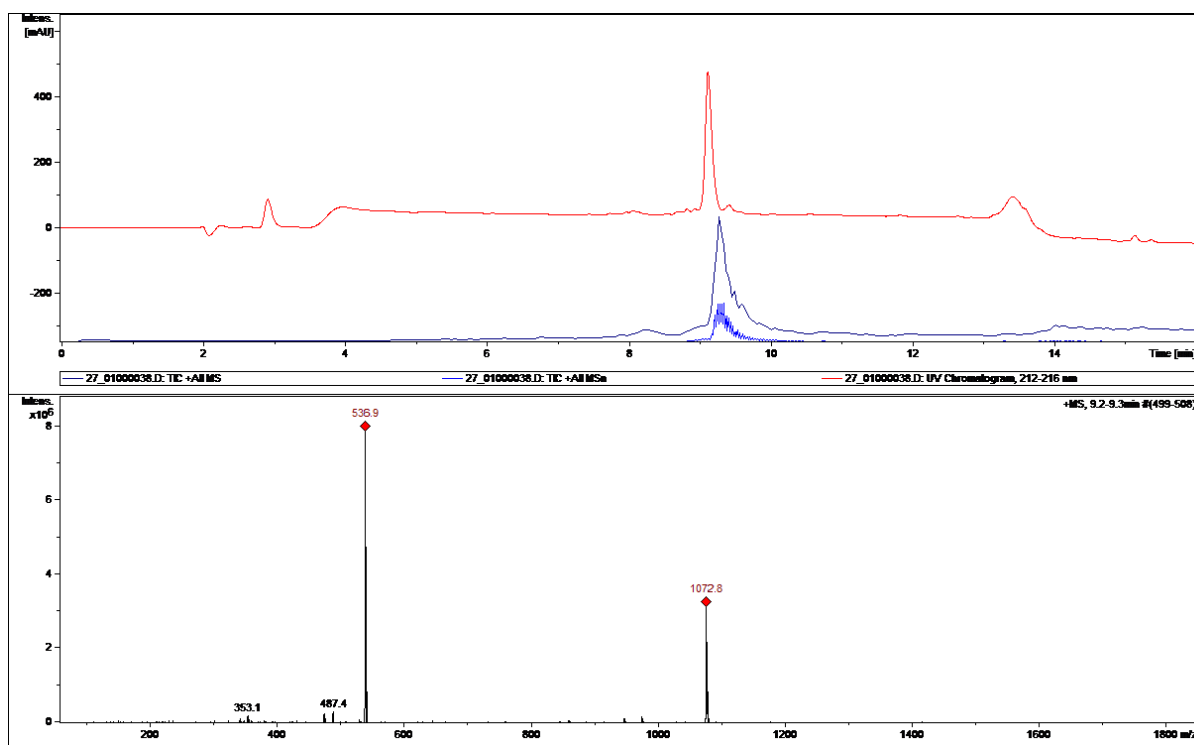


Рисунок 34 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 03_H9 (SALVLQYLR)

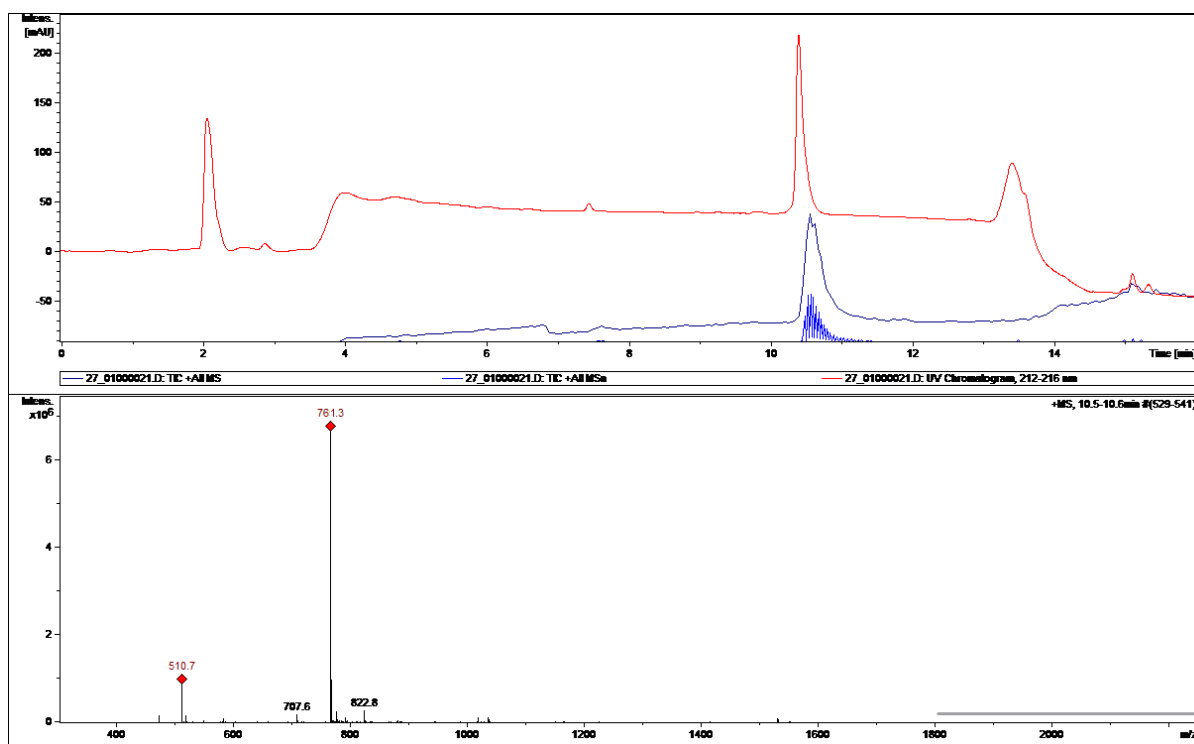


Рисунок 35 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 04_A5 (DASGATFTWTPSSGK)

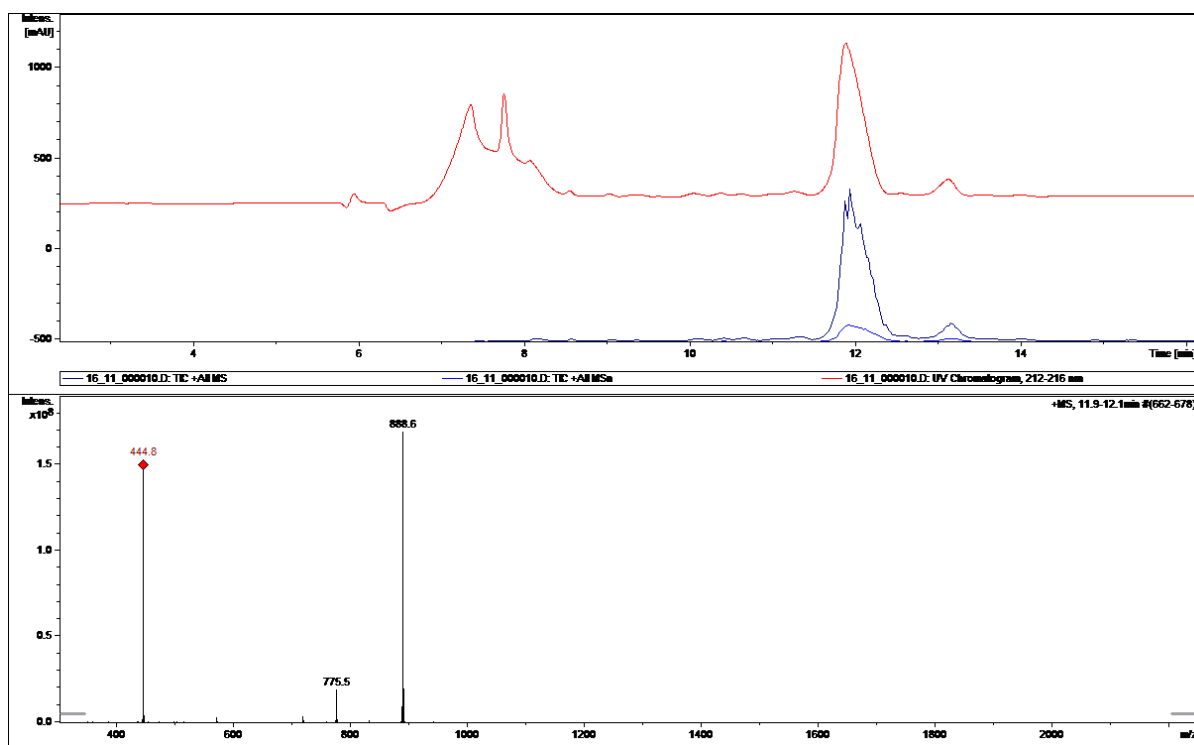


Рисунок 36 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 04_B5 (DNENVVNEYSSELEK)

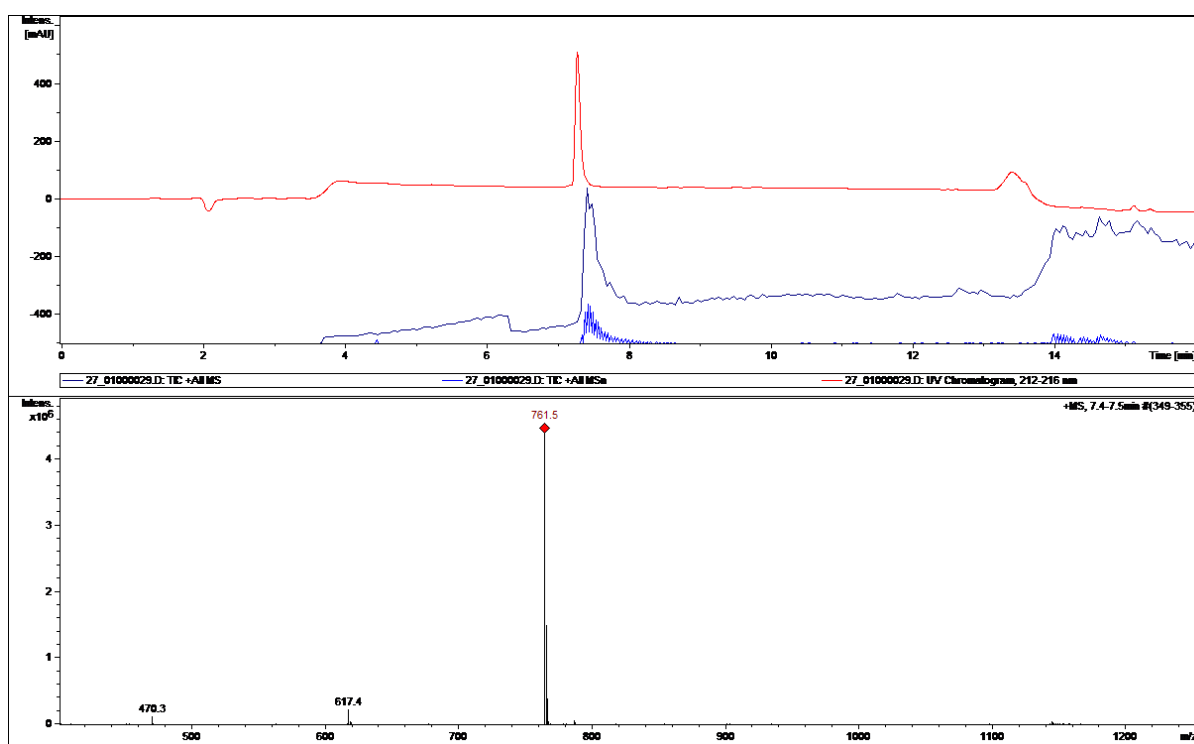


Рисунок 37 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 04_B7 (LVAYYTLIGASGQR)

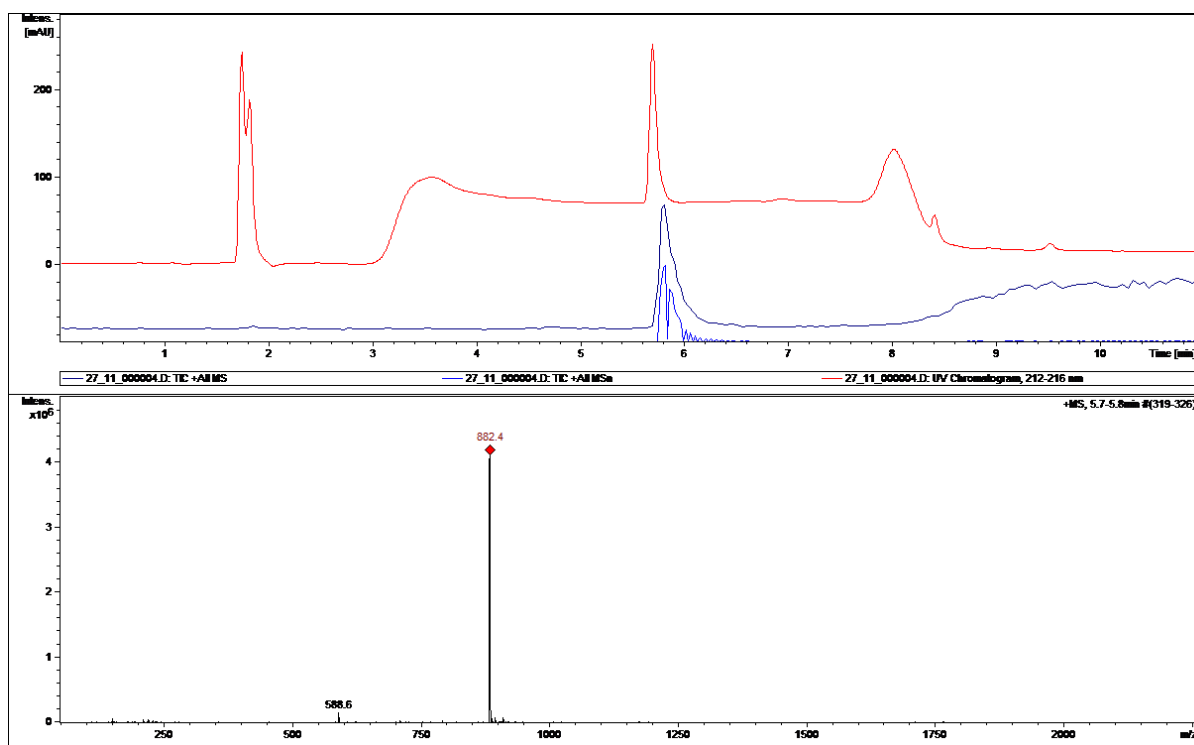


Рисунок 38 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 04_D5 (YVGGQEHFAHLLILR)

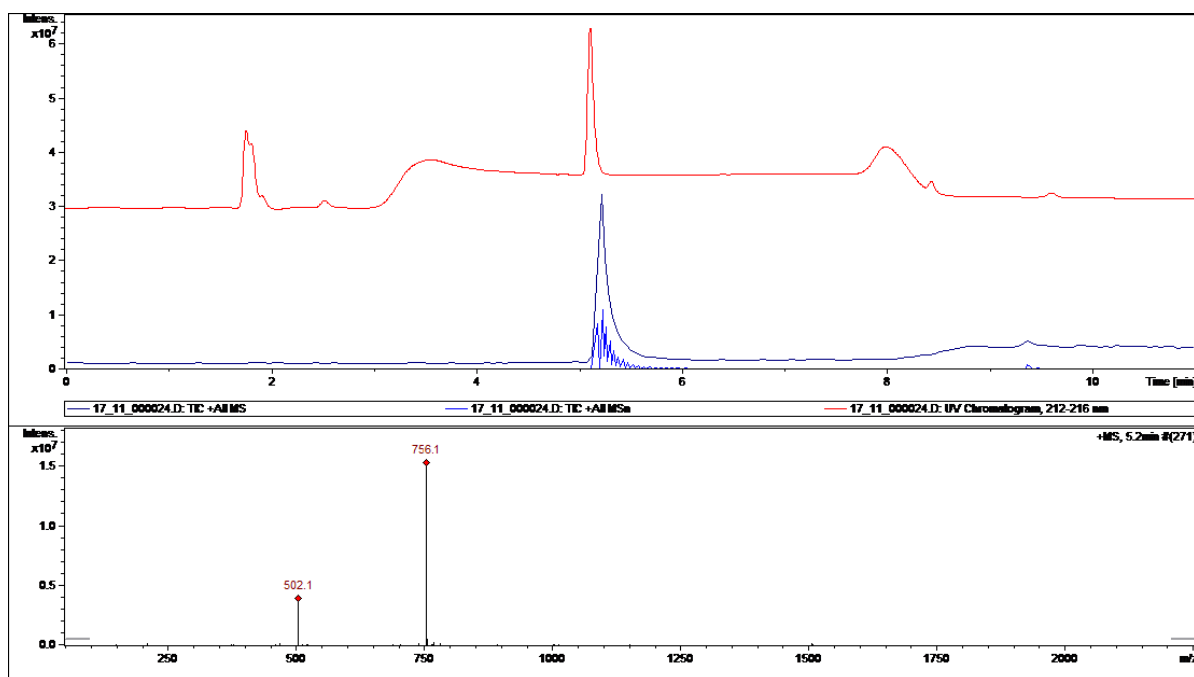


Рисунок 39 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 04_E7 (DSTYLSSTLTLSK)

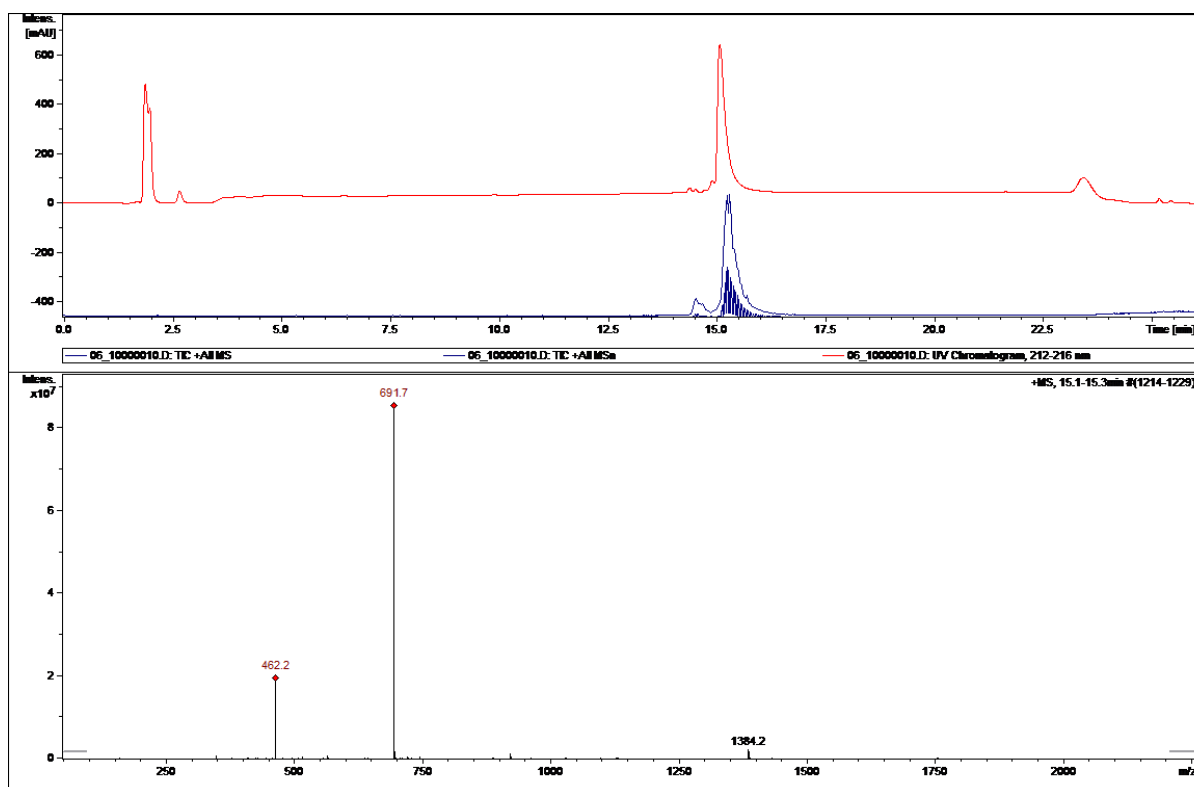


Рисунок 40 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 04_F8 (GAYPLSIEPIGVR)

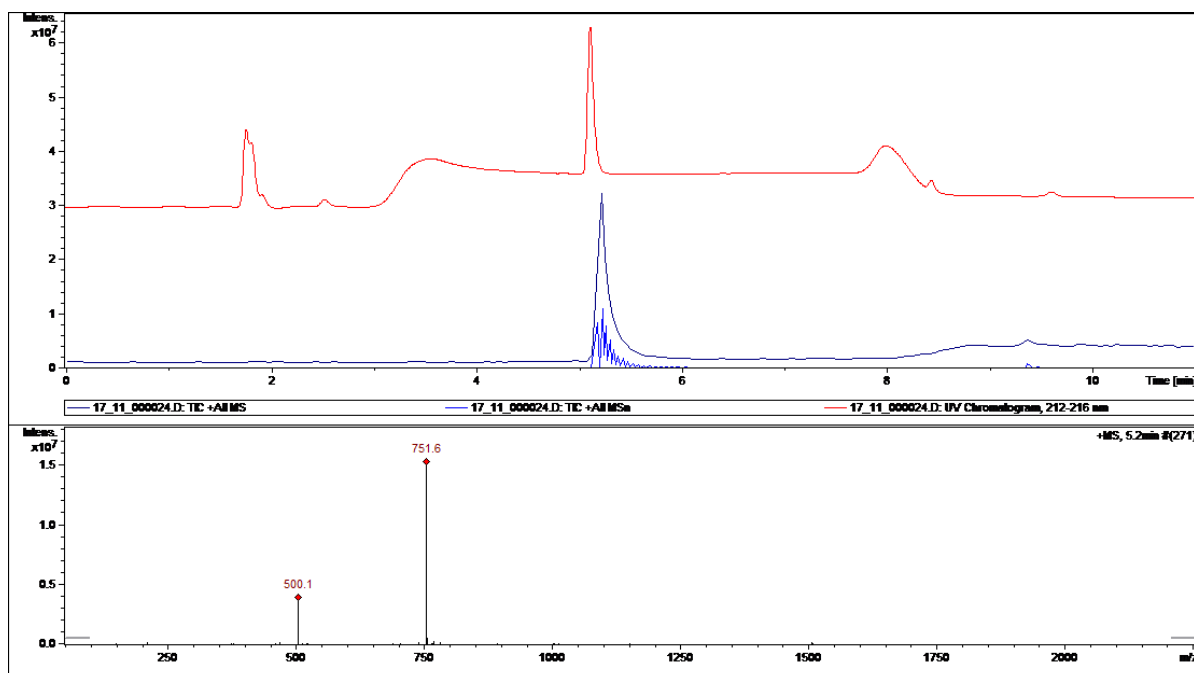


Рисунок 41 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 04_H8 (YEASILTHDSSIR)

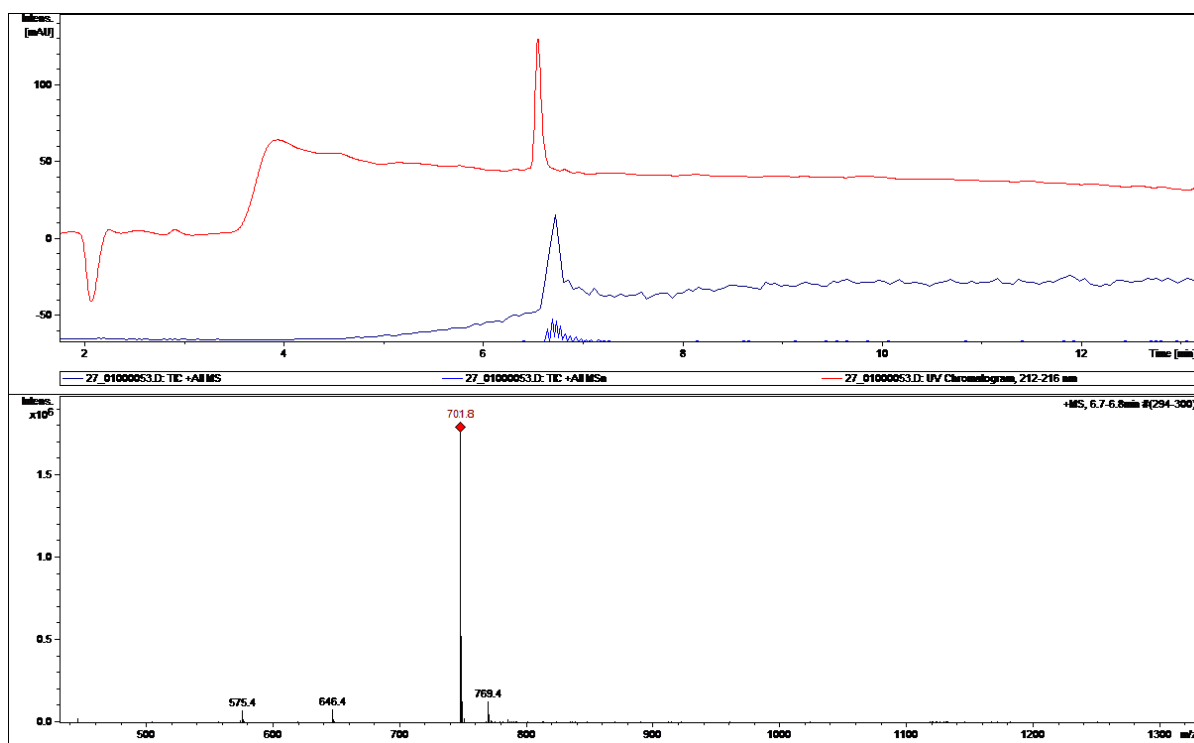


Рисунок 42 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 06_F6 (AADDTWEPFASGK)

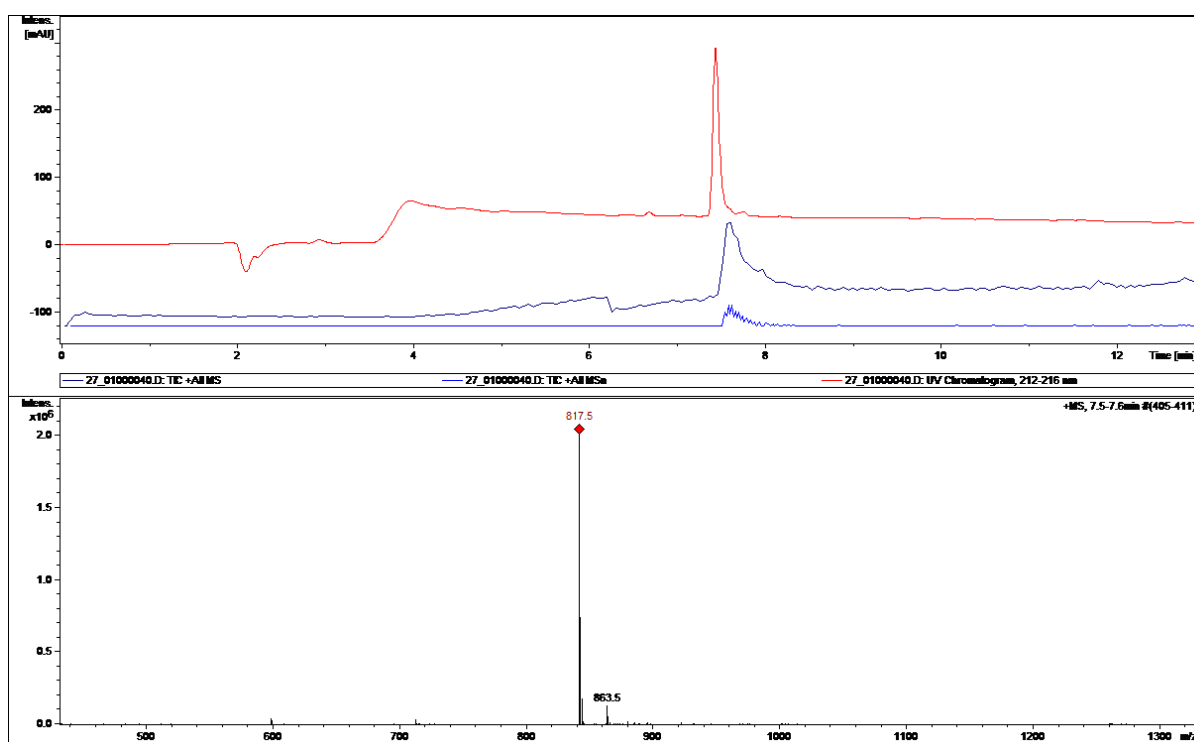


Рисунок 43 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 07_A2 (YLS DHSFLVSQGDR)

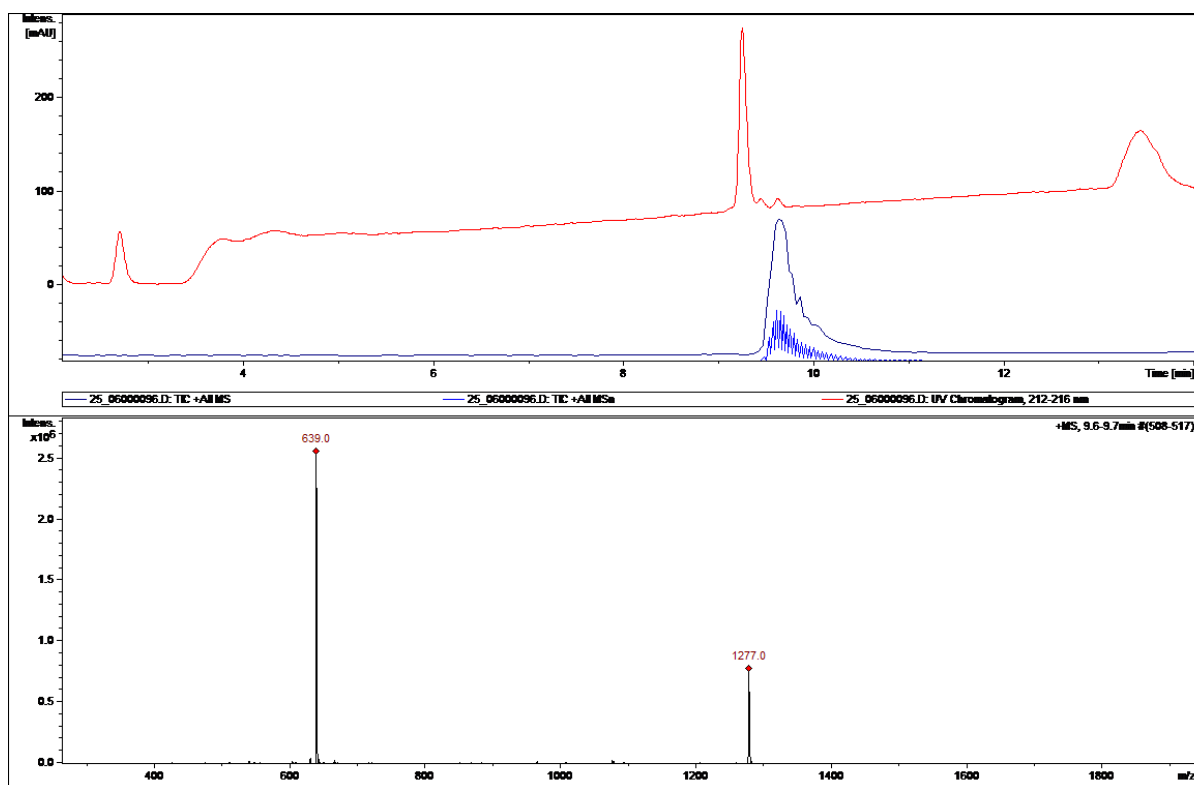


Рисунок 44 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 07_A3 (ALQDQLVLVAAK)

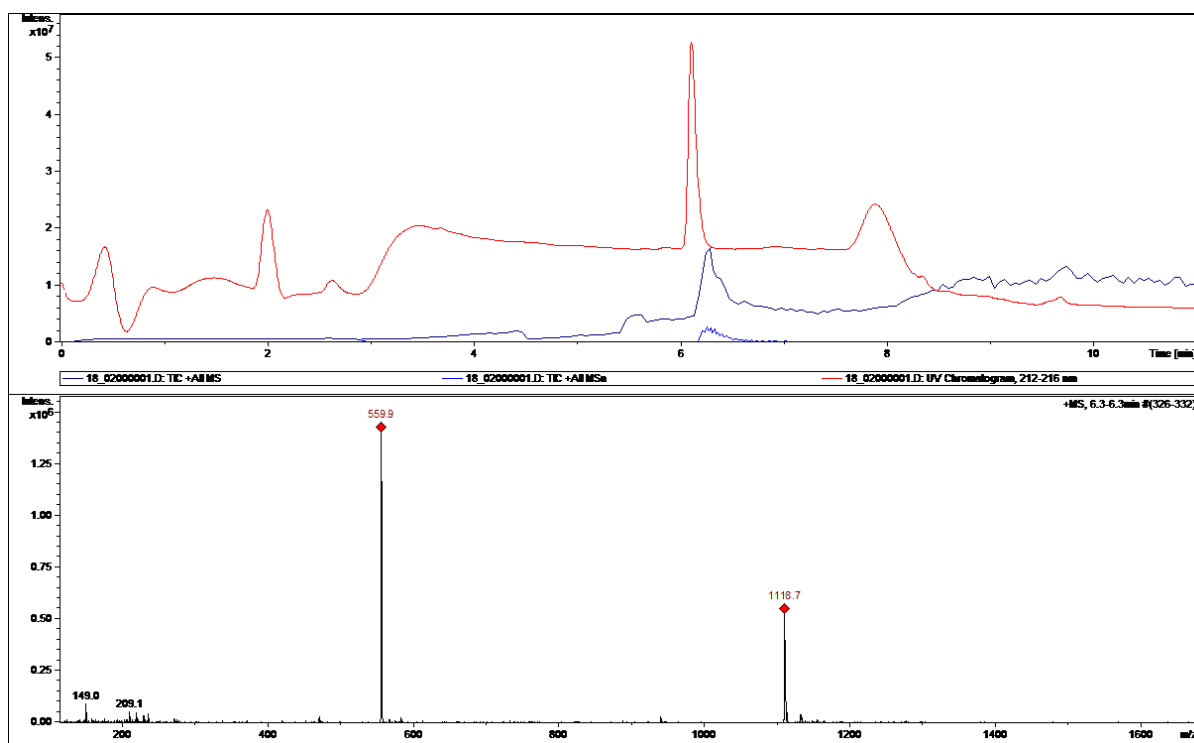


Рисунок 45 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 07_A4 (LSITGTYDLK)

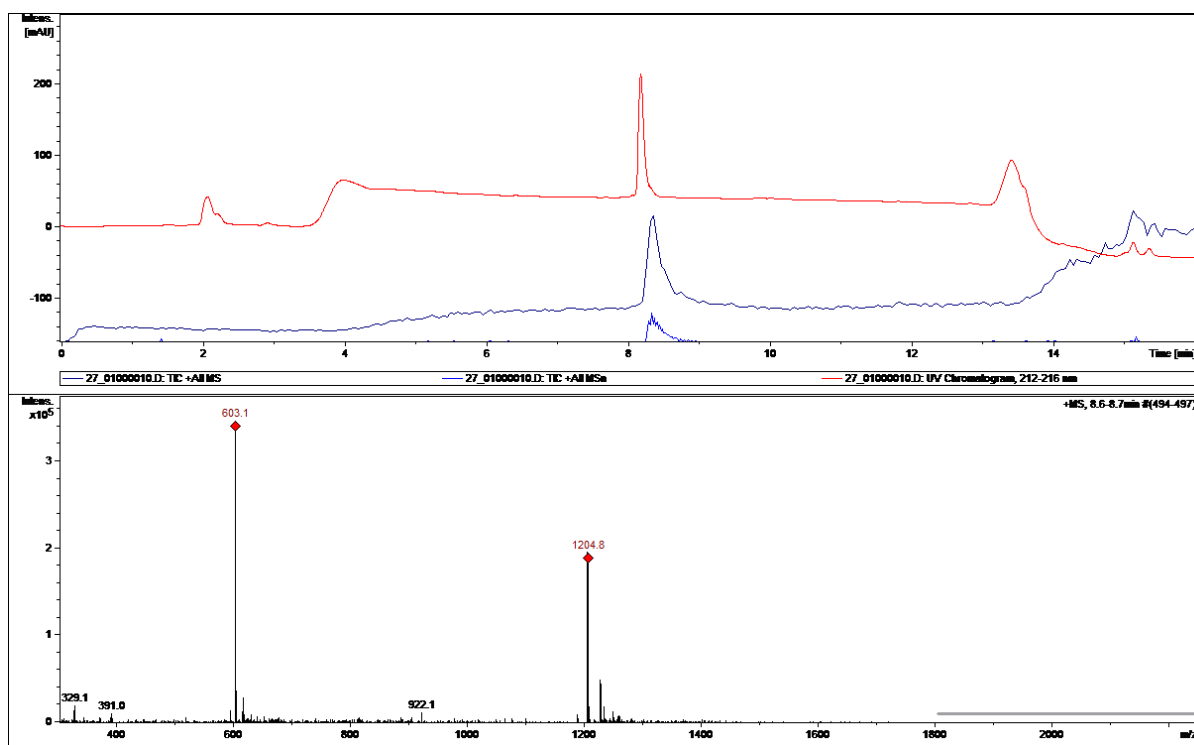


Рисунок 46 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 08_B2 (GWVTDGFSSLK)

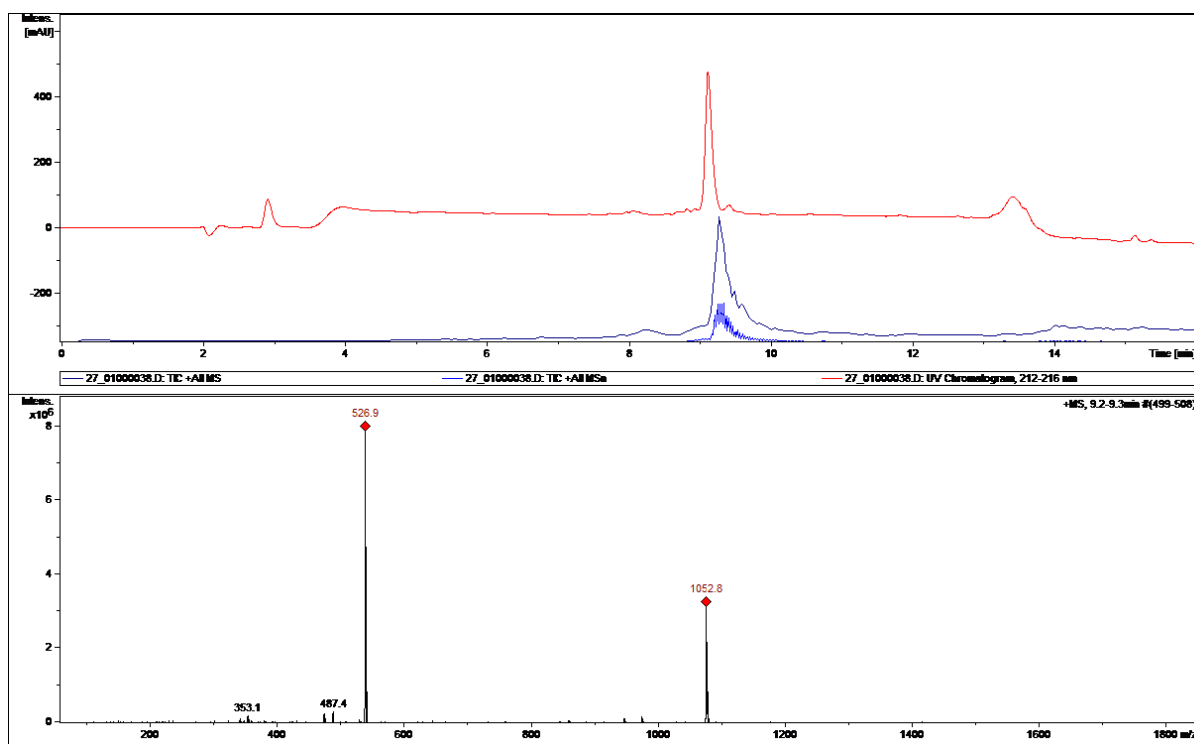


Рисунок 47 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 10_A05 (GYSTTVTGR)

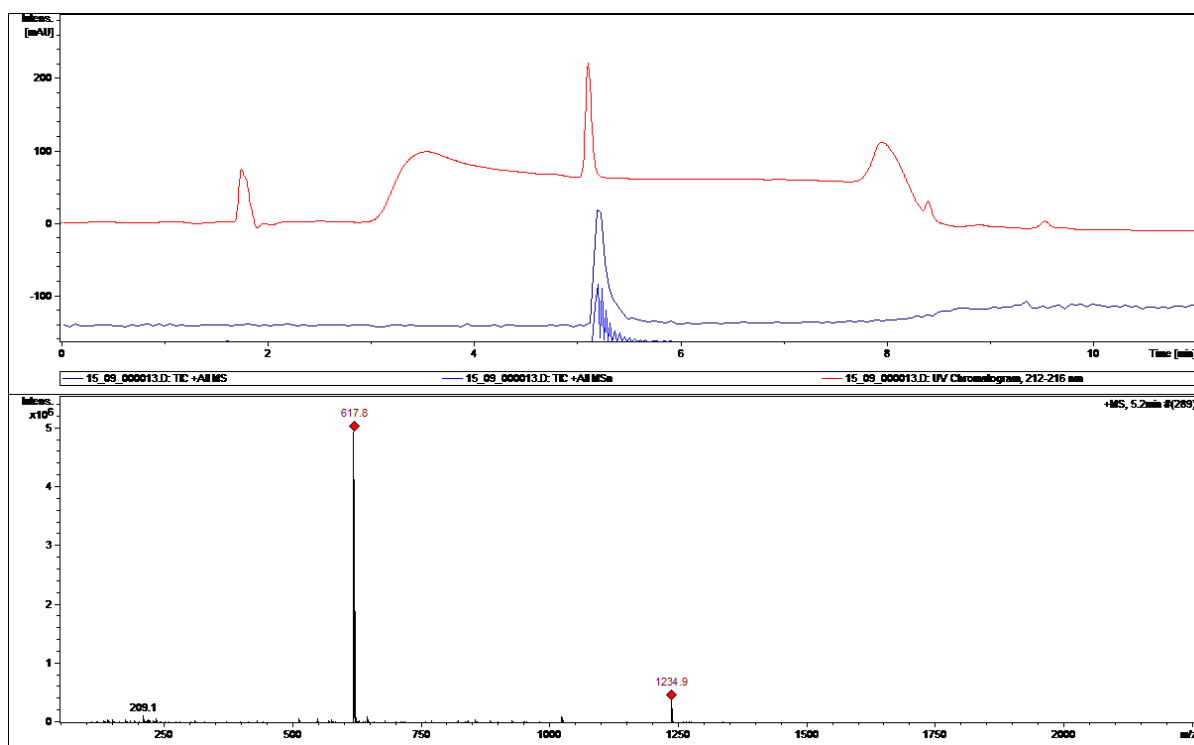


Рисунок 48 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 82_1_D2 (ALDFAVGEYNK)

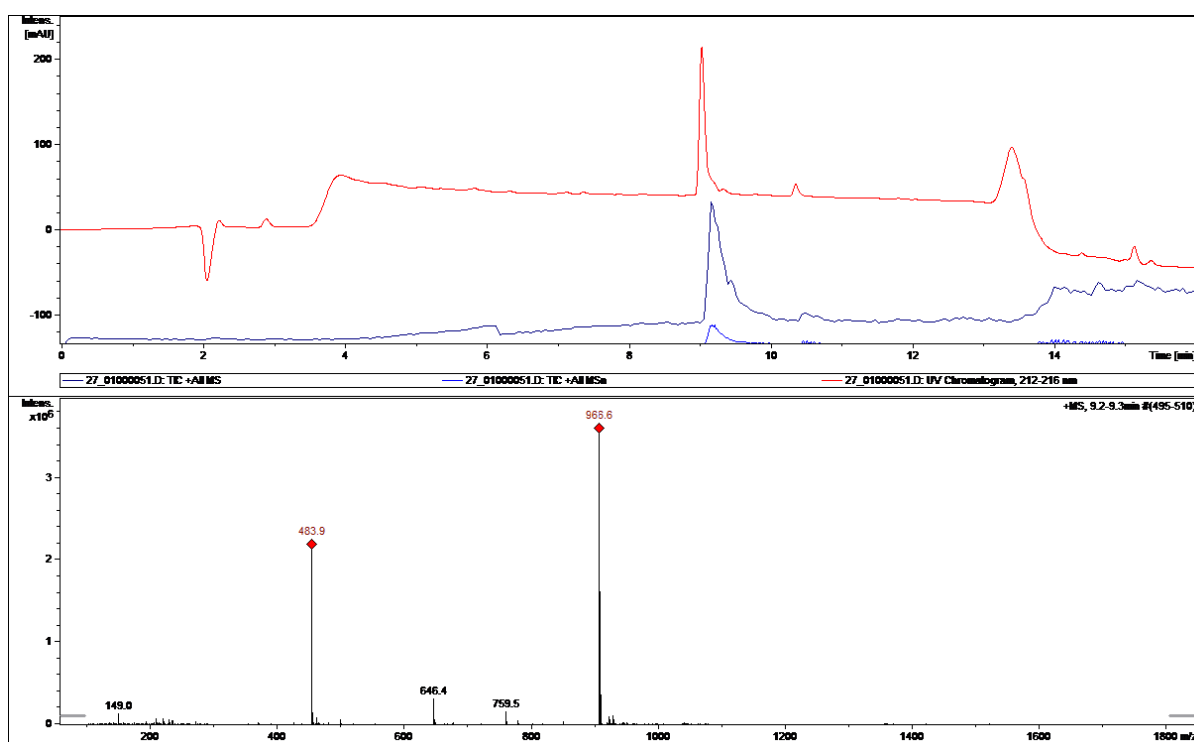


Рисунок 49 – Хроматограмма (сверху) и масс-спектр (снизу) пептида 82_2_D1 (VYFAGFPR)

ПРИЛОЖЕНИЕ О

СОГЛАСОВАНО

Руководитель работ,
академик Арчаков А.И.



« 28 » января 2025 г.

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБМХ
Пономаренко Е.А.



« 30 » января 2025 г.

М.П.

ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ НАПРАВЛЕННОГО МАСС- СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

СОДЕРЖАНИЕ

1. Назначение и область применения протокола
2. Описание метода измерения
3. Термины и определения
4. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы и растворы
5. Требования к условиям измерений
6. Подготовка к выполнению измерений и порядок выполнения измерений
7. Оформление результатов измерений

1. Назначение и область применения протокола

Настоящий документ «Протокол анализа концентрации белков в плазме крови методом направленного масс-спектрометрического анализа» описывает протокол определения молярной концентрации белков человека в биологическом материале человека, включая плазму крови, методом направленного масс-спектрометрического анализа. Диапазон измерений молярной концентрации белков биологических образцов человека составляет от 10^{-12} М до 10^{-9} М. Масс-спектрометрический анализ выполняется методом динамического мониторинга множественных реакций формирования фрагментных ионов уникальных пептидов (Dynamic Multiple Reaction Monitoring) при помощи хромато-масс-спектрометра типа тройной квадруполь с хроматографическим разделением. Время анализа (от начала масс-спектрометрического исследования образца до получения итоговых результатов) составляет 10 часов.

Протокол может быть применен для исследования биологических жидкостей, включая плазму крови, и клеточного материала человека на предмет наличия белков, кодируемых генами человека. В методике фактически происходит детекция и измерение концентрации не белков, а продуктов их гидролиза – пептидов. Принято считать, что концентрация пептидов полностью совпадает с концентрацией белка, которому он принадлежит.

2. Описание метода измерения

Метод измерений базируется на высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. Перед проведением хромато-масс-спектрометрического анализа молярной концентрации белков, кодируемых генами человека, осуществляется предварительная экстракция белка из биологического образца. Затем в исследуемый образец добавляют образец сравнения — меченные стабильными изотопами пептидные стандарты с известной концентрацией.

Эндогенные пептиды образца регистрируются в первом квадруполе Q1 масс-спектрометра как родительский ион с зарядовым состоянием $z=2+$, $3+$. Меченные стабильными изотопами пептидные стандарты (образец сравнения), которые имеют идентичный эндогенным аминокислотный состав за исключением атомов

стабильных изотопов, которые отличаются по массе (лизин, аргинин, лейцин, серин), регистрируется как родительский ион с зарядовым состоянием $z=2+$, $3+$. Масс-спектрометрические измерения позволяют определить соотношение интенсивностей пиков дочерних ионов (ионов-кванторов) эндогенных пептидов и пептидных стандартов, меченных стабильными изотопами.

Молярную концентрацию эндогенных пептидов исследуемом образце определяют с использованием калибровочной кривой, которая показывает взаимосвязь между соотношением площадей пиков иона-квантора эндогенных пептидов и меченных стабильными изотопами пептидных стандартов и молярной концентрацией эндогенных пептидов в калибровочном растворе.

3. Термины и определения

В настоящей методике применены термины с соответствующими определениями.

- образец сравнения: Меченые стабильными изотопами пептидные стандарты идентичные эндогенным пептидам.

- калибровочный раствор: Раствор меченых стабильными изотопами пептидных стандартов в 0,5% растворе муравьиной кислоты в воде.

- масс-спектрометрия: Физический метод регистрации ионизированных молекул, основанный на измерении отношения массы иона к его приобретенному заряду.

- спектр масс (масс-спектр): Графическое представление измеренных значений масс элементарных частиц.

- время удерживания: Время, прошедшее между вводом пробы и элюированием максимума пика.

- молярная концентрация, C , M (моль/ m^3): Количество (молей) растворенного вещества в единице объема раствора.

- ион спецификатор: Ион, подтверждающий идентичность определения соответствующего пептида. Идентичность определяется по соотношению собственных интенсивностей к интенсивности иона-квантора.

- ион квантор: Базовый ион спектра фрагментации, интенсивность которого принимается за 100% и используется для измерения количества вещества.

- масс-спектрометрическая интенсивность иона: Высота пика рассматриваемого иона в абсолютных единицах интенсивности.

4. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы и растворы

При проведении измерений применяют средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы, указанные в настоящем разделе.

Средства измерений, вспомогательные устройства и материалы

Хромато-масс-спектрометр жидкостной Agilent 1200 series (“Agilent Technologies”, США), сопряженной с тройным квадрупольным масс-анализатором TSQ Quantiva (“Thermo Scientific”, США) или любое аналогичное оборудование, не уступающее приведенным ниже техническим характеристикам.

Детектор масс-селективный TSQ Quantiva (или его аналог), должен обеспечивать следующие параметры:

- напряжение на капилляре 4000 В
- скорость осушающего газа (азот) 7 л/мин
- скорость аксилярного газа (азот) составляла 5 л/мин
- температура капилляра – 350 °С
- окно изоляции для первого и третьего квадруполья 0,7 Да
- время цикла сканирования – 1,2 сек,
- давление газа (аргон) в ячейке соударения – 1,5 мТорр.
- окно времени удерживания на колонке обращенной фазы 1,8 мин для каждого прекурсорного иона
- детекция в режиме динамического мониторинга реакций формирования фрагментных ионов.

Хроматограф Agilent 1200 series (или его аналог), включающий: бинарный четырёхканальный насос высокого давления с нормированием скорости потока подвижной фазы, термостат автоматизированного инжектора, термостат хроматографической колонки с интегрированным перепускным 6-ти канальным клапаном переключения потоков, автоматизированный инжектор с установленной петлей до 20 мкл, колонка ZORBAX SB-C18 (150×0,5 мм, диаметр частиц 5 мкм, “Agilent Technologies”, США).

Концентратор вакуумный Concentrator Plus (Eppendorf, США).

Центрифуга Eppendorf 5424R (Eppendorf, США).

Весы лабораторные электронные специального (I) класса точности по ГОСТ 24104-01, с наибольшим пределом взвешивания 320 г. (№ Госреестра 25469-03);

Баня водяная лабораторная;

рН-метр лабораторный (основная погрешность измерения не более $\pm 0,05$ единиц рН);

Шкаф термостатирующий;

Автоматические дозаторы переменного объема 20-200 мм³ с шагом 0,1 мм³, с точностью $\pm 0,6\%$; 100-1000 мм³ с шагом 1 мм³, с точностью $\pm 3\%$ по ГОСТ 10223-82;

Полипропиленовые пробирки (типа эппендорф) объемом 2000 мм³ по ТУ 62-2-300-80;

Пробирки полипропиленовые объемом 5 см³;

Пробирки из боросиликатного стекла с UV-защитой номинальным объемом 2 см³;

Вставки прозрачные из деактивированного стекла номинальным объемом 0,2 см³;

Пробирки прозрачные из деактивированного стекла номинальным объемом 4 см³.

Колбы мерные по ГОСТ 1770-74 вместимостью 1000 см³, 250 см³, 2 класса точности.

Цилиндры мерные (мензурки) объемом 1000 мм³.

Примечание 1 – Средства измерений должны быть проверены в установленном порядке.

Примечание 2 – Допускается применение иных средств измерений, технические и метрологические характеристики которых не уступают указанным выше и обеспечивают требуемую точность измерений.

Программное обеспечение масс-спектрометра

Программное обеспечение для статистического анализа масс-спектров должно поддерживать формат масс-спектрометрических данных, полученных на масс-спектрометре с тройным квадрупольным масс-анализатором TSQ Quantiva (или его аналога) и должно обеспечивать обработку пиков масс-спектра, уровень сигнала к шуму для эндогенных пептидов не менее $SNR > 30$, для меченых стабильными

изотопами пептидных стандартов не менее $SNR > 3$ (по алгоритму среднеквадратичного отклонения).

Примечание – *Торговая марка программного обеспечения для анализа масс-спектров, отвечающая перечисленным выше требованиям, - Mass Hunter Qualitative Analysis (версия не ниже b04).*

Реактивы и растворы

Синтетические меченые стабильными изотопами пептидные стандарты для белков, кодируемых генами человека, синтезированные методом твердофазного синтеза, очищенные с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с измеренной концентрацией по Методике измерения молярной концентрации синтетического пептида в растворе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием флуоресцентного детектора (Св. № 009-042/RA.RU.311787-2018).

Ацетонитрил A062717 (Fisher Scientific, США);

Кислота трифторуксусная по ГОСТ 18270-72;

Вода очищенная деионизованная по ГОСТ 6709-72;

Кислота муравьиная ч. по ГОСТ 5848-73;

Вода очищенная Lichrosolv® (Merck, США);

Метанол для ВЭЖХ и спектроскопии, например J.T. Baker, США, 8402;

Примечание 1 – *допускается использование реактивов других марок после их проверки путем проведения всей процедуры анализа для холостого опыта и оценки полученных результатов с учетом характеристик погрешности методики измерений.*

5. Требования к условиям измерений

Лабораторный персонал должен быть в спецодежде, предохраняющей от загрязнений анализируемых образцов биоматериала тканями кожи и волос.

Проведение измерений должно проводиться в чистой комнате с организацией ламинарной вентиляции воздуха чистоты не ниже класса 9 ИСО по ГОСТ Р ИСО 14644-1-2000 в следующих условиях:

- температура окружающей среды $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$;
- относительная влажность воздуха не более 80 % при температуре $(25 \pm 5)^\circ\text{C}$;
- атмосферное давление $(84,0 - 106,7)$ кПа $(630 - 800)$ мм рт.ст.;
- напряжение питания в сети (220 ± 10) В;

- частота питающей сети (50±1) Гц.
- освещение помещения естественное или искусственное, не ограничивается особыми требованиями.

Остальные условия должны соответствовать требованиям, указанным в паспорте (формуляре) на используемые средства измерений. Для контроля состояния окружающей среды и иных условий проведения измерений должны применяться средства измерений с относительными погрешностями не более 30% значений допусков к параметрам, установленным в настоящем разделе.

6. Подготовка к выполнению измерений и порядок выполнения измерений

а. Приготовление вспомогательных растворов

Приготовление хроматографической фазы А

Мерный цилиндр объемом 1000 см³ заполнить до отметки 500 см³ деионизованной водой. Затем с помощью одноканальной пипетки ручного дозирования добавить 0,8 см³ муравьиной кислоты и 0,01 см³ трифторуксусной кислоты. Довести объем раствора до 1000 см³ деионизованной водой. Перемешать содержимое цилиндра и перелить полученный раствор в стеклянную колбу или бутылку для хранения.

Измерить уровень реакции среды (рН) раствора. Значение рН должно быть в диапазоне 2.63 – 2.67 (при температуре 20.5 – 24.5оС).

Примечание. Раствор готовить непосредственно перед использованием. На колбу поместить этикетку «фаза А» с указанием даты изготовления.

Приготовление хроматографической фазы Б

В мерный цилиндр объемом 1000 см³ заполнить до отметки 800 см³ ацетонитрилом. Затем с помощью одноканальной пипетки ручного дозирования добавить 0,8 см³ муравьиной кислоты и 0,1 см³ трифторуксусной кислоты. Довести объем раствора до 1000 см³ деионизованной водой. Аккуратно перемешать содержимое цилиндра. Перелить полученный раствор в стеклянную колбу или бутылку для хранения.

Примечание. Раствор готовить непосредственно перед использованием. На колбу поместить этикетку «фаза Б» с указанием даты изготовления.

Приготовление рабочего раствора стандартных изотопно меченых

пептидов:

В пробирку добавить стандартные изотопно меченные пептиды из расчета, что в конечном итоге в пробирке объемом 250 мм³ должно быть 10⁻⁹ М каждого стандартного пептида, Затем упарить до минимально возможного объема и повторно растворить в 200 мм³ 0,1% растворе муравьиной кислоты в воде. Хранить раствор при температуре -20°C.

в. Подготовка хроматографа и масс-спектрометра к работе

Провести подготовку масс-спектрометра TSQ Quantiva к работе согласно Инструкции по подготовке и эксплуатации масс-спектрометрического оборудования.

Хромато-масс-спектрометрические измерения проводить согласно инструкции производителя при следующих условиях.

Хроматографические условия:

Разделение осуществлять на стационарной фазе аналитической колонки ZORBAX SB-C18 (150×0,5 мм, диаметр частиц 5 мкм, “Agilent Technologies”, США). Скорость потока должна составлять 20 мкл/мин. Параметры градиента элюции приведены в таблице 1:

Таблица 1 – Градиент, используемый для хроматографического разделения пептидов

Время, мин	Раствор А, %	Раствор В, %
1	95	5
5	95	5
35	40	60
36	1	99
41	1	99
42	95	5
50	95	5

Масс-спектрометрические условия:

Для идентификации и определения содержания белков, кодируемых генами человека, в биологическом образце регистрируют дочерние ионы пептидов в

третьем квадруполе Q3, идентичные по структуре распада фрагменты родительского иона эндогенных пептидов.

Критерии идентификации и достоверности должны соответствовать следующим условиям:

- соотношение сигнала к шуму для эндогенных пептидов должно составлять не менее $SNR > 30$, для изотопно меченых пептидных стандартов (образца сравнения) не менее $SNR > 3$ (по алгоритму среднеквадратичного отклонения);

- максимальное допустимое отклонение относительного времени удержания на колонке должно быть в пределах $RRT = \pm 0,5\%$;

- диапазон допустимого отклонения иона-квантора 90 – 110% и диапазон отклонения иона-спецификатора не более $\pm 10\%$, если относительная интенсивность не менее 50% от базового иона; не более $\pm 20\%$ по абсолютному значению, если относительная интенсивность в пределах от 25% до 50% по базовому иону; и не более 15%, если относительная интенсивность в пределах от 1% до 25% по базовому иону. Точность измерения концентрации не более 5%.

с. Построение калибровочного графика

Приготовить калибровочные растворы (КР) изотопно меченых пептидных стандартов последовательным разведением рабочего раствора стандартных изотопно меченых пептидов с использованием одноканальной пипетки ручного дозирования. Схема разведения приведена в таблице 2.

Таблица 2 – Приготовление градуировочных растворов изотопно меченных пептидных стандартов

Обозначение КР	Концентрация изотопно меченых пептидных стандартов в КР, М	Объем раствора изотопно меченых пептидных стандартов необходимого для приготовления КР
1	10 ⁻¹⁰ М	5 мм3 рабочего раствора с концентрацией 10 ⁻⁹ М и 45 мм3 деионизованной воды
2	0,5х10 ⁻¹⁰ М	2,5 мм3 рабочего раствора с концентрацией 10 ⁻⁹ М 47,5 мм3 деионизованной воды
3	0,1х10 ⁻¹⁰ М	1 мм3 рабочего раствора с концентрацией 10 ⁻⁹ М 49 мм3 деионизованной воды
4	0,5х10 ⁻¹¹ М	0,5 мм3 рабочего раствора с концентрацией 10 ⁻⁹ М 49,5 мм3 деионизованной воды
5	0,25х10 ⁻¹¹ М	0,25 мм3 рабочего раствора с концентрацией 10 ⁻⁹ М 50 мм3 деионизованной воды
6	0,1х10 ⁻¹¹ М	0,1 мм3 рабочего раствора с концентрацией 10 ⁻⁹ М 50 мм3 деионизованной воды
7	0,25х10 ⁻¹² М	0,025 мм3 рабочего раствора с концентрацией 10 ⁻⁹ М 50 мм3 деионизованной воды

Осуществить масс-спектрометрические измерения для калибровочных растворов в пяти технических повторениях с повышением концентрации от 0,25х10⁻¹² М к 10⁻¹⁰ М.

Рассчитать калибровочный график зависимости соотношения площадей пиков иона-квантора изотопно меченых пептидных стандартов и молярной концентрации изотопно меченых пептидных стандартов в калибровочном растворе.

d. Проведение измерений молярной концентрации белков, кодируемых генами человека, в плазме крови.

Осуществить масс-спектрометрические измерения для растворов экстрактов проб в трёх последовательных технических повторениях, по итогам которых вычислить эмпирическую концентрацию эндогенных пептидов в биологической пробе.

Обработка результатов измерений

Для определения молярной концентрации эндогенных пептидов используют построенный ранее градуировочный график.

В меню «File» программного обеспечения Mass Hunter Quantitative Analysis открывают вкладку «Add samples».

Выбирают файлы, полученные в формате*.d.

Выбирают вкладку «Analyze batch». Получают значение массовой концентрации эндогенных пептидов в биопробе в каждом техническом повторе C_i , M , где $i = 1 \div 3$.

Примечание – Программа автоматически использует рассчитанный градуировочный график зависимости молярной концентрации от соотношения площадей пиков ионов-кванторов пептидных стандартов.

Вычисляют молярную концентрацию C , M (моль/м³), эндогенных пептидов как среднее арифметическое значений концентрации эндогенных пептидов для всех технических повторов.

7. Оформление результатов измерений

Результат измерений заносят в протокол и представляют в виде

$C \pm \delta$, %, при $P=0,95$

где C – среднее арифметическое n результатов измерений концентрации эндогенных пептидов, соответствующих белков биологического образца, M , %, признанных приемлемыми;

$\pm \delta$ - границы относительной погрешности измерений концентрации эндогенных пептидов, %.

Численное значение результата измерения должно оканчиваться цифрой того же разряда, что и значение абсолютной погрешности.

Результаты измерений концентрации эндогенных пептидов соответствующих белков, кодируемых генами человека, оформляют в виде распечатанного протокола.

В протоколе должны быть приведены следующие сведения:

- дата приготовления биологических проб;
- дата проведения градуировочных измерений;
- тип и номер средств измерений;
- значение концентраций эндогенных пептидов соответствующих белков;
- должности, фамилии, инициалы и подписи сотрудников, проводивших процедуру хроматографического анализа и обработку результатов.

ПРИЛОЖЕНИЕ П

ПЕРЕЧЕНЬ МЕТАБОЛИТОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С

ПРОТЕКАНИЕМ ВОЗРАСТЗАВИСИМЫХ ПАТОЛОГИЙ

Метаболит	InChiKey	Фактор
Sphingomyelin (d18:1/20:0)	AADLTHQNYQHJV-SVLGDMRNSA-N	Болезнь Альцгеймера
Glycolic acid	AEMRFAOFKBGASW-UHFFFAOYSA-N	Аденокарцинома
DL-Isoleucine	AGPKZVBTJJNPAG-GADJSHNENA-N	Остеопороз
Ornithine	AHLPDHMHMVZTML-UHFFFAOYSA-N	Аденокарцинома; Остеопороз
L-Threonine	AYFVYJQAPQTCCC-GBXIISLDSA-N	Аденокарцинома; Рак груди
3-oxodecanoyl-CoA	AZCVXMAPLHSIKY-HSJNEKGZSA-N	Атеросклероз
Cholesteryl sulfate	BHYOQNUELFTYRT-DPAQBDIFSA-N	Атеросклероз
Malic acid	BJEPYKJPYRNKOW-UHFFFAOYSA-N	Аденокарцинома
Dihydroceramide (d18:0/24:0)	BPLYVSYSBPLDOA-WVILEFPFSA-N	Болезнь Альцгеймера
myo-Inositol	CDAISMWEOUEBRE-GPIVLXJGNA-N	Аденокарцинома; Рак щитовидной железы
Inositol	CDAISMWEOUEBRE-UHFFFAOYSA-N	Рак груди
PGP(40:8)	CGRGXPKCDUKBCL-KNVYJNGISA-N	Атеросклероз
L-Aspartic acid	CKLJMWZTIZZHCS-REOHCLBHSA-N	Рак груди
DL-Phenylalanine	COLNVLDHVKWLRT-UHFFFAOYSA-N	Глиобластома; Рак груди
Creatine	CVSVTCORWBXHQV-UHFFFAOYSA-N	Глиобластома
Decanedioic acid	CXMXRPHRNRROMY-UHFFFAOYSA-N	Калоректальный рак
N-Methyl-L-histidine	CYZKJBZEIFWZSR-LURJTMIESA-N	Сердечная недостаточность
L-Asparagine	DCXYFEDJOCDNAF-REOHCLBHSA-N	Аденокарцинома; Остеопороз; Рак груди; Рак щитовидной железы
Creatinine	DDRJAANPRJIHGG-UHFFFAOYSA-N	Аденокарцинома; Глиобластома
Glycine	DHMQDGOQFOQNFH-UHFFFAOYSA-N	Аденокарцинома; Остеопороз; Рак груди
hydroxytigecycline	DOGQITILNDNRKT-GAABGNNBSA-O	Калоректальный рак
N-(4-{4-[3-(Dimethylamino)propyl]piperazin-1-yl}phenyl)ethanimidic acid	DPCSPGOPQYRCP-UHFFFAOYSA-N	Рак груди
Sphingosine 1-phosphate	DUYSYHSSBDVJSM-KRWOKUGFSA-N	Болезнь Альцгеймера
(9Z)-Octadec-9-enamide	FATBGEAMYMYZAF-KTKRTIGZSA-N	Болезнь Альцгеймера
Hypoxanthine	FDGQSTZJBFJUBT-UHFFFAOYSA-N	Остеопороз
DL-Methionine	FFEARJCKVFRZRR-UHFFFAOYSA-N	Остеопороз
Sphingomyelin (d18:1/22:0)	FJJANLYCZUNFSE-TWKUQIQBSA-N	Болезнь Альцгеймера
LPG(18:1)	FQQQKGAFFIIGLQ-SNZQZGEVSA-N	Атеросклероз
N-Methylglycine	FSYKKLYZXJSNPZ-UHFFFAOYSA-N	Остеопороз
LPG(18:1)	GCGTXOVNNEFGTPQ-JHOUSYSJSA-N	Болезнь Альцгеймера
cis-Aconitic acid	GTZCVFVGUGFEME-IWQZZHSRSA-N	Глиобластома
D-Mannose	GZCGUPFRVQAUEE-KVTDHHQDSA-N	Рак груди
DL-Glucose	GZCGUPFRVQAUEE-RXEUJOBYNA-N	Глиобластома; Рак груди
4-Hydroxy-2-quinolinecarboxylic acid	HCZHHEIFKROPDY-UHFFFAOYSA-N	Остеопороз

Продолжение таблицы

Метаболит	InChiKey	Фактор
Lactosylceramide (d18:1/16:0)	HLIJNKSBCIDGO-QKLMXXKVSA-N	Болезнь Альцгеймера
DL-Histidine	HNDVDQJCIGZPNO-UHFFFAOYSA-N	Рак щитовидной железы; Сердечная недостаточность
Cholesterol	HVYWMOMLDIMFJA-DPAQBDIFSA-N	Болезнь Альцгеймера
Ethanolamine	HZAXFHJVJLSVMW-UHFFFAOYSA-N	Рак щитовидной железы
isovalerylcarnitine	IGQBPDJNUXPEMT-UHFFFAOYSA-N	Остеопороз
LPC(18:0)	IHNKQIMGVNPMTC-RUZDIDTESA-N	Атеросклероз; Остеопороз
PGP(38:5)	IKUZQXWXKXTBBD-WFYRZQIBSA-N	Атеросклероз
Hexadecanoic acid	IPCSVZSSVZVIGE-UHFFFAOYSA-N	Аденокарцинома
Cyclic AMP	IVOMOUWHDPKRLL-KQYNXXCUSA-N	Глиобластома
2,4(1H,3H)-Pyrimidinedione, 5-(hydroxymethyl)-	JDBGXEHEIRGOBU-UHFFFAOYSA-N	Атеросклероз
13-Oxo-9Z,11E-octadecadienoic acid	JHXA ZBBVQSRKJR-BSZOFBHSA-N	Калоректальный рак
Aminomalonic acid	JINBYESILADKFW-UHFFFAOYSA-N	Аденокарцинома
Tetradecenoylcarnitine	JPZLYVBZGYFKZ-UHFFFAOYSA-N	Рак груди
alpha-Keto-beta-methylvaleric acid	JVQYSWDUAOAHFM-UHFFFAOYSA-N	Остеопороз
Lactate ion(1-)	JVTAAEKCFNVCJ-UHFFFAOYSA-M	Рак груди
DL-Lysine	KDXKERNBIXSRK-UHFFFAOYSA-N	Аденокарцинома; Рак щитовидной железы
Succinate	KDYFGRWQOYBRFD-UHFFFAOYSA-L	Рак груди
Ceramide (d18:1/22:0)	KEPQASGD XIEOIL-GLQCRSESSA-N	Болезнь Альцгеймера
Putrescine	KIDHWZJUCRJVML-UHFFFAOYSA-N	Сердечная недостаточность
PS(38:9)	KKMKLQVYCNFAQB-OCPU LVADSA-N	Атеросклероз
PG(40:7)	KQJBDKBRMLMHMQF-VKYQXOEPSA-N	Атеросклероз
PE(O-30:0)	KTGKQHOCNSDBAI-UUWRZZSWSA-N	Атеросклероз
L-Valine	KZSNJWFQEVHDMF-BYPYZUCNSA-N	Калоректальный рак; Остеопороз
Dihydroceramide (d18:0/18:0)	KZTJQXAANJHSCE-OIDHKYIRSA-N	Болезнь Альцгеймера
LPI(20:3)	LBUGPTQSMSJVAG-MYHDPCGSSA-N	Атеросклероз
Pyruvic acid	LCTONWCANYUPML-UHFFFAOYSA-N	Атеросклероз; Рак груди; Рак щитовидной железы
L-Cystine	LEVWYRKDKASIDU-IMJSIDKUSA-N	Рак щитовидной железы
Sphingomyelin (d18:1/18:0)	LKQLRGMMMAHREN-YJFYUILSA-N	Болезнь Альцгеймера
PA(38:7)	LQEOBXLCLFABAY-MDQBSYBXSA-N	Атеросклероз
Arginylproline	LQJAALCCPOTJGB-YUMQZZPRSA-N	Атеросклероз
SM(d34:1)	MDBQUEXHFWRTRCO-QPPIDDCLSA-N	Атеросклероз
Pinellic acid	MDIUMSLCYIJBQC-MVFSSOIOZSA-N	Калоректальный рак
3-O-sulfogalactosylceramide (42:1)	MEAZTWJVOWHKJM-CIAPRIGGSA-N	Атеросклероз
DL-Serine	MTCFGRXMJLQNBG-UHFFFAOYSA-N	Аденокарцинома; Остеопороз
Oxalic acid	MUBZPKHOEPUJKR-UHFFFAOYSA-N	Аденокарцинома
NAPE (16:0/18:0/20:4)	NAGMTBUTZNPNAF-OVUVQYNQSA-N	Болезнь Альцгеймера
Phosphoric acid	NBIIXXVUZAFLBC-UHFFFAOYSA-N	Аденокарцинома
D-Pyroglutamic acid	ODHCTXKNWHXJC-GSVOUGTGSA-N	Калоректальный рак
Pidolic acid	ODHCTXKNWHXJC-VKHMYHEASA-N	Аденокарцинома
DL-Arginine	ODKSFYDXXFIFQN-UHFFFAOYSA-N	Остеопороз

Продолжение таблицы

Метаболит	InChiKey	Фактор
Choline ion	OEYIOHPDSNJKLS-UHFFFAOYSA-N	Остеопороз
DL-Proline	ONIBWKKTOPOVIA-UHFFFAOYSA-N	Аденокарцинома; Остеопороз; Рак груди; Рак щитовидной железы
L-Tyrosine	OUYCCCASQSFEME-QMMMGPBSA-N	Глиобластома; Остеопороз; Остеопороз; Рак груди; Рак щитовидной железы
Glycerol	PEDCQBHIVMGVHV-UHFFFAOYSA-N	Рак щитовидной железы
carnitine	PHIQHXFUZVPYII-UHFFFAOYSA-N	Остеопороз
PA(40:9)	PKUIWOWIYCEMQI-JHTCAQSYSA-N	Атеросклероз
Hydroxyproline	PMMYEEVYMWASQN-DMTCNVIQSA-N	Остеопороз
Dodecanoic acid	POULHZVOKOAJMA-UHFFFAOYSA-N	Остеопороз
Sphingomyelin (d18:1/24:0)	QEDPUVGSSDPBMD-XTAIVQBESA-N	Болезнь Альцгеймера
Methionine sulfoxide	QEFRNWWLZKMPFJ-YGVKFDHGSA-N	Сердечная недостаточность
SM(d34:0)	QHZIGNLCLJPLCU-QPPIDDCLSA-N	Атеросклероз
1-Glyceryl monohexadecanoate	QHZLMUACJMDIAE-UHFFFAOYSA-N	Аденокарцинома
DL-Tryptophan	QIVBCDIJAJPS-UHFFFAOYSA-N	Калоректальный рак; Остеопороз; Сердечная недостаточность
L-Alanine	QNAYBMKLOCPYGJ-REOHCLBHSA-N	Аденокарцинома; Рак груди
Acetate	QTBSBXVTEAMEQO-UHFFFAOYSA-M	Рак щитовидной железы
glyceric acid	RBNPOMFGQQGHHO-UHFFFAOYSA-N	Аденокарцинома
(+)-2-Aminoheptanoic acid	RDFMDVXONNIGBC-UHFFFAOYSA-N	Остеопороз
Citrulline	RHGKLRLOHDJJDR-BYPYZUCNSA-N	Остеопороз
DL-Leucine	ROHFNLRQFUQHCH-UHFFFAOYSA-N	Остеопороз; Рак щитовидной железы
Sphingomyelin (d18:1/16:0)	RWKUXQNLWDTSLQ-GWQJGLRPSA-N	Болезнь Альцгеймера
Glutathione	RWSXRVCMGQZWBV-WDSKDSINSA-N	Рак щитовидной железы
PA(40:6)	SFHGEOGVGJYLEK-USQBYQOHS-A-N	Атеросклероз
Oxamic acid	SOWBFZRMHSNYGE-UHFFFAOYSA-N	Глиобластома
LPE(18:2)	SVRBKLJIDJHADS-USWSLJGRSA-N	Атеросклероз
N-stearoyl glutamine	TUFYLPJQXJGHQO-FQEVSTJZSA-N	Атеросклероз
4,5-Dihydroorotic acid	UFIVEPVSAGBUSI-UHFFFAOYSA-N	Глиобластома
L-Homoserine	UKAUUVFTDYCKQA-VKHYMYEAS-A-N	Остеопороз
CerP(d34:1)	UNRULDRRONAKLU-TURZORIXSA-N	Атеросклероз
PG(O-38:8)	UPUYOXNICPQLOH-SEPYPVLFSA-N	Атеросклероз
4-Acetamidobutyric acid	UZTFMUBKZQVKLK-UHFFFAOYSA-N	Рак щитовидной железы
2-Amino-4-(2-amino-3-hydroxyphenyl)-4-oxobutanoic acid	VCKPUUFAGNHNH-UHFFFAOYSA-N	Глиобластома
Heptanoylcarnitine	VDPCTFWULDLKHT-UHFFFAOYNA-N	Атеросклероз
Glucosylceramide (d18:1/16:0)	VJLLLMIZEJZTE-NNTBDIJYSA-N	Болезнь Альцгеймера
Ceramide (d18:1/24:1)	VJSBNBBOSZJDKB-KPEYJIHVSA-N	Болезнь Альцгеймера
Ceramide (d18:1/18:0)	VODZWWMEJITOND-NXCSZAMKSA-N	Болезнь Альцгеймера
2-Aminoethane-1-sulfonic acid	VVIUBCNACGLLV-UHFFFAOYSA-N	Рак груди
Acetoacetic acid	WDJHALXBUFZDSR-UHFFFAOYSA-N	Рак груди; Рак щитовидной железы
beta-Hydroxybutyrate	WHBMMWSBFZVSSR-UHFFFAOYSA-M	Рак щитовидной железы

Продолжение таблицы

Метаболит	InChiKey	Фактор
3-Hydroxybutyric acid	WHBMMWSBFZVSSR-UHFFFAOYSA-N	Калоректальный рак; Рак груди
DL-Glutamic acid	WHUUTDBJXRKMK-UHFFFAOYSA-N	Глиобластома; Рак груди; Рак щитовидной железы
Sphingomyelin (d18:1/24:1)	WKZHECFHXLTLJ-QYKFWSDSSA-N	Болезнь Альцгеймера; Глиобластома
PG(38:4)	WYVNEQZXCZILRC-QRLGJTFZSA-N	Атеросклероз
Uridine diphosphate	XCCTYIAWTASOJW-XVFCMESISA-N	Глиобластома
PG(38:5)	XNPYDXUCKFZMGG-JYXIPZFISA-N	Атеросклероз
L-Taurine	XOAAWQZATWQOTB-UHFFFAOYSA-N	Остеопороз; Рак груди
Palmitoylcarnitine	XOMRRQXKHYMOC-UHFFFAOYSA-N	Рак груди
Diphosphoric acid	XPPKVPWEQAFLFU-UHFFFAOYSA-N	Аденокарцинома
DL-Cysteine	XUJNEKJLAYXESH-UHFFFAOYSA-N	Остеопороз
Ceramide (d18:1/20:0)	XWBWIAOWSABHFI-NUKVNZTCSA-N	Болезнь Альцгеймера
2-Ethylhexyl trans-4-methoxycinnamate	YBGZDTIWKFVFCR-JLHYAGUSA-N	Глиобластома
Ceramide (d18:1/16:0)	YDNKGFDKKRUKPY-TURZORIXSA-N	Болезнь Альцгеймера
L-Kynurenine	YGPSJZOEDVAXAB-QMMMGPBSA-N	Глиобластома; Остеопороз; Сердечная недостаточность
PG(36:7)	YHXZGXOZHXSOMU-HPEJQUBYSAN	Атеросклероз
5-Hydroxylysine	YSMODUONRAFBET-UHFFFAOYSA-N	Сердечная недостаточность
Arachidonic acid	YZXBAPSDXZZRGB-DOFZRALJSA-N	Аденокарцинома
DL-Glutamine	ZDXPYRJPNDTMRX-UHFFFAOYSA-N	Аденокарцинома; Глиобластома
Ceramide (d18:1/24:0)	ZJVVOYPTFQEGPH-AUTSUKAISA-N	Болезнь Альцгеймера
LPA(18:1)	ZOOLJLSXNRZLDH-GDCKJWNLSA-N	Атеросклероз
PG(40:8)	ZVBGFCLGRSXLHR-KJHKOENFSA-N	Атеросклероз
PI(40:7)	ZYBHWISILGVOLQK-NLPMJOTPSA-N	Атеросклероз

ПРИЛОЖЕНИЕ Р

СОГЛАСОВАНО

Руководитель работ,
академик Арчаков А.И.



«28» января 2025 г.

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБМХ
Пономаренко Е.А.



«30» января 2025 г.

М.П.

ПРОТОКОЛ (МЕТОДИКА) ОЦЕНКИ ОБЩЕГО СОДЕРЖАНИЯ МЕТАБОЛИТОВ В ОБРАЗЦЕ

1. Назначение

Профилирования метаболома биологических образцов множества биологических образцов с помощью тандема газового хроматографа с масс-спектрометром (ГХ-МС)

2. Основное оборудование

Основное оборудование, используемое для проведения метаболомного профилирования образцов плазмы крови, приведено в таблице 1.

Таблица 1 – Оборудование, используемое для метаболомного профилирования, и его базовые характеристики

№ п/п	Название	Технические характеристики	Производитель, модель
1	Масс-спектрометр	Тип масс-анализатора: времяпролетный, планарный рефлектрон Метод ионизации: электронная Энергия электронов: от 40 до 200 eV Ток эмиссии: от 0,5 до 5 mA Температура ионного источника: от 100 до 300°C Температура трансферной линии: 50 до 350°C Точность измерения масс: < 0,1 Da Диапазон масс: от 10 до 1500 m/z Разрешение: субноминальное ≥ 1500 для m/z 1500, ≥ 1100 для m/z 219, ширина пика ≤ 0,2 Da FWHM для m/z 219 Линейный динамический диапазон: больше четырех порядков Скорость регистрации масс-спектров: от 1 до 500 масс-спектров в секунду Чувствительность: отношение сигнала к шуму S/N≥10 для инжестирования 10 fg OFN в колонку со скоростью регистрации 200 масс/спектров в секунду, IDL (instrument detection limit) ≤ 5fg	LECO Corporation (США), Pegasus BT 4D
2	Хроматографическая система	Модулятор: двухстадийный четырехструйный безрасходный термомодулятор Конструкция термостата для вторичной хроматографической колонки: изолированный программируемый встроенный в основной хроматограф Максимальная температура хроматографических термостатов: 400°C Максимальная скорость нагрева: 40°C/мин	Agilent Technologies (США), 7890B
3	Автоматизированный инжектор образцов (Автосемплер)	Держатель с тремя лотками (54 позиции в каждом) для флаконов объемом 2 мл Станция для промывки растворителями: пятипозиционная	PAL Systems (Швейцария), L-PAL3
4	Ультрацентрифуга	Вместимость: 24×1,5 мл/2,0 мл Охлаждение в температурном диапазоне: от -10 до +40 °C Максимальное ускорение: 15000 об./мин Точность установки скорости вращения: 100 об./мин	Eppendorf Ag (Германия), Eppendorf 5424R
5	Шприц для автоматизированного закола проб	Шприц Pal3-SyS-002861 объемом 10 мкл Калибр иглы: 23s Внешний диаметр: 0,63 мм Длина иглы: 57 мм	Trajan SGE (002861)

Продолжение таблицы 1

№ п/п	Название	Технические характеристики	Производитель, модель
4	Шейкер настольный с контролируемым режимом нагрева образцов	Шейкер с термоблоком SC-18 Диапазон скорости перемешивания: от 300 до 1400 об./мин Диапазон температуры: 25 - 100 °С	Biosan SIA (Латвия), TS100
5	Шейкер настольный с контролируемым режимом нагрева и охлаждения образцов	Термошейкер с термоблоком SmartBlock 12 Максимальная скорость перемешивания: 2000 об./мин Диапазон температуры: 1 - 100 °С	Eppendorf (Германия), ThermoMixer C
6	Смеситель-вортекс	Вращение платформы: орбитальное Скорость вращения: 50–4500 об./мин Подходят: любые пробирки 0,5–50 мл	ELMI (Латвия), V-3
7	Ультразвуковая баня	Нагрев: от 30 до 80°С с шагом 5°С Объем ванны: 2,75 л Частота ультразвука: 37/80 кГц	Elma (Германия), P30 SE
8	Прецизионные весы	Точность: 0,1 мг Время стабилизации: 3 с Предел взвешивания: 65 г	ОНАУС (США), Pioneer PA64C
9	Центрифужный испаритель	Уровень вакуума: 20 гПа Максимальное число оборотов: 1400 об./мин Максимальная вместимость — 144×0,5 мл; Температурные режимы: 30, 45, 60 °С Три режима концентрирования образца в соответствии с типом растворителя	Eppendorf (Германия), Concentrator plus
10	Морозильная камера	Температурный режим: от -50 до -80°С	Thermo Scientific Forma (США), Forma 995
11	Холодильник с морозильной камерой	Температурный режим: до -20°С	Haier (Россия), CEF537AWG
12	Персональный компьютер	Операционная система: Windows 10 pro for workstation Оперативная память: 8 Гб Жесткий диск: 1 Тб	—
13	Источник бесперебойного питания	Емкость: 8000 В×А Время работы при полной нагрузке: 30 мин Время работы при ½ нагрузке: 60 мин	APC by Schneider (США), Smart-UPS On-Line
14	Компрессор	Компрессор 2-х цилиндровый, с кожухом и с осушителем Производительность: 140 л/мин Объем ресивера: 25 л	ЕКОМ (Словакия), DK50 2V M

3. Реактивы и расходные материалы

Основные реактивы и расходные материалы, необходимые для проведения метаболомного профилирования образцов плазмы крови, приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Реактивы и расходные материалы, необходимые для проведения метаболомного профилирования образцов плазмы крови

№ п/п	Наименование	Сорт и Артикул
1	Вода	LC-MS grade, Thermo Fisher (AA47146Y0)
2	Ацетонитрил	LC-MS grade, Carlo Erba (P00610D16)
3	Метанол	LC-MS grade, G.T. Bake (15514065)
4	Изопропанол	USP, PanReac (1410901212)
5	Смесь метиловых эфиров жирных кислот (FAME)	Сертифицированная смесь стандартов, Supelco, Sigma Aldrich (CRM47885)
6	N-метил-N-(триметилсилил)трифторацетамид (MSTFA)	LiChropur, Sigma Aldrich (69479-10X1ML)
7	Метоксиамины гидрохлорид (MeOX)	LiChropur, Sigma Aldrich (226904-5G)
8	Пиридин безводный	99.9%, Sigma Aldrich (SHBL8071)
9	Стандартные соединения	Смесь низкомолекулярных соединений, ожидаемо присутствующих в плазме крови человека, с чистотой не ниже ч.д.а.
10	Наконечники для дозаторов, 10 мкл	Vertex (4130N00)
11	Наконечники для дозаторов, 200 мкл	Vertex (4230N00)
12	Наконечники для дозаторов, 1000 мкл	Vertex (4330N00)
13	Виала 2,0 мл, прозрачная, 12×32 мм, дно плоское, горло винтовое	Agilent cat# 21140
14	Колпачок 9 мм синий винтовой PTFE/RS	Agilent (PN #5185-5820)
15	Вкладыш для флакона, 250 мкл, деактивированное стекло с полимерными ножками, Размер вкладыша: 5,6 x 30 мм	Agilent (5181-8872)
16	Колонка RXI 17 SIL MS 0.25mm 2 meter	Restek (15123)
17	Колонка RXI 5 SIL MS 0.25mm 30 meter	Restek (13623)
18	Септа Thermolite plus 11 мм, центрированная (CenterGuide)	Restek (23864)
19	Входной лайнер с низким перепадом давления Toraz liner Low Pressure Drop с кварцевой ватой	Restek (23309)
20	Уплотнительное кольцо O-Ring из витона	Restek (22241)
21	Сжиженный гелий (чистота 99,9999%)	Linde (Линде Газ Рус)
22	Сжиженный азот (чистота 99,9999%)	Linde (Линде Газ Рус)

4. Вспомогательные материалы

- 1.Комплект одежды из безворсовой ткани, который включает в себя куртку, брюки и колпак ГОСТ 115-88;
- 2.Тапочки кожаные ГОСТ 1135-88;

3. Медицинская маска одноразовая ТУ 9398-001-64260744-2010;
4. Перчатки из винилнитриловой смеси (нитрил 70%, винил 30%) одноразовые;
5. Дезинфицирующие салфетки из безворсовой ткани Трилокс ТУ 9398-003-59004022-2010.

5. Приготовление растворов внешних стандартов для проверки пригодности хроматографической системы и контроля качества

Смесь для проверки пригодности хроматографической системы (ППХС), качества дериватизации и в целом контроля качества состоит из 20 соединений. Состав данной смеси приведен в Таблице 3.

1. Для формирования смеси точную навеску по 10 мг каждого соединения поместить в полипропиленовую пробирку типа эппендорф объемом 1,5 мл, добавить 1 мл деионизированной воды (до итоговой концентрация 10 мг/мл). К растворам валина, изолейцина, метионина, серина, аланина добавить 10 мкл 1 М раствора соляной кислоты, после чего повторно перемешать до полного растворения.
2. Аликвоту объемом 10 мкл отобрать дозатором, перенести в мерную колбу объемом 10 мл и довести деионизированной водой до метки (до итоговой концентрации 10 мкг/мл). Для приготовления серии образцов различных концентраций аликвоты полученного раствора поместить в пробирки типа эппендорфа объемом 1,5 мл. Необходимый объем аликвоты, а также массы соединений в образцах указаны в Таблице 4. Каждый образец готовится в двух экземплярах, после чего высушивается досуха в вакуумном центрифужном испарителе при 30°C.

Таблица 3 – Состав смеси для проверки пригодности хроматографической системы и контроля качества

№ п/п	Вещество	Растворитель
Карбоновые кислоты		
1	4-гидроксibenзойная кислота / 4-hydroxybenzoic acid	деионизованная вода
2	гамма-аминомасляная кислота / gamma-aminobutanoic acid	деионизованная вода
3	дигидрокофеиновая кислота / 3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid	деионизованная вода
4	4-гидроксифенилуксусная кислота / 4-hydroxybenzeneacetic acid	деионизованная вода
5	лимонная кислота / citric acid	деионизованная вода
6	3,4-гидроксифенилуксусная кислота / 3,4-dihydroxyphenylacetic acid	деионизованная вода
7	яблочная кислота / malic acid	деионизованная вода
8	4-метоксифенилуксусная кислота / 4-methoxybenzeneacetic acid	деионизованная вода
9	янтарная кислота / succinic acid	деионизованная вода
10	D-глюкоза / D-glucose	деионизованная вода
11	L-треонин / L-threonine	деионизованная вода
12	L-валин / L-valine	деионизованная вода + 10 мкл 1М HCl
13	L-лизин / L-lysine	деионизованная вода
14	L-триптофан / L-tryptophan	деионизованная вода
15	L-серин / L-serine	деионизованная вода + 10 мкл 1М HCl
16	L-метионин / L-methionine	деионизованная вода + 10 мкл 1М HCl
17	L-аланин / L-alanine	деионизованная вода + 10 мкл 1М HCl
18	L-пролин / L-proline	деионизованная вода
19	L-изолейцин / L-isoleucine	деионизованная вода + 10 мкл 1М HCl
20	L-Аланин / L-alanine	деионизованная вода + 10 мкл 1М HCl

Таблица 4 – Серия разведений смеси для контроля качества

Образец	Аликвота модельной смеси, мкл	Масса каждого соединения в образце, нг
QC6	50	500
QC5	25	250
QC4	10	100
QC3	5	50
QC2	2,5	25
QC1	1	10

6. Экстракция проб перед метаболомным анализом

1. Приготовить экстрагирующий раствор, состоящий из смеси ацетонитрила, изопропанола и воды в объемном соотношении 3:3:2.

NB: *Перед началом приготовления экстрагирующего раствора убедиться (например, с использованием индикаторной бумаги), что ацетонитрил и изопропанол имеют нейтральный pH.*

2. Приготовить раствор для перерастворения, состоящий из смеси ацетонитрила и воды в объемном соотношении 1:1.
3. Поместить бутылки с растворами в ультразвуковую ванну для первичной дегазации на 5 минут, далее дегазировать в токе азота в течение 5 минут. Непосредственно до экстракции хранить экстрагирующий раствор в морозильной камере (-20 °C). Раствор для перерастворения до необходимости хранить при комнатной температуре.

NB: *В экстрагирующих растворах содержится растворенный кислород, которого достаточно, чтобы окислить тиолы или антиоксиданты. Дегазация с применением ультразвуковых ванн не позволяет избавиться от всего растворенного кислорода, поэтому необходимо дополнительно пропускать азот через растворы.*

4. В качестве альтернативного экстрагирующего раствора допускается использование смеси метанола и воды (4:1, объемные доли).

NB: *При этом экстракция и перерастворение будет выполняться в рамках одной стадии. При выборе стратегии экстракции метаболитов метанолом следует учитывать, что он экстрагирует присутствующие в*

образце липиды (прежде всего триглицериды и фосфолипиды). Эти липиды в общем случае нелетучие (даже после триметилсилилирования), потому они задерживаются, а после пиролизуются на инжекторе, септе и лайнерах, а также фиксируются (carry-over жирных кислот) на хроматограммах. Если исследователь принимает решение об использовании раствора метанола в качестве экстрагента, то вся экстракция происходит одностадийно. Образец после первой сушки отправляется на дериватизацию.

5. Для контроля чистоты реактивов и лабораторного пластика холостой образец готовить по той же методике, что и образцы плазмы крови (за исключением добавления самой плазмы), добавляя те же реактивы и совершая те же действия, что и с целевыми образцами.
6. Для контроля качества приготовить образцы QC4 из стокового раствора, исходя из размера анализируемого батча образцов: один закол QC4 на каждые 10 образцов (что равносильно 30 хроматографическим прогонам).
7. Разморозить на льду хранящиеся в морозильной камере (-80°C) аликвоты образцов плазмы крови, гомогенизировать перемешиванием в течение 10 секунд. При необходимости подготовки большого количества биологических образцов (> 30 штук) следует хранить на льду образцы, с которыми не проводятся манипуляции.

***NB:** Чаще всего для метаболомного профилирования используются образцы плазмы (где свертывание крови предотвращается с помощью антикоагулянтов: EDTA, гепарина или цитрата) и сыворотки (в которой кровь свернулась). Использование цитрата в качестве антикоагулянта не рекомендуется при проведении метаболомных исследований по двум причинам: во-первых, цитрат сам по себе является важным метаболитом, а во-вторых, высокое содержание цитрата в исследуемом образце может сказаться на эффективности дериватизации и последующей идентификации метаболитов. При ненаправленном исследовании метаболома плазмы крови воспроизводимость внутри партии образцов в медиане не превышает 18% относительного стандартного отклонения. Исследование сыворотки обычно дает прирост в количестве идентификаций по сравнению с плазмой, однако сбор плазмы осуществляется в более контролируемом режиме.*

8. Отобрать 30 мкл плазмы крови в отдельную пробирку типа эппендорф объемом 1,5 мл.
9. К 30 мкл плазмы крови добавить 1000 мкл охлажденной экстрагирующей смеси. Перемешать в течение 10 секунд на смесителе-вортексе и далее в термошейкере в течение 5 минут при охлаждении до 4 °С.
10. Центрифугировать раствор плазмы крови в экстрагирующей смеси в течение 2 минут (14000 g, комнатная температура).
11. Перенести две аликвоты надосадочной жидкости (по 450 мкл каждая) в чистые пробирки типа эппендорф объемом 500 мкл и высушить их досуха в центрифужном испарителе (30°C). Одна высушенная досуха аликвота используется для исследования, вторая - в качестве дубликата для резервного хранения. Дубликат хранится в морозильной камере при температуре -20 °С до 4 недель.
12. Ресуспендировать высушенную аликвоту экстракта в 450 мкл раствора для перерастворения. Центрифугировать в течение 2 минут (14000 g, комнатная температура).
13. Перенести 400 мкл надосадочной жидкости в чистые пробирки типа эппендорф объемом 500 мкл и высушить их досуха в центрифужном испарителе (30°C).

NB: Необходимо убедиться в надежном высушивании образца перед переходом к метоксимации и дериватизации. Если перед метоксимацией и дериватизацией высушенный экстракт метаболитов плазмы крови хранился в морозильной камере, следует подождать, пока пробирка нагреется до комнатной температуры, чтобы избежать скопления конденсата из воздуха.

7. Подготовка смесей, состоящих из набора стандартных соединений, для создания хромато-масс-спектрометрической библиотеки

Смесь для оценки влияния матричного эффекта на представленность некоторых метаболитов формируется после интерпретации результатов метаболомного профилирования образцов плазмы крови. Эта смесь состоит из соединений, которые были идентифицированы при сопоставлении экспериментальных данных с масс-спектрами из стандартных спектральных библиотек. Пример состава данной смеси приведен в таблице 3, но может быть скорректирован исходя из конкретной задачи.

1. Для формирования смеси точную навеску по 10 мг каждого соединения поместить в полипропиленовую пробирку типа эппендорф объемом 1,5 мл, добавить 1 мл раствора, состоящего из смеси ацетонитрила, изопропанола и воды в объемном соотношении 3:3:2 (до итоговой концентрации 10 мг/мл).
2. Аликвоту объемом 10 мкл отобрать дозатором, перенести в мерную колбу объемом 10 мл и довести деионизированной водой до метки (до итоговой концентрации 10 мкг/мл). Для приготовления серии образцов различных концентраций аликвоты полученного раствора поместить в пробирки типа эппендорфа объемом 1,5 мл. Необходимый объем аликвоты, а также массы соединений в образцах указаны в таблице 5. Каждый образец готовится в двух экземплярах, после чего высушивается досуха в вакуумном центрифужном испарителе при 30°C.
3. Приготовить пулированный образец плазмы крови. Для этого из 50 оригинальных образцов плазмы крови отобрать аликвоты (10 мкл), перенести в одну пробирку типа эппендорф, гомогенизировать на вортексном перемешивателе.
4. Первую партию образцов смесей Lib1-Lib6 экстрагировать и дериватизировать напрямую - по протоколу, описанному в п. 8.
5. Вторую партию образцов Lib1-Lib6 допировать 30 мкл пулированной плазмы крови, после чего перемешать вместе с растворителем для экстракции, метоксимировать и дериватизировать по протоколу, описанному в п. 8.
6. В качестве контроля матричного эффекта необходимо проанализировать пулированный образец плазмы крови аналогично образцам плазмы крови, подготавливаемым для метаболомного анализа.

Таблица 5 – Серия разведений смеси для контроля матричного эффекта

Образец	Аликвота модельной смеси, мкл	Масса каждого соединения в образце, нг
Lib6	50	500
Lib5	25	250
Lib4	10	100
Lib3	5	50
Lib2	2,5	25
Lib1	1	10

8. Проведение метоксимации и дериватизации экстрактов плазмы крови и стандартных смесей

1. Непосредственно перед метоксимацией приготовить раствор гидрохлорида метоксиамин (MeOX) в пиридине с концентрацией 20 мг/мл, MeOX взвешивать на прецизионных весах.
2. Непосредственно перед дериватизацией приготовить раствор 1% смеси метиловых эфиров жирных кислот (FAME) в N-метил-N-(триметилсилил)трифторацетамиде (MSTFA).
3. К каждому высушенной досуха образцу (образец ППХС, проба, контрольный образец, холостой образец) добавить 10 мкл свежеприготовленного раствора MeOX в пиридине (20 мг/мл) и перемешивать в термошейкере (90 мин, 30°C).
4. К каждому образцу после метоксимации добавить 91 мкл свежеприготовленной смеси FAME/MSTFA и перемешивать в термошейкере (30 мин, 37°C).
5. Перенести из каждой пробирки дериватизированные растворы в инактивированные стеклянные вкладыши. Вкладыши без промедления поместить в вials и закрыть винтовыми крышками с силиконовыми септами.
6. Подготовленные вials с образцами отправить на хромато-масс-спектрометрический анализ. При необходимости отсроченного запуска эксперимента хранить подготовленные для анализа образцы в холодильнике.

9. Проведение хромато-масс-спектрометрических исследований

1. Исследования проводить на двумерном газовом хроматографе с детекцией на времяпролетном масс-спектрометре.
2. Провести калибровку детектора в соответствии с рекомендациями производителя.
3. Вials с подготовленными для анализа метаболитами разместить в штативе для вials. Штатив поместить на платформу автосемплера. Для промывки шприца в системе автосемплера подготовить стеклянную вialу с безводным пиридином (3 мл).
4. С управляющей станции запустить программу сбора и процессирования хромато-масс-спектрометрических данных ChromaTOF (версия 5.51).

5. Запрограммировать работу автосемплера (Auto Sampler Mode) по параметрам, перечисленных в Таблице 6.

Таблица 6 – Параметры работы автосемплера при проведении хромато-масс-спектрометрического эксперимента

Параметр	Значение
Объем закола	
Injection volume / Объем закола	1 мкл
Предварительная промывка растворителя	
Pre-injection Solvent Wash Volume / Объем растворителя при предварительном заколе	5 мкл
Pre-injection Solvent Draw Speed / Скорость подачи растворителя при предварительном заколе	5 мкл/с
Pre-injection Solvent Wash 1 Repetitions / Повторения промываний шприца растворителем из позиции 1	2
Wash Vial Depth / Глубина виалы для промывки	40 мм
Waste Port Depth / Глубина порта для слива	10 мм
Предварительная промывка образца	
Bottom Sense Sample Vial / Функция определения дна виалы	Off
Depth Offset / Расстояние от кончика иглы до дна виалы (+2 мм)	0,5 мм
Sample Vial Depth / Глубина виалы с образцом	30 мм
Sample Vial Needle Penetration Speed / Скорость проникновения иглы в виалу с образцом	50 мм/с
Sample Pre-Wash Repetitions / Повторения предварительной промывки образцом	1
Sample Pre-Wash Volume / Объем предварительной промывки образцом	1 мкл

Продолжение таблицы 6

Параметр	Значение
Преаналитический слив	
Sample Pump Fill Strokes / Количество ходов поршня для удаления пузырьков в шприце	5
Sample Pump Fill Volume / Объем образца для удаления пузырьков в шприце	3 мкл
Sample Pump Fill Draw Speed / Скорость набора образца в шприц	2 мкл/с
Delay After Sample Pump Fill Draw Strokes / Задержка между движениями поршня	1 с
Delay After Sample Draw / Задержка после забора образца	0,5 с
Загрузка образца	
Sample Draw Speed / Скорость заполнения шприца образцом	1 мкл/с
Sample Viscosity Delay / Задержка для учета вязкости	2 с
Air Volume / Объем воздуха, засасываемого в шприц	1 мкл
Инжекция образца	
Injection Mode / Режим закола	Fast
Injection Penetration Depth / Глубина погружения иглы при заколе	45 мм
Injection Penetration Speed / Скорость погружения иглы	100 мм/с
Injection Speed / Скорость закола	100 мкл/с
Injection Signal Mode / Сигнал для начала процессирования образца	PlungerUp
Pre-injection Dwell Time / Время нахождения иглы в инжекторе перед забором образца	0 с
Post-injection Dwell Time / Время нахождения иглы в инжекторе после закола образца	0 с
Заключительная промывка шприца растворителем	
Post-injection Solvent Wash Volume / Объем растворителя для промывки шприца после образца	3 мкл
Post-injection Solvent Wash Draw Speed / Скорость забора растворителя	5 мкл/с
Post-Injection Solvent Wash 1 Repetitions / Количество циклов промывки шприца растворителем	5

6. Запрограммировать конфигурацию аналитических колонок в хроматографе (Chromatographic Method / Columns) по параметрам, описанным в Таблице 7.

Таблица 7 – Параметры сборки хроматографической системы

Type / Тип	Location / Расположение	Length, m / Длина, м	Int. Diameter, μ / Внутр. диаметр, мкм	Max Temp, $^{\circ}\text{C}$ / Макс. темп., $^{\circ}\text{C}$	Film Thickness, μ / Толщина пленки, мкм	Phase / Фаза
Inlet / Вход	Front / Зона инжектора					
Capillary / Капиллярная колонка	GC Oven / Основная печь хроматографа	29,70	250	350	0,25	Rxi- 5MS
Capillary / Капиллярная колонка	GC Oven / Основная печь хроматографа	0,05	250	350	0,25	Rxi- 17MS
Capillary / Капиллярная колонка	Modulator / Модулятор	0,10	250	350	0,25	Rxi- 17MS
Capillary / Капиллярная колонка	Secondary Oven / Вторая печь	1,50	250	350	0,25	Rxi- 17MS
Capillary / Капиллярная колонка	Transfer Line / Трансферная линия	0,310	250	350	0,25	Rxi- 17MS
Detector / Детектор	TOF / Времяпролетный					

7. Запрограммировать конфигурацию системы ввода образца (Chromatographic Method / Inlet) по параметрам, описанным в Таблице 8.

Таблица 8 – Параметры ввода образца в хроматограф

Параметр	Значение
Тип загрузки	Split/Splitless (С и без деления потока)
Режим загрузки	Split (С делением потока)
Режим эксплуатации колонок	Constant Flow (Поддержание постоянной скорости потока для газа-носителя)
Потоки в системе ввода	1,00 мл/мин / Entire Run (на протяжении всего хроматографического прогона)
Продувочный поток	3 мл/мин
Деление потока	50
Поток от вентилятора деления потока	50 мл/мин
Суммарный поток	51 мл/мин

8. Запрограммировать температурный градиент (Chromatographic Method / Temp. Zones) по параметрам, описанным в Таблице 9.

Таблица 9 – Параметры ввода образца в хроматограф

Параметр	Значение
Температура инжектора	250°C
Температурный градиент	60°C в течение 1 минуты, далее повышение температуры со скоростью 10°C/мин до достижения 280°C, далее поддержание температуры на уровне 280°C в течение 12 минут
Разница между температурами в первой и второй печи хроматографа	5°C
Разница между температурой в модуляторе и второй печи хроматографа	15°C
Температура трансферной линии	280°C

9. Запрограммировать систему двумерной хроматографии (Chromatographic Method / GC×GC) по параметрам, описанным в Таблице 10.

Таблица 10 – Параметры двумерного хроматографического разделения

Параметр	Значение
Длительность разделения во втором измерении	4 с
Горячий пульс	1,2 с
Охлаждение	0,8 с

10. Запрограммировать работу масс-спектрометра (Mass Spectrometric Method) по параметрам, описанным в Таблице 11.

Таблица 11 – Параметры работы масс-спектрометра

Параметр	Значение
Время задержки записи масс-спектрометрических данных от начала хроматографического прогона	350 с
Скорость записи масс-спектров	200 спектров/с
Диапазон масс	85-500 m/z
Частота экстрагирования	28 кГц
Ток эмиссии	1 мА
Температура ионного источника	250°C
Энергия электронов	70 эВ
Температура трансферной линии	280°C

11. Запрограммировать схему обработки экспериментальных данных (Data Processing Method) в соответствии с Таблицей 12.

Таблица 12 – Параметры первичной обработки экспериментальных данных

Параметр	Значение
Сигнал для количественного анализа	XIC
Допуск по массе	50 ppm
Минимальное соотношение сигнала к шуму	10
Минимальное количество m/z значений ионов (sticks) для идентификации	3
Метод для подсчета индексов удержания	FAME

12. Идентификацию соединений по библиотекам (Library Search Options) в соответствии с Таблицей 13.

Таблица 13 – Параметры программной идентификации метаболитов

Параметр	Значение
Максимальное число предварительных результатов	30
Максимальная масса при библиотечном поиске	1000
Максимальная молекулярная масса	1000
Минимальный показатель схожести (Similarity) для формирования пары “спектр-соединение”	600
Минимальный показатель схожести (Similarity) для идентификации	700
Поиск по библиотекам экспериментально полученных масс-спектров	mainlib, nist, replib, nist_ri

13. Создать рабочий список, содержащий сведения об имени файла данных, позиции виалы с образцом в штативе, количестве технических повторений, параметрах хроматографической и масс-спектрометрической систем и параметрах первичной обработки экспериментальных данных.

10. Проведение первичного анализа результатов метаболомного исследования

Первичный анализ полученных данных автоматически проводится после получения масс-спектров в программе ChromaTOF с предустановленными ранее параметрами.

1. Результаты эксперимента представлять в виде двумерных и одномерных хроматограмм и соответствующих масс-спектров (рис. 1) или в виде таблицы Peak Table, хранящей сведения об экстрагированных хроматографических пика и идентификациях.

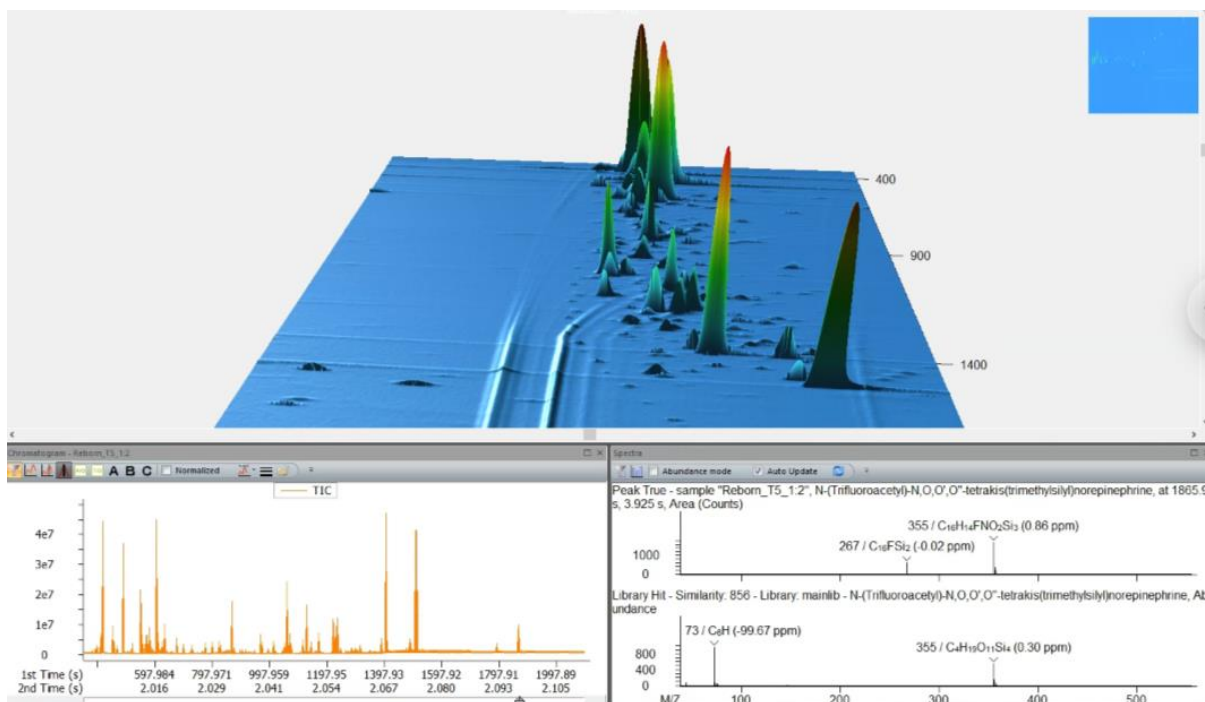


Рисунок 1 – Вид двумерной(сверху) и одномерной (снизу слева) хроматограмм, а также масс-спектров (снизу справа): экспериментального и библиотечного для выбранного пика

2. По умолчанию, в таблице приводится название обнаруженного метаболита (Name), времена удержания соответствующего пика (R.T.), вероятность правильной идентификации (Probability), похожесть экспериментальных данных на библиотечный спектр вероятного соединения и обратно (Similarity и Reverse similarity), соотношение сигнала к шуму (S/N), коэффициент асимметрии пика (Tailing factor) и прочие характеристики находок. При необходимости оператор может фильтровать список идентификаций и модифицировать перечень требуемых столбцов. В таблице Hit List хранятся сведения об альтернативных идентификациях потенциальных метаболитов для каждого пика, выстроенных в порядке вероятности идентификации, которые также могут быть использованы оператором для дополнительной проверки правильности идентификации.
3. Для последующей интерпретации результатов хромато-масс-спектрометрического эксперимента экспортировать идентификации в табличном формате (.csv, xls).

11. Сбор и обработка результатов проверки пригодности хроматографической системы

1. При проведении проверки пригодности хроматографической системы для каждой точки в серии разведений сформировать таблицу, в которой представлены усредненные по трем техническим повторениям интенсивности и площади под хроматографическими пиками соответствующих стандартов, пары времен удержания, а также коэффициенты асимметрии хроматографических пиков.
2. Построить зависимость величины хромато-масс-спектрометрического отклика от концентрации соединения в стандартной смеси и рассчитать коэффициент детерминации Пирсона. Если для одного стандартного соединения образуется несколько производных при дериватизации, то площади производных суммируются и при построении градуировочной кривой используются сумма площадей. Коэффициент детерминации для метаболитов должен быть больше 0,98.
3. Для производных валина, метионина, аланина, глюкозы и аминокислоты (Таблица 14 экспериментальные показатели сравнить с референсными значениями. Показатель асимметрии должен находиться в диапазоне (0,8; 1,5). Коэффициент вариации между техническими повторениями для данных соединений не должен превышать 15%.

Таблица 14 – Приемлемые хроматографические показатели для идентифицируемых соединений в рамках проверки пригодности хроматографической системы

№ п/п	Вещество, дериват	Показатель асимметрии	Сигнал/шум для пробы Q1	CV, %	R2
1	Валин 2TMS	(0,8; 1,5)	>10	<15	>0,98
2	Метионин 2TMS				
3	Аланин 2TMS				
4	Глюкоза				
5	4-Аминобутановая кислота				

12. Подготовка списка идентифицированных соединений на основе экспериментальных данных

1. При подготовке результатов метаболомного профилирования для каждого образца экстрагировать список идентифицированных метаболитов, размеченных по критериям (см. п. 9).
2. Для удаления контаминантов (например, пропиленгликоля из лабораторного пластика) и других малых молекул небиологического происхождения (например, силоксанов из хроматографических колонок) скорректировать список идентификаций на холостую пробу.
3. Для скорректированных идентификаций присвоить идентификаторы метаболитов по системе InChIKey.
4. Усреднить значения хромато-масс-спектрометрического отклика (интенсивности или площади под кривой пика) по трем техническим повторениям.

13. Дополнительные этапы: верификация идентификации и оценка содержания для некоторых метаболитов

1. Для каждого внесенного стандарта определить время удерживания на хроматограмме.
2. Сравнить экспериментально установленные времена удержания стандартных соединений с данными о ранее идентифицированных метаболитах из референтной хромато-масс-спектрометрической библиотеки (пункт 13). Совпадение времен удержания подтверждает правильность программной идентификации. При отклонениях больше установленного допуска (± 4 сек по первой колонке, ± 0.5 сек по второй колонке) провести повторный анализ.
3. Сравнить экспериментальные спектры фрагментации исследуемых веществ со спектрами из референтной библиотеки. Анализ проводится визуально: оценивается распределение фрагментов по m/z и соотношение их интенсивностей.
4. Для каждого стандарта построить калибровочные кривые, анализируя площади пиков на хроматограммах для серийных разведений (Lib1-Lib6). Провести аналогичный анализ для стандартов, добавленных в образцы плазмы крови.

Для каждой концентрации рассчитать коэффициент корректирующий площадь пиков стандартов в плазме по методу “введено-найденно”. При таком подходе аналитик сам готовит для анализа образец с известным содержанием определяемого компонента. Полученный результат ("найденно") сравнивают с заданным содержанием ("введено") по следующей формуле.

$$K = \frac{A_{std} + pl - A_{pl}}{A_{std}},$$

где K - корректирующий коэффициент,

A_{std+pl} - площадь пика в образце плазмы крови, допированном стандартом,

A_{pl} - площадь пика в образце плазмы крови,

A_{std} - площадь пика в стандартном растворе.

Полученное соотношение скорректированных площадей пиков использовать для расчета концентрации метаболитов, применяя уравнение калибровочной зависимости для каждого стандарта.

14. Техника безопасности

К работе допускаются лица, достигшие 18-летнего возраста, прошедшие медицинский осмотр, вводный инструктаж по технике безопасности, первичный инструктаж по технике безопасности, производственной санитарии, пожарной безопасности, первичный инструктаж на рабочем месте.

К самостоятельной работе допускаются лица, имеющие опыт работы с хроматографическим и масс-спектрометрическим оборудованием не менее одного года или прошедшие курсы повышения квалификации по использованию времяпролетных масс-спектрометров в сочетании с двумерными газовыми хроматографами.

ПРИЛОЖЕНИЕ С

СОГЛАСОВАНО

Руководитель работ,
академик Арчаков А.И.



«28» января 2025 г.

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБМХ
Пономаренко Е.А.



«30» января 2025 г.

ПРОТОКОЛ ПРОВЕДЕНИЯ СЕКВЕНИРОВАНИЯ вкДНК

В работе использовалось следующее оборудование:

Встряхиватель лабораторный медицинский "ЦВ-2500" (Хеликон, Россия)

Мульти-ротатор Multi Bio RS-24 со стандартной платформой PRS-26 с принадлежностями (Biosan, Латвия)

Секвенатор PromethION 2 Solo с комплектом принадлежностей (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания)

pH-метр Ultra Basic (Denver Instrument, Германия)

Магнитный штатив МагниРэк-2050 -У для проведения экстракции нуклеиновых кислот для in vitro диагностики (Хеликон, Россия)

Термостат твердотельный ТТ-1 Гном (программируемый) (ДНК-Технология, Россия)

Камера для горизонтального электрофореза SE-1 (Хеликон, Россия)

Источник питания Эльф-8 (ДНК-Технология, Россия)

Трансillюминатор «КвантМ-312Б» (Хеликон, Россия)

Миницентрифуга Mini-15K (Хеликон, Россия)

Флуориметр Qubit 4 (Invitrogen, США)

Проточная ячейка для секвенирования PromethION Flow Cell (R10.4.1), 4 шт, арт. FLO-PRO114 (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания)

Вычислительная станция, отвечающая требованиям: Операционная система (ОС) Windows – 11 и 10; macOS – Sonoma (14), Ventura (13), Monterey (12); Linux – Ubuntu 22.04 и 20.04; 8 ТБ+ хранилища SSD; Графический процессор NVIDIA с объемом памяти графического процессора не менее 12 ГБ; 64 ГБ оперативной памяти DDR4+; 12-ядерный/24-поточный процессор Intel i7/i9 10-го поколения или более новый /

процессор AMD Ryzen; 1 порт USB-C с максимальной скоростью передачи данных 5 Гбит/с

В работе использовались следующие материалы:

пробирки DNA LoBind фирмы (Eppendorf, Германия)

Пробирка для ПЦР с плоской оптически непрозрачной крышкой, объем 0,2 мл (любой производитель)

реагент NEBNext FFPE DNA Repair Mix фирмы NEB

буфер NEBNext FFPE DNA Repair Buffer фирмы NEB

реагент NEBNext Ultra II End Repair / dA-tailing Module фирмы NEB

реагент NEB Blunt/TA Ligase Master Mix фирмы NEB

Вода, свободная от нуклеаз (любой производитель)

Этанол 96% (любой производитель)

ЭДТА (хч или чда, любой производитель)

частицы AMPure XP (Beckman Coulter, США)

1. Пробоподготовка модельной ДНК для нанопорового секвенирования проводится в соответствии со следующим протоколом:

День 1

Репарация и подготовка ДНК

2. Подготовьте реагенты NEBNext FFPE DNA Repair Mix, NEBNext FFPE DNA Repair Buffer и NEBNext Ultra II End Repair / dA-tailing Module в соответствии с инструкциями производителя и поместите на лед.
3. Используйте ≥ 6 нг ДНК на образец. Исходные образцы должны быть выровнены по массе.
4. Подготовьте образцы ДНК в воде, свободной от нуклеаз:
 - a. Для каждого образца убедитесь, что количество ДНК ≥ 6 нг, и перенесите ее в тонкостенную пробирку для ПЦР объемом 0,2 мл.
 - b. Доведите объем до 12 мкл с помощью воды, не содержащей нуклеаз.
 - c. Тщательно перемешайте пипеткой или встряхиванием пробирки.
 - d. Центрифугируйте образцы в микроцентрифуге.
5. В каждой тонкостенной ПЦР-пробирке объемом 0,2 мл, содержащей образцы ДНК, смешайте следующее:
 - e. ДНК с предыдущего шага 12 мкл
 - f. NEBNext FFPE DNA Repair Buffer 0,875 мкл

- g. Ultra II End Prep Reaction Buffer 0,875 мкл
 - h. Ultra II End Prep Enzyme Mix 0,75 мкл
 - i. NEBNext FFPE DNA Repair Mix 0,5 мкл
6. Тщательно перемешайте реакционную смесь дозатором и быстро центрифугируйте.
 7. Используя термостат, инкубируйте реакцию при 20°C в течение 30 минут, затем при 65°C в течение 30 минут.
 8. Ресуспендируйте частицы AMPure XP (AXP) встряхиванием.
 9. Перенесите каждый образец ДНК в отдельную чистую пробирку Eppendorf DNA LoBind объемом 1,5 мл.
 10. Добавьте 80 мкл ресуспендированных частиц AMPure XP (AXP) в каждую реакционную смесь и перемешайте, встряхивая пробирку.
 11. Инкубируйте в ротаторном миксере Nula в течение 10 минут при комнатной температуре.
 12. Приготовьте 5 мл свежего 80% этанола в воде, свободной от нуклеаз.
 13. Центрифугируйте образец и поместите пробирки на магнитный штатив, пока супернатант не станет прозрачным и бесцветным. Держите пробирку на магнитном штативе и пипетируйте супернатант.
 14. Держите пробирку на магнитном штативе и промойте частицы 200 мкл свежеприготовленного 80% этанола, не затрагивая осадок. Удалите этанол с помощью дозатора.
 15. Повторите предыдущий шаг.
 16. Центрифугируйте пробирки и поместите их обратно на магнитный штатив. Удалите дозатором остатки этанола. Дайте осадку высохнуть в течение ~30 секунд, но не высушивайте осадок до точки растрескивания.
 17. Для каждого образца извлеките пробирку из магнитного штатива и ресуспендируйте осадок в 10 мкл воды без нуклеаз. Инкубируйте в течение 5 минут при комнатной температуре.
 18. Осаждайте частицы на магнитном штативе до тех пор, пока элюат не станет прозрачным и бесцветным, в течение как минимум 1 минуты.
 19. Для каждого образца отберите и сохраните 10 мкл элюата в отдельной чистой пробирке Eppendorf DNA LoBind объемом 1,5 мл.
 20. Измерьте концентрацию 1 мкл каждого элюированного образца с помощью флуориметра Qubit.
 21. Примечание: следует ожидать выход примерно 75% от массы исходной ДНК. Например, из 6 нг ДНК ожидается выход примерно 4,5 нг.

22. Перенесите репарированную и подготовленную ДНК на этап лигирования нативных баркодов. На этом этапе также возможно оставить образец при 4°C в течение ночи.

Лигирование нативных баркодов

1. Приготовьте NEB Blunt/TA Ligase Master Mix в соответствии с инструкциями производителя и поместите на лед.
2. Разморозьте необходимые для вашего количества образцов нативные баркоды (NB01-24) при комнатной температуре.
3. Смешайте баркоды по отдельности с помощью дозатора, центрифугируйте и поместите их на лед.
4. Количества образцов должны быть выровнены, чтобы в каждой реакции использовалась одинаковая масса ДНК. Используйте результаты оценки количества ДНК на Qubit, полученные в конце этапа «Репарация и подготовка ДНК», чтобы убедиться, что вы берете эквивалентную массу для каждого образца.
5. Выровняйте и подготовьте образцы ДНК в воде, свободной от нуклеаз:
 - a. Перенесите эквивалентное количество образца в отдельные чистые тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл.
 - b. Доведите объем каждого образца до 7,5 мкл с помощью воды, не содержащей нуклеаз.
 - c. Тщательно перемешайте дозатором или встряхиванием пробирки(ок).
 - d. Центрифугируйте пробирки.
 - e. Выберите уникальный баркод для каждого образца, который будет отсеканен вместе в одной проточной ячейке. До 12 образцов могут быть объединены в один эксперимент. Обратите внимание: используйте только один баркод на образец.
6. В пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл, содержащие выровненные по количеству ДНК образцы, добавьте реагенты в следующем порядке для каждого образца:
 - a. Репарированная ДНК 7,5 мкл
 - b. Нативный баркод (NB01-24) 2,5 мкл
 - c. Blunt/TA Ligase Master Mix 10 мкл
 - d. Всего 20 мкл
7. Тщательно перемешайте реакционную смесь, осторожно пипетируя. Центрифугируйте пробирки.
8. Инкубируйте в течение ночи при комнатной температуре.

День 2

9. Разморозьте ЭДТА при комнатной температуре и перемешайте встряхиванием. Затем центрифугируйте и поместите пробирку на лед.
10. Добавьте следующий объем ЭДТА в каждую пробирку и тщательно перемешайте пипеткой. Центрифугируйте пробирки.
 - а. ЭДТА с прозрачной крышкой: 2 мкл
 - б. ЭДТА с синей крышкой: 4 мкл
11. ЭДТА добавляют на этом этапе для остановки реакции.
12. Соберите все баркодированные образцы в пробирке Eppendorf DNA LoBind объемом 1,5 мл.
13. Ресуспендируйте частицы AMPure XP (AXP) встряхиванием.
14. Добавьте 1,2X объем ресуспендированных частиц AMPure XP (AXP) в собранную смесь и перемешайте пипетированием.
15. Инкубируйте в ротаторном миксере Nula в течение 10 минут при комнатной температуре.
16. Приготовьте 2 мл свежего 80% этанола в воде, свободной от нуклеаз.
17. Центрифугируйте образец и поместите пробирки на магнитный штатив, пока супернатант не станет прозрачным и бесцветным. Держите пробирку на магнитном штативе и пипетируйте супернатант.
18. Держите пробирку на магнитном штативе и промойте частицы 700 мкл свежеприготовленного 80% этанола, не затрагивая осадок. Удалите этанол с помощью дозатора.
19. Повторите предыдущий шаг.
20. Центрифугируйте пробирку и поместите ее обратно на магнитный штатив. Удалите дозатором остатки этанола. Дайте осадку высохнуть в течение ~30 секунд, но не высушивайте осадок до точки растрескивания.
21. Извлеките пробирку из магнитного штатива и ресуспендируйте осадок в 32 мкл воды без нуклеаз.
22. Инкубируйте в течение 10 минут при температуре 37°C. Каждые 2 минуты осторожно встряхивайте образец в течение 10 секунд, чтобы способствовать элюированию ДНК.
23. Осаждайте частицы на магнитном штативе до тех пор, пока элюат не станет прозрачным и бесцветным.
24. Отберите и сохраните 32 мкл элюата в чистой пробирке Eppendorf DNA LoBind объемом 1,5 мл.

25. Измерьте концентрацию 1 мкл элюированного образца с помощью флуориметра Qubit.

26. Примечание: следует ожидать выхода 40–60 % от массы исходной ДНК. Например, если начать с 6 нг на образец и использовать 12 баркодов (всего 72 нг), ожидается выход около 30–40 нг.

27. Перенесите баркодированную библиотеку ДНК на этап лигирования адаптеров и очистки. Вы также можете оставить образец при температуре 4°C в течение ночи.

Лигирование адаптеров и очистка ДНК

1. Нативные адаптеры (NA), используемые в этом наборе и протоколе, не взаимозаменяемы с другими адаптерами для секвенирования.
2. Подготовьте NEBNext Quick Ligation Reaction Module в соответствии с инструкциями производителя и поместите на лед.
3. Не встряхивайте Quick T4 ДНК-лигазу.
4. Центрифугируйте нативный адаптер (NA) и Quick T4 ДНК-лигазу, перемешайте пипеткой и поместите на лед.
5. Разморозьте буфер элюирования (EB) при комнатной температуре и перемешайте встряхиванием. Центрифугируйте и поместите пробирку на лед.
6. Разморозьте буфер для коротких фрагментов (SFB) при комнатной температуре и перемешайте встряхиванием. Центрифугируйте и поместите пробирку на лед.
7. В пробирке Eppendorf LoBind объемом 1,5 мл смешайте в следующем порядке:
 - a. Объединенный баркодированный образец 30 мкл
 - b. Нативный адаптер (NA) 5 мкл
 - c. Буфер реакции быстрого лигирования NEBNext (5X) 10 мкл
 - d. Quick T4 ДНК-лигаза 5 мкл
 - e. Всего 50 мкл
8. Тщательно перемешайте реакционную смесь, осторожно пипетируя. Центрифугируйте пробирку.
9. Инкубируйте реакцию в течение 20 минут при комнатной температуре.
10. На следующем этапе очистки для промывки частиц используется буфер коротких фрагментов (SFB) вместо 80% этанола. Использование этанола будет губительным для реакции секвенирования.
11. Ресуспендируйте гранулы AMPure XP (AXP) встряхиванием.
12. Добавьте в реакционную смесь 60 мкл (1,2x) ресуспендированных гранул AMPure XP (AXP) и перемешайте пипетированием.

13. Инкубируйте пробирку в миксере Nula (ротаторном миксере) в течение 10 минут при комнатной температуре.
14. Центрифугируйте и поместите пробирку на магнитный штатив. Держите пробирку на магнитном штативе и удалите супернатант.
15. Промойте частицы, добавив 250 мкл буфера для коротких фрагментов (SFB). Встряхните частицы, чтобы ресуспендировать, центрифугируйте, затем верните пробирку в магнитный штатив и дайте частицам осесть. Удалите супернатант с помощью пипетки.
16. Повторите предыдущий шаг.
17. Центрифугируйте и поместите трубку обратно на магнитный штатив. Удалите пипеткой остатки супернатанта. Дайте осадку высохнуть в течение ~30 секунд, но не пересушивайте до состояния растрескивания.
18. Извлеките пробирку из магнитного штатива и ресуспендируйте осадок в 33 мкл элюирующего буфера (EB).
19. Центрифугируйте пробирку и инкубируйте в течение 10 минут при температуре 37°C. Каждые 2 минуты перемешивайте образец, осторожно встряхивая его в течение 10 секунд, чтобы способствовать элюированию ДНК.
20. Осаждайте частицы на магнитном штативе до тех пор, пока элюат не станет прозрачным и бесцветным (не менее 1 минуты).
21. Отберите 33 мкл элюата, содержащего библиотеку ДНК, в чистую пробирку Eppendorf DNA LoBind объемом 1,5 мл.
22. Количественно определите 1 мкл элюированного образца с помощью флуориметра Qubit. Примечание: следует ожидать выхода приблизительно в 20% от исходной массы ДНК. Например, если начать с 6 нг на образец и использовать 12 баркодов (всего 72 нг), ожидается выход приблизительно 15 нг.
23. Подготовленная библиотека используется для загрузки в проточную ячейку. Храните библиотеку на льду или при 4°C до готовности к загрузке.

Подготовка и загрузка проточной ячейки PromethION

1. Этот метод совместим только с проточными ячейками R10.4.1 (FLO-PRO114M).
2. Разморозьте буфер секвенирования (SB), гранулы LIB, растворы Flow Cell Tether (FCT) и Flow Cell Flush (FCF) при комнатной температуре. Встряхните, затем центрифугируйте и поместите на лед.
3. Для приготовления смеси для активации проточной ячейки смешайте Flow Cell Tether (FCT) и Flow Cell Flush (FCF), как указано ниже. Перемешивайте встряхиванием при комнатной температуре. Для одноразовых пробирок: добавьте 30 мкл Flow Cell Tether

(FCT) непосредственно в пробирку Flow Cell Flush (FCF). Для флаконов: В чистой пробирке смешайте следующие реагенты:

- a. Flow Cell Flush (FCF) 1170 мкл
- b. Flow Cell Tether (FCT) 30 мкл

Общий объем 1200 мкл

4. После извлечения проточных ячеек из холодильника подождите 20 минут, прежде чем вставлять проточную ячейку в секвенатор PromethION, чтобы проточная ячейка нагрелась до комнатной температуры. Во влажной среде на проточной ячейке может образовываться конденсат. Проверьте золотые штырьки разъема сверху и снизу проточной ячейки на наличие конденсата и протрите безворсовой салфеткой, если таковой имеется. Убедитесь, что на нижней стороне проточной ячейки присутствует черная нагревательная прокладка.
5. Для PromethION 2 Solo загрузите проточную ячейку(и) следующим образом:
 - a. Положите проточную ячейку на металлическую пластину.
 - b. Вставьте проточную ячейку в разъем до тех пор, пока не исчезнут золотые контакты.
6. Для PromethION 24/48 загрузите проточную ячейку(и) в стыковочные порты:
 - a. Выровняйте проточную ячейку с разъемом по горизонтали и вертикали, прежде чем плавно вставить ее на место.
 - b. Сильно нажмите на проточную ячейку и убедитесь, что защелка защелкнулась и встала на место.
7. Вставка проточных ячеек под неправильным углом может привести к повреждению штифтов на секвенаторе PromethION и повлиять на результаты секвенирования.
8. Откройте крышку входного порта, сдвинув ее по часовой стрелке.
9. Будьте осторожны при извлечении буфера из проточной ячейки. Не удаляйте более 20–30 мкл и убедитесь, что массив пор постоянно покрыт буфером. Введение пузырьков воздуха в массив может необратимо повредить поры.
10. После открытия входного порта отберите небольшой объем, чтобы удалить пузырьки воздуха:
 - a. Установите наконечник пипетки P1000 на 200 мкл.
 - b. Вставьте наконечник во входной порт.
 - c. Поворачивайте колесо, пока циферблат не покажет 220–230 мкл или пока не увидите небольшой объем буфера, поступающего в наконечник пипетки.

11. Загрузите 500 мкл смеси для активации проточной ячейки через входной порт, избегая попадания пузырьков воздуха. Подождите пять минут. В это время подготовьте библиотеку для загрузки.
12. Тщательно перемешайте содержимое Library Beads (LIB) с помощью пипетки.
13. Пробирка Library Beads (LIB) содержит суспензию гранул. Эти гранулы оседают очень быстро. Крайне важно смешивать их непосредственно перед использованием.
14. В новой пробирке Eppendorf DNA LoBind объемом 1,5 мл подготовьте библиотеку для загрузки следующим образом:
 - a. Буфер для секвенирования (SB) 100 мкл
 - b. Library Beads (LIB), тщательно перемешанные перед использованием 68 мкл
 - c. ДНК-библиотека 32 мкл

Всего 200 мкл

Примечание: Подготовленная библиотека используется для загрузки в проточную ячейку. Держите библиотеку на льду или при 4°C до готовности к загрузке.

15. Завершите заполнение проточной ячейки, медленно загрузив 500 мкл смеси для активации проточной ячейки во входной порт.
16. Аккуратно перемешайте подготовленную библиотеку пипеткой непосредственно перед загрузкой.
17. Загрузите 200 мкл библиотеки во входной порт с помощью пипетки P1000.
18. Закройте клапан, чтобы закрыть входной порт.
19. Установите световой экран на проточную ячейку сразу после загрузки библиотеки для получения оптимального результата секвенирования.
20. Мы рекомендуем оставлять защитный экран на проточной ячейке при загрузке библиотеки, в том числе во время любых этапов промывки и повторной загрузки. Защитный экран можно снять, когда библиотека будет извлечена из проточной ячейки.
21. Если с проточной ячейки был снят световой экран, установите его следующим образом:
 - a. Совместите вырезанный впускной порт в защитном экране с крышкой впускного порта на проточной ячейке. Передний край защитного экрана должен располагаться над идентификатором проточной ячейки.
 - b. Плотнo прижмите защитный экран к крышке впускного порта. Зажим впускного порта защелкнется под крышкой впускного порта.
22. Закройте крышку PromethION, когда будете готовы начать цикл секвенирования на MinKNOW. Подождите не менее 10 минут после загрузки проточных ячеек в секвенатор PromethION, прежде чем начинать секвенирование. Это поможет увеличить выход секвенирования.

23. Если после завершения эксперимента по секвенированию вы захотите повторно использовать проточную ячейку, следуйте протоколу набора для промывки проточной ячейки и храните промытую проточную ячейку при температуре 2–8 °C.

Протокол обработки данных нанопорового секвенирования

Обработка полученных данных проводилась вычислительной станции с операционной системой Linux. Требования к программному обеспечению:

Dorado (версия 0.8.3): <https://github.com/nanoporetech/dorado>

Modkit (версия 0.4.1): <https://github.com/nanoporetech/modkit>

Сначала с помощью модуля basecaller программы dorado был произведена идентификация оснований (бейсколинг) по данным прочтений. Использовалась модель бейсколлинга, позволяющая определять модифицированные основания: 5-метилцитозин (5mC) и 5-гидроксиметилцитозин. и (5hmC). Выходные данные были сохранены в формате bam. Пример команды для проведения бейсколлинга:

```
dorado basecaller --models-directory ~/models/ --recursive --output-dir calls/ --  
reference  
~/references/GCA_000001405.29/ncbi_dataset/data/GCA_000001405.29/GCA_0000014  
05.29_GRCh38.p14_genomic.fna --modified-bases 5mCG_5hmCG --kit-name SQK-  
NBD114-24 sup  
../../nanopore_data/Pr_20240920_model_cfDNA/6_model_cfDNA/20240920_1901_P2S  
_00087-B_PAU55091_e203a887/pod5_pass/
```

Значения параметров:

--models-directory: Каталог для поиска существующих моделей или загрузки новых моделей. [по умолчанию: "."]

--recursive: Рекурсивно сканировать каталоги для загрузки файлов FAST5 и POD5.

--output-dir: Каталог для выходных файлов.

--reference: Путь к референсной последовательности для выравнивания. [по умолчанию: ""]

--modified-bases: Список модифицированных оснований, разделенных пробелами. Выбрать из: pseU, m6A_DRACH, m6A, 6mA, m5C, 5mC, 5mCG_5hmCG, 5mCG, 5mC_5hmC, inosine_m6A, 4mC_5mC.

--kit-name: Разбор по баркодам с указанным названием комплекта реагентов. Выбрать из: EXP-NBD103 EXP-NBD104 EXP-NBD114 EXP-NBD114-24 EXP-NBD196 EXP-PBC001 EXP-PBC096 SQK-16S024 SQK-16S114-24 SQK-LWB001 SQK-MLK111-96-XL SQK-MLK114-96-XL SQK-NBD111-24 SQK-NBD111-96 SQK-NBD114-24 SQK-NBD114-96

SQK-PBK004 SQK-PCB109 SQK-PCB110 SQK-PCB111-24 SQK-PCB114-24 SQK-RAB201
SQK-RAB204 SQK-RBK001 SQK-RBK004 SQK-RBK110-96 SQK-RBK111-24 SQK-
RBK111-96 SQK-RBK114-24 SQK-RBK114-96 SQK-RLB001 SQK-RPB004 SQK-RPB114-24
TWIST-16-UDI. [по умолчанию: ""].

sup: обязательный параметр, качество модели бейсколлинга (в примере – высшее качество)

.././nanopore_data/Pr_20240920_model_cfDNA/6_model_cfDNA/20240920_1901_P2S_00087-B_PAU55091_e203a887/pod5_pass/: обязательный параметр, путь к каталогу с исходными данными в формате pod5.

Помимо бейсколлинга, данная команда также производит выравнивание прочтений на референсный геном, в данном случае это сборка человеческого генома GRCh38.p14.

Демультимплексирование после бейсколлинга проводилось с помощью модуля demux программы Dorado:

```
dorado demux --output-dir demuxed/ --no-classify calls_2024-11-04_T12-15-02.bam
```

Значения параметров:

--output-dir: Выходная папка для демультимплексированных прочтений.

--no-classify: Пропустить классификацию баркодов. Осуществляется только демультимплексирование на основе существующей классификации в прочтениях.

calls_2024-11-04_T12-15-02.bam: обязательный параметр, путь к файлу с прочтениями после бейсколлинга.

Затем оценивалось качество прочтений с помощью модуля stats пакета samtools.

Использованная команда:

```
samtools stats  
../data/bam_pass/barcode05/PAU55091_pass_barcode05_e203a887_582376a0_0.bam |  
grep "average quality"
```

Развернутый отчет о файле после выравнивания был получен с помощью программы samtools:

```
samtools stats demuxed/582376a0f3a21174166af8976ffddd5e2eba3e33_SQK-  
NBD114-24_barcode05.bam | grep SN > stats.log
```

Анализ распределения модифицированных оснований производился с помощью программы modkit pileup. Пример команды:

```
modkit pileup --include-bed CG_motif.bed --ref MGMT750-  
NC_000010.11[129465781..129468355].fa --with-header sorted.bc05.bam  
pileups/all_CG_no_filtering.05.bed
```

Значения параметров:

`--include-bed`: Файл BED, который ограничит оценку порогового значения и результаты наложения (pileup) только позициями, попадающими в интервалы в BED-файле. Здесь – файл с координатами остатков цитозина в CpG-участках. Способ его создания приведен ниже.

`--ref`: Референсная последовательность в формате FASTA. Требуется для фильтрации мотивов (например, CpG)

`--with-header`: Вывод заголовка первой строкой.

`sorted.bc05.bam`: Необходимый параметр, путь к Bam-файлу с прочтениями после бейсколлинга.

`pileups/all_CG_no_filtering.05.bed`: Необходимый параметр, название результата работы данной команды - файла с распределением модифицированных оснований в формате BedMethyl.

BED-файл с координатами остатков цитозина в CpG-участках создается следующей командой:

```
modkit motif-bed MGMT750-NC_000010.11[129465781..129468355].fa CG 0 1>
CG_motif.bed
```

Значения параметров:

`MGMT750-NC_000010.11[129465781..129468355].fa`: Необходимый параметр, путь к референсной последовательности.

`CG`: мотив CpG-участков.

`0`: смещение в мотиве.

`CG_motif.bed`: Необходимый параметр, название результата работы данной команды – файла с координатами CpG-участков.

ПРИЛОЖЕНИЕ Т

СОГЛАСОВАНО

Руководитель работ,
академик Арчаков А.И.



«28» января 2025 г.

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБМХ
Пономаренко Е.А.



«30» января 2025 г.
М.П.

ПРОТОКОЛ *IN VITRO* МОДЕЛИРОВАНИЯ СТАРЕНИЯ МСК ЧЕЛОВЕКА

1. Используемые материалы и оборудование

1.1. Материалы

- 1.1.1. культуральная среда α -MEM (ПанЭко, РФ)
- 1.1.2. фетальная бычья сыворотка (FBS, Gibco, США)
- 1.1.3. GlutaMAX™ (FBS, Gibco, США)
- 1.1.4. пенициллин/стрептомицин (Thermo Fisher Scientific, США)
- 1.1.5. чашки Петри диаметром 100 мм (Thermo Fisher Scientific или аналог)
- 1.1.6. культуральные флаконы для культивирования тканей “T-75” (Thermo Fisher Scientific или аналог)
- 1.1.7. 0,4% раствор трипанового синего (ПанЭко или аналог)
- 1.1.8. фосфатный солевой буфер (ФБС, ПанЭко или аналог)
- 1.1.9. 0,25% раствора Трипсин-ЭДТА (ПанЭко или аналог)
- 1.1.10. H_2O_2 (Merck, Германия)
- 1.1.11. 6-, 12- и 96-луночные планшеты (Corning, США)
- 1.1.12. раствор МТТ (1 мг/мл, ПанЭко или аналог)
- 1.1.13. диметилсульфоксид (Servicebio или аналог)
- 1.1.14. набор Aging Cell β -galactosidase Staining Kit (Servicebio или аналог)
- 1.1.15. CM- H_2 DCFDA (Invitrogen или аналог)
- 1.1.16. Hoechst-33342 (Thermo Fisher Scientific или аналог)
- 1.1.17. набор RNeasy Mini Kit (Qiagen)

- 1.1.18. набор MMLV RT (Evrogen)
- 1.1.19. набор qPCRMix-HS SYBR+Low RES (Evrogen)
- 1.1.20. кристаллический фиолетовый (ПанЭко или аналог)
- 1.1.21. уксусная кислота, ос. ч. (любой производитель)
- 1.1.22. наборы для ИФА на интерлейкин-1 бета (IL-1 β) и моноцитарный хемотаксический 1.1.23. белок 1 (MCP-1) (ВекторБест или аналог)
- 1.1.24. Наконечники для лабораторных пипеток с фильтрами, свободные от нуклеаз (любой производитель).
- 1.1.25. Пробирки полипропиленовые на 1,5 мл, свободные от нуклеаз, Protein LoBind (Eppendorf, Кат. № 0030108442 или аналог).
- 1.1.26. Пробирки полипропиленовые на 0,5 мл, свободные от нуклеаз, Protein LoBind (Eppendorf, Кат. № 0030108434 или аналог).
- 1.1.27. Пробирки полипропиленовые на 0,2 мл, свободные от нуклеаз (любой производитель).
- 1.1.28. Перчатки медицинские (любой производитель).

1.2. Оборудование

- 1.2.1. Твёрдотельный термостат (TS100, Biosan, или аналог).
- 1.2.2. Весы аналитические (XP205, Mettler Toledo, или аналог).
- 1.2.3. Счетчик клеток (TC20, BioRad, или аналог).
- 1.2.4. Центрифуга-вортекс (MSC-3000, BioSan, или аналог).
- 1.2.5. Флуоресцентный микроскоп (ZOE, BioRad, или аналог)
- 1.2.6. Проточный цитофлуориметр (ZE5, Bio-Rad, или аналог)
- 1.2.7. Микропланшетный ридер (iMark, Bio-Rad, или аналог).
- 1.2.8. Инвертированный микроскоп (PrimoVert, Carl Zeiss, или аналог)
- 1.2.9. Термоциклер (CFX96 real-time PCR Detection System, Bio-Rad, или аналог).
- 1.2.10. Набор лабораторных автоматических пипеток (производитель – любой).
- 1.2.11. программное обеспечение Floreada.io (<https://floreada.io/analysis>)
- 1.2.12. программное обеспечение ImageJ
- 1.2.13. CO₂- инкубатор: температура 37°C $\pm$ 1°C, влажность 90% $\pm$ 10%, содержание 5.0% $\pm$

1.0% CO₂ (любой производитель)

1.2.14. Ламинарный шкаф (биологическая безопасность не менее класса 2) (любой производитель)

1.2.15. Водяная баня: 37°C ± 1°C (любой производитель)

2. Порядок работы

Важно! Все операции выполняются в перчатках в условиях стерильного клеточного бокса. Перед началом работы оборудование и рабочие поверхности обработать с помощью 70% раствора этилового спирта.

Для получения *in vitro* модели старения МСК выполнить следующие действия:

2.1. Культивирование МСК.

2.1.1. Приготовить полную культуральную среду α-MEM (ПанЭко, РФ) с добавлением 10% FBS, 1% GlutaMAX™ (все Gibco, США) и 100 единиц/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина (Thermo Fisher Scientific, США).

2.1.2. Вials с клетками извлечь из криобанка быстро разморозить при 37°C.

2.1.3. Ресуспендировать 1 мл содержимого вials в 5 мл полной культуральной среды.

2.1.4. Клеточную суспензию центрифугировать при 300g 5 мин.

2.1.5. Клеточный осадок ресуспендировать в 1 мл полной культуральной среды.

2.1.6. Количество клеток и их жизнеспособность определить с использованием счетчика клеток TC20 (BioRad), предварительно окрасив клетки 0,4% раствором трипанового синего.

2.1.7. Клетки МСК культивировать на чашках Петри диаметром 100 мм или в культуральном флаконе для культивирования тканей “Т-75” при концентрации $5-7 \times 10^3$ клеток/см² при 37°C и 5% CO₂.

2.1.8. Замену культуральной среды в культуральных флаконах на новую производить каждые 2-3 дня.

2.1.9. При достижении 70-80% конфлюэнта, удалить среду, промыть фосфатным солевым буфером (ФБС), добавить 2,5 мл 0,25% раствора Трипсин-ЭДТА, инкубировать 5 минут до открепления клеток.

- 2.1.10. Добавить 5 мл полной культуральной среды. Центрифугировать 5 минут при 300g. Супернатант слить, клетки ресуспендировать в 1 мл культуральной среды.
- 2.1.11. Количество клеток и их жизнеспособность определить с использованием счетчика клеток TC20 (BioRad).
- 2.1.12. Для работы использовать МСК, соответствующие минимальным критериям стволовости.
- 2.2. Протокол индукции клеточного старения МСК.
- 2.2.1. Для стресс-индуцированного клеточного старения МСК использовать обработку клеток с помощью H_2O_2 (Merck, Германия). Проводить индукцию клеточного старения с помощью обработки H_2O_2 в МСК раннего пассажа ($p < 5$).
- 2.2.2. МСК рассадить в лунки 96-луночного планшета (Corning, США) в концентрации 5×10^3 клеток/см² в 100 мкл полной культуральной среды. Инкубировать в течение 24 ч.
- 2.2.3. Для оценки цитотоксичности H_2O_2 и выбора сублетальной концентрации использовать МТТ-тест для определения количества жизнеспособных МСК.
- 2.2.4. Приготовить растворы 2-х кратных разведений H_2O_2 в полной культуральной среде с концентрациями в диапазоне от 50 до 800 мкМ.
- 2.2.5. Полученные разведения использовать для воздействия на клетки: добавить 100 мкл соответствующего раствора к МСК (в соотношении 1:1) в планшете, тем самым уменьшить концентрацию вещества еще в 2 раза.
- 2.2.6. Планшеты с клетками инкубировать 24 ч при температуре 37°C и 5% CO₂.
- 2.2.7. Заменить среду на содержащую раствор МТТ (1 мг/мл, ПанЭко, РФ) в объеме 100 мкл/лунка.
- 2.2.8. Инкубировать в течение 2 ч при 37°C и 5% CO₂.
- 2.2.9. Отобрать среду, промыть 200 мкл ФСБ и растворить осадки кристаллов формазана в диметилсульфоксиде (ДМСО, Servicebio, Китай) (100 мкл/лунка).
- 2.2.10. Инкубировать в течение 15 мин в темноте при перемешивании в условиях 150-200 об/мин для растворения кристаллов формазана.

- 2.2.11. Измерить оптическую плотность (ОП) растворов на длине волны 570 нм с помощью микропланшетного ридера iMark (Bio-Rad, США).
- 2.2.12. Полученные значения ОП поглощения использовать для расчета жизнеспособности клеток, для этого нормировать на значения ОП для контрольных образцов (МСК в полной культуральной среде без обработки) и выражать в %.
- 2.2.13. Определить субтоксические дозы воздействия и определить рабочую концентрацию H_2O_2 , при использовании которой количество жизнеспособных МСК было выше 75% от контроля (100%).
- 2.2.14. В качестве модельных клеток репликативного старения использовать МСК позднего пассажа ($p > 10$). Для этого культивировать МСК (пункт 2.1 протокола) до достижения необходимого пассажа.
- 2.3. Подтверждение индукции клеточного старения МСК.
- 2.3.1. Для подтверждения индукции клеточного старения использовать МСК, обработанные соответствующей концентрацией H_2O_2 , а также использовать МСК позднего пассажа.
- 2.3.2. МСК рассадить в количестве 5×10^3 клеток/см² в 6-луночные/12-луночные планшеты. Инкубировать 24 ч.
- 2.3.3. Внести H_2O_2 в лунки планшета в концентрации 400 мкМ. Инкубировать 2 или 24 ч.
- 2.3.4. Исследовать морфологию и аутофлуоресценцию стареющих МСК с использованием системы визуализации ZOE (Bio-Rad, США), а также проточного цитофлуориметра ZE5 (Bio-Rad, США) и программного обеспечения Floreada.io (<https://floreada.io/analysis>).
- 2.3.5. Оценить уровень активности β -галактозидазы (SA- β -gal) в МСК со стресс-индуцированным или репликативным старением с помощью цитохимического окрашивания. Использовать набор Aging Cell β -galactosidase Staining Kit (Servicebio, Китай), согласно рекомендациям производителя. Результаты окрашивания МСК исследовать с использованием инвертированного микроскопа PrimoVert (Carl Zeiss, Германия). Количество

клеток с SA- β -gal активностью определять как % окрашенных клеток от общего количества клеток.

- 2.3.6 Определить уровень активных форм кислорода (АФК) в сенесцентных МСК с помощью флуоресцентного красителя хлорметилпроизводного 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетата (CM-H₂DCFDA, Invitrogen, США), который в присутствии АФК подвергается окислению с образованием флуоресцентного соединения дихлорфлуоресцеина (DCF). Дополнительно окрасить клетки с помощью Hoechst-33342 (Thermo Fisher Scientific, США) для нормирования DCF-положительных клеток на общее количество клеток. Инкубировать клетки с CM-H₂DCFDA и Hoechst-33342 в течение 0,5 ч. Определить среднюю интенсивности флуоресценции клеток с помощью системы визуализации ZOE (Bio-Rad, США) и рассчитать с использованием программного обеспечения ImageJ. Количество внутриклеточных АФК определять как процент окрашенных DCF клеток от общего количества клеток (окрашенных Hoechst-33342).
- 2.3.7. Оценить прогрессию клеточного цикла МСК путем определения уровня экспрессии характерных маркёров (*TP53* (p53), *CDKN1A* (p21) и *CDKN2A* (p16) методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Для этого выделить РНК из МСК с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия), в соответствии с рекомендациями производителя. Проводить обратную транскрипцию с использованием набора MMLV RT (Evrogen, Россия), а также ПЦР-РВ с использованием набора qPCRMix-HS SYBR+Low RES (Evrogen, Россия) в приборе CFX96 real-time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США).
- 2.3.8. Оценить количество колониеобразующих единиц (КОЕ) МСК путем цитохимического окрашивания с помощью кристаллического фиолетового (ПанЭко, РФ). Вносить раствор уксусной кислоты для растворения кристаллов. Измерить ОП раствора при 595 нм с помощью микропланшетного ридера iMark (Bio-Rad, США).
- 2.3.9. Исследовать профиль секретируемых стареющими МСК молекул с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Для этого собрать кондиционную среду от сенесцентных МСК и анализировать с использованием наборов для ИФА

на интерлейкин-1 бета (IL-1 β) и моноцитарный хемотаксический белок 1 (MCP-1), в соответствии с рекомендациями производителя. Измерить ОП при 450 нм с помощью считывателя поглощения на микропланшетах iMark (Bio-Rad, США).