

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт теоретической и экспериментальной биофизики
Российской академии наук

МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ
«ДЕНЬ ДНК – 2026»

24 апреля 2026 года
СБОРНИК ТЕЗИСОВ

Издательство «Синхробук» (Synchrobook™)
Пушино
2026

Материалы конференции «День ДНК-2026» 24 апреля 2026 года.

Сборник тезисов / сост. пресс-служба ИТЭБ РАН:
к.б.н. Перевязова Т.А., к.б.н. Дюкина А.Р., оформление
Панчелюга В.А., дизайн обложки Абакумова Ю.Ю. —
Пушино : ИТЭБ РАН, изд-во «Синхробук» (Synchrobook™),
2026. 52 с.

ISBN 978-5-91874-916-6

GORDIZ ...•••

СИНТОЛ
НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННАЯ КОМПАНИЯ

BICCAD
Biotechnology Company

PCR NEWS
амплифицируем главное



БИОХИММАК
Группа компаний

ХИМЕО

© ИТЭБ РАН, Пушино, 2026

© Синхробук (Synchrobook™), Пушино, 2026

СОДЕРЖАНИЕ

*Алексеева А.Я., Квон Д.А., Веретенников А.В.,
Жевора С.В., Воробьев А.А., Курочкин В.Е.,
Пушкин А.А., Алексеев Я.И.*

Отечественные технологии секвенирования ДНК ... 6

Глушенков А.Н., Комаров В.М., Гриневич А.А.

Прототропная таутомерия аденина.....8

*Жданова Е.С., Ермаков А.М., Ермакова Е.А.,
Козина Д.Д., Менухов В.О.*

**Идентификация микроорганизмов в составе
пробиотиков с помощью нанопорового
секвенирования 13**

Клещенко Е.В.

**Нанопоровое секвенирование ДНК без ДНК.
Roche представляет sequencing-by-expansion 18**

*Малыхина Е.А., Кольжецов Н.П., Фролова М.С.,
Шавкунов К.С., Озолинь О.Н.*

**Использование нанопорового секвенирования
для анализа нативной микробиоты питьевого
пастеризованного молока 22**

*Петров А.А., Ермаков А.М., Белозеров Д.П.,
Кутаев Д.А., Борисевич С.В.*

Нанопоровое секвенирование: теория и практика .. 25

Сирота Н.П.

**Программное обеспечение для анализа
цифровых изображений ДНК комет,
находящееся в свободном доступе.....29**

Чуев Г.Н., Мамедов Т.В., Аракелян А.Г.

**Бесконтактная атомно-силовая микроскопия — окно
в наномир биомолекул32**

Шустов А.В.

**Внедрение CAR-T-терапии в Казахстане: создание
академического производства лентивирусных
векторов и CAR-T-клеток 34**

*Даниэль В.В., Иванов М.В., Мамчур А.А., Спектор Е.Д.,
Зеленова Е.А., Маткава Л.Р., Николаева Е.А., Юдин В.С.,
Кескинов А.А., Буханова А.А., Гребнев П.А.,
Стражеско И.Д., Ткачева О.Н., Скворцова В.И.,
Юдин С.М., Каштанова Д.А.*

**Применение эпигенетических часов для
установления взаимосвязи между
метилованием ДНК, ускоренным старением и
возраст-ассоциированными заболеваниями 39**

*Игнатъева О.А., Мамчур А.А., Побережный Д.Ю.,
Зеленова Е.А., Маткава Л.Р., Даниэль В.В., Иванов М.В.,
Ивашечкин А.А., Чердакли А.А., Волков М.А.,
Шегурова А.Ф., Загайнова А.В., Белошевская О.А.,
Майтесян Л.В., Тарасова И.В., Ткачева О.Н.,
Стражеско И.Д., Кескинов А.А., Юдин В.С., Макаров В.В.,
Юдин С.М., Каштанова Д.А.*

**Фенотипы старения и их связь с особенностями
микробиома у пожилых людей:
анализ существующих различий
и функциональных профилей 43**

Масулис И.С.

**Реконструкция трехмерной структуры хроматина:
современные подходы и значение для понимания
регуляции генной экспрессии 46**



Фрэнсис Крик

No. 4356 April 25, 1953



Джеймс Уотсон

NATURE

737

equipment, and to Dr. G. E. R. Deacon and the captain and officers of R.R.S. *Discovery II* for their part in making the observations.

¹Young, F. B., Gerrard, H., and Jevons, W., *Phil. Mag.*, **40**, 149 (1925).

²Longuet-Higgins, M. S., *Mon. Not. Roy. Astro. Soc., Geophys. Supp.*, **5**, 235 (1949).

³Von Arz, W. S., Woods Hole Papers in Phys. Oceanog. Meteor., **11** (3) (1950).

⁴Fikman, V. W., *Arkhiv. Mat. Astron. Fizik. (Stockholm)*, **2** (11) (1905).

MOLECULAR STRUCTURE OF NUCLEIC ACIDS

A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid

WE wish to suggest a structure for the salt of deoxyribose nucleic acid (D.N.A.). This structure has novel features which are of considerable biological interest.

is a residue on each chain every 3.4 Å. in the z-direction. We have assumed an angle of 36° between adjacent residues in the same chain, so that the structure repeats after 10 residues on each chain, that is, after 34 Å. The distance of a phosphorus atom from the fibre axis is 10 Å. As the phosphates are on the outside, cations have easy access to them.

The structure is an open one, and its water content is rather high. At lower water contents we would expect the bases to tilt so that the structure would become more compact.

The novel feature of the structure is the manner in which the two chains are held together by the purine and pyrimidine bases. The planes of the bases are perpendicular to the fibre axis. They are joined together in pairs, a single base from one chain being hydrogen-bonded to a single base from the other chain, so that the two lie side by side with identical z-co-ordinates. One of the pair must be a purine and the other a pyrimidine for bonding to occur. The hydrogen bonds are made as follows: purine position

25 апреля в Институте Теоретической и Экспериментальной Биофизики РАН традиционно отмечается День ДНК. Эта дата считается днем рождения молекулярной биологии, поскольку именно в этот день в 1953 году в журнале Nature вышла статья Джеймса Уотсона и Фрэнсиса Крика [*Watson J.D., Crick F.H.C. Molecular structure of nucleic acids // Nature. 1953. V. 171. P. 738-740*], посвященная строению молекулы ДНК, за которую в 1962 году была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине.

Очевидно, что открытие пространственной структуры ДНК совершило революцию в мире науки и повлекло за собой целый ряд новых открытий, без которых нельзя представить не только современную науку, но и современную жизнь в целом.

ОТЕЧЕСТВЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДНК

*Алексеева А.Я.¹, Квон Д.А.¹, Веретенников А.В.²,
Жевора С.В.¹, Воробьев А.А.³, Курочкин В.Е.⁴,
Пушкин А.А.^{1,4}, Алексеев Я.И.^{1,4,5}*

¹ ООО «НПФ Синтол», Москва, Россия;

² АО «ЭЗАН», Черноголовка, Россия;

³ Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Киров, Россия;

⁴ Институт аналитического приборостроения Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия;

⁵ Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского Российской академии наук, Севастополь, Россия.

e-mail: jalex@syntol.ru

Отечественный рынок геномных исследований увеличивается на 10% ежегодно. Основными драйверами его развития являются персонализированная медицина наследственных и онкологических заболеваний, геномные технологии в животноводстве и растениеводстве, ДНК-идентификация личности. Технологии анализа геномов, несомненно, относятся к критическим и обеспечивающим биологическую безопасность и технологическую независимость Российской Федерации.

Имеющийся у консорциума Российские генетические технологии, представленного Институтом аналитического приборостроения РАН, Акционерным обществом «ЭЗАН» и ООО «НПФ Синтол» опыт успешной разработки и внедрения технологий секвенирования ДНК первого и второго поколений (выпущено на данный момент более 400 классических секвенаторов Нанофор 05 и 20 секвенаторов для массового па-

раллельного секвенирования Нанофор СПС) однозначно свидетельствует о необходимости дальнейшей поддержки разработок со стороны государства в виде государственного заказа на закупку отечественных секвенаторов ДНК. Государство, совместно с ведущими научно-производственными компаниями должно способствовать выводу на рынок каждые 2-3 года новых серийно производимых моделей отечественных секвенаторов, поддержанных отечественным программным обеспечением, расходными материалами и реагентами. Необходимо наращивать производительность разрабатываемых секвенаторов ДНК, что приведет к кратному снижению стоимости расшифровки полных геномов. Стартовавший в январе 2026 года Национальный проект “Технологическое обеспечение биоэкономики”, направленный на создание в России инфраструктуры для использования биологического сырья и на разработку уникальных технологий, востребованных в сельском хозяйстве, экологии и при создании лекарственных препаратов, даст очередной импульс развитию отечественных геномных технологий.

Для того, чтобы процесс разработок и внедрения шел интенсивно и эффективно, необходима планомерная поддержка государства в противостоянии с экспансией приборов из Китая, а также более активная поддержка экспорта отечественных генетических технологий в дружественные страны, такие как страны БРИКС, СНГ и ЕврАзЭС. Необходимо также наращивать стимулирование рынка за счет ранее доказавших свою эффективность инструментов поддержки, таких как программа по обновлению приборной базы научных организаций. К сожалению, прекращение Министерством науки и высшего образования финансирования Российской Федерации этой программы серьезно ударит как по эффективности отечественной науки в целом, так и серьезно затормозит темпы развития отечественного научного приборостроения.

ПРОТОТРОПНАЯ ТАУТОМЕРИЯ АДЕНИНА

Глушенков А.Н.¹, Комаров В.М.², Гриневич А.А.²

¹ Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия;

² Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия.
e-mail: an.glushenkov@yandex.ru

Аденин – это одно из нуклеиновых оснований молекул ДНК и РНК, способное к образованию неканонических пар оснований как с самим собой, так и с другими типами оснований [1, 2]. Третичная структура РНК богата (19.9%) на неканонические Т-образные пары оснований [1], большую долю которых (62.8%, 95%-ДИ: 59.6-65.8%) занимают соединения аденина. Среди гетероассоциатов аденина самым частым является G-A (13.6%, 95%-ДИ: 11.5-15.9%). Известно, что в результате механизма одиночного протонного переноса (SPT) аденин способен находиться в цвиттерионной форме, которая, хотя и не считается вносящей вклад в механизм образования точечных мутаций из-за короткого времени жизни, всё же может составлять порядка 0,06% человеческого генома [3]. Будучи производной ксантина, наличие цвиттерионной формы у аденина является ожидаемой. Однако остаётся открытым вопрос о возможности аденина принимать форму отличную от основной в условиях отсутствия внешнего воздействия аналогично гуанину [4]. Ответ сможет стать необходимым шагом к получению конформационной ёмкости ранее не изученной пары оснований гуанин-аденин, образующейся и в синтетических ДНК [2].

Целью работы является получение полного молекулярно-цвиттерионного семейства прототропных таутомеров $m^9\text{Ade}$,

метилированных по гликозидной связи, в вакууме, воде, активной зоне белка ($\epsilon = 4$) и диметилсульфоксиде. Такой подход позволяет использовать группу 9-Me как химическую заглушку, имитирующую сахарофосфатный остов, при постановке эксперимента [5]. Исходные структурные гипотезы были сформированы перемещением протонов по одному и по два с позиций 2, 6, 8 на позиции 1, 3, 7. По итогу было сформировано 28 структур. Оптимизация геометрии проводилась с помощью гибридного потенциала wB97X-D4REV [6] для базиса aug-cc-pVTZ, учитывающего поляризационные и диффузионные функции. Устойчивость структур была проверена по отсутствию мнимых частот в спектре фононных колебаний. Энергия электронного взаимодействия была получена на уровне теории MP2 в приближении DLPNO-MP2-F12/cc-pVDZ-F12-CABS [7, 8] для случаев в вакууме и без него для других сред (использованный базис aug-cc-pVTZ). Свободная энергия Гиббса была вычислена как сумма энергий электронного взаимодействия с термической поправкой Гиббса для стандартных условий. Все расчёты проводились в Orca 6.1.1 [9].

Результаты и обсуждение

Полученное семейство таутомеров аденина состоит из 7 молекулярных и 21 цвиттерионных таутомеров. Большая доля (75%) цвиттерионнов по отношению к гуанину (54,8%) объясняется наличием C2H-группы, которая становится дополнительным источником протона по сравнению с гуанином, у которого образование цвиттериона возможно только перемещением протона с позиции 8.

Цвиттерион, зафиксированный в работе [3], соответствует таутомеру A11 в водной среде (A13 в вакууме, A12 в активной зоне белка), который при этом не является наиболее энергетически выгодным цвиттерионном в таутомерном ряду аденина

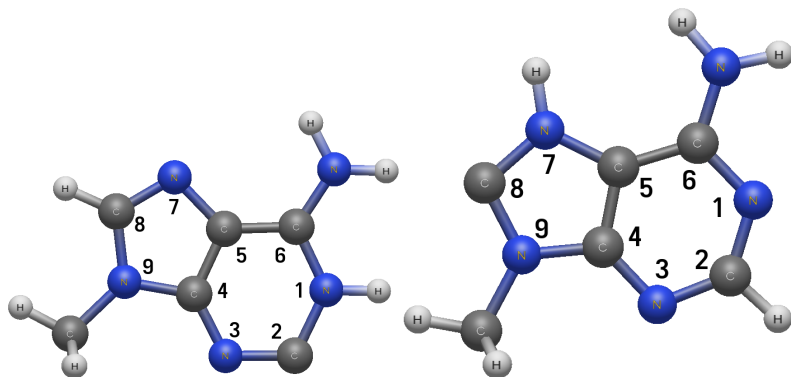


Рис. 1: Некоторые цвиттерионы аденина в воде: слева – A11 ($\Delta G = 43,1$ ккал/моль), справа – A8 ($\Delta G = 29,39$ ккал/моль).

(A6 в вакууме и A8 во всех остальных средах). Наличие практически нулевой заселённости во всех рассмотренных средах у любых форм аденина кроме основной A1 позволяет предположить, что в подавляющем большинстве случаев именно она участвует в процессах формирования третичной структуры РНК и самосборки дуплексов синтетических ДНК. Таким образом, пары неканонических структур G-A должны быть сформированы из комбинаций A1-G1, A1-G2, A1-G3, дающих при использовании алгоритма [10] 1643 потенциальные комбинации. Конформационная ёмкость этих пар является предметом нашей следующей работы.

Дополнительно стоит отметить, что полученные результаты хорошо согласуются с накопленными фактами фиксирования повышенных частот точечных мутаций в GC по сравнению с AT [11]. Мутации вида GC \rightarrow AT в геномах про- и эукариот, как правило, встречаются в два раза чаще мутаций вида AT \rightarrow GC [12, 13]. Аналогичная картина наблюдается и при сравнении протяжённых GC треков с AT треками ДНК [14]. Все эти факты, в совокупности с высокими значениями заселённости гуанина в воде [4], дают дополнительные осно-

вания полагать, что гуанин действительно является наиболее вероятной стартовой точкой образования точечных мутаций.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Ali Z. et al.* Occurrence and classification of T-shaped interactions between nucleobases in RNA structures // RNA. 2023, №29, 8, с. 1215-1229.
- [2] *Nikitin M.P.* Non-complementary strand commutation as a fundamental alternative for information processing by DNA and gene regulation // Nat. Chem. 2023, №15, с. 70-82.
- [3] *Gheorghiu A., Coveney P.V., Arabi A.A.* The influence of base pair tautomerism on single point mutations in aqueous DNA // Interface focus. 2020, №10, 6, с. 20190120.
- [4] *Глушенков А.Н., Говорун Д.Н.* Прототропная таутомерия 9-метилгуанина: квантово-механическое исследование // Доп. НАН України. 2014, №9, с. 151-156.
- [5] *Sukhodub L.F.* Interactions and hydration of nucleic acid bases in a vacuum. Experimental study // Chem Rev. 1987, №87(3), pp. 589-606.
- [6] *Mueller M., Hansen A., Grimme S.* wB97X-3c: A composite range-separated hybrid DFT method with a molecule-optimized polarized valence double-zeta basis set // J. Chem. Phys. 2023, №158, pp. 014103. doi.org/10.1063/5.0133026
- [7] *Semidalas E., Martin J.M.L.* Automatic generation of complementary auxiliary basis sets for explicitly correlated methods // J. Comput. Chem. 2022, №43 (25), с.16901700.
- [8] *Pavosevic F. et al.* SparseMaps – A systematic infrastructure for reduced-scaling electronic structure methods. IV. Linear-scaling second-order explicitly correlated energy with pair natural orbitals // J. Chem. Phys. 2016, с. 144.
- [9] *Neese F.* Software update: the ORCA program system, version 6.0 // WIRES Comput. Molec. Sci. 2025, №15(1), e70019. doi.org/10.1002/wcms.7019

- [10] *Глушенков А.Н., Говорун Д.Н.* Геометрическое построение всех возможных ассоциированных водородными связями пар нуклеотидных оснований // Доп. НАН України. 2014, №8, с. 133-137.
- [11] *Pushkaran A.C., Arabi A.A.* A review on point mutations via proton transfer in DNA base pairs in the absence and presence of electric fields // Int J Biol Macromol. 2024, №277(2), с. 134051.
- [12] *Lynch M.* Rate, molecular spectrum, and consequences of human mutation // PNAS. 2010, №107(3), pp. 961-968.
- [13] *Hernandez R.D. et al.* Context-dependent mutation rates may cause spurious signatures of a fixation bias favoring higher GC-content in humans // Mol. Biol. and Evol. 2007, №24(10), pp. 2196-2202.
- [14] *Bashir T. et al.* Hybridization alters spontaneous mutation rates in a parent-of-origin-dependent fashion in Arabidopsis // Plant Physiol. 2014, 165(1), pp. 424-37.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ В СОСТАВЕ ПРОБИОТИКОВ С ПОМОЩЬЮ НАНОПОРОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

*Жданова Е.С.¹, Ермаков А.М.¹, Ермакова Е.А.,
Козина Д.Д.¹, Менухов В.О.¹*

¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики
РАН, Пущино, Россия.

e-mail: beoluchi@yandex.ru

Пробиотические препараты широко используются как источник живых микроорганизмов, потенциально способных оказывать благоприятное влияние на состояние хозяина. Однако практическая и клиническая значимость таких продуктов напрямую связана с тем, насколько их фактический микробный состав соответствует заявленному на упаковке. Для пробиотиков это особенно важно, поскольку их предполагаемые эффекты обычно связывают с конкретными видами, а в ряде случаев и со штаммами микроорганизмов [1].

Проблема корректности маркировки пробиотических продуктов остаётся актуальной. В литературе описаны случаи отсутствия заявленных таксонов, обнаружения незаявленных микроорганизмов, а также использования некорректной или устаревшей номенклатуры [2–5]. Такие расхождения затрудняют оценку качества продукции и ограничивают корректную интерпретацию данных о её эффективности и безопасности.

Для анализа состава пробиотиков всё шире применяются методы секвенирования нового поколения, включая подходы, основанные на исследовании гена 16S рРНК [3,6]. Вместе с тем получаемый таксономический профиль определяется не только реальным составом образца, но и особенностями методики. Существенное влияние на результат оказывают выбор

секвенирующей платформы, длина прочтений, амплифицируемый участок 16S рРНК, используемая пара праймеров, а также алгоритмы биоинформатической обработки и используемые референсные базы данных [6–9]. Показано, что частичное секвенирование отдельных переменных регионов 16S рРНК обладает меньшим таксономическим разрешением по сравнению с анализом полноразмерного гена, особенно при разграничении близкородственных бактерий [6]. Несмотря на активное развитие технологий длинных прочтений, число работ, посвящённых их применению для анализа коммерческих пробиотических препаратов, остаётся ограниченным [10]. В связи с этим представляет интерес сопоставление различных вариантов нанопорового анализа, включая ампликонное секвенирование с разными праймерными системами и метагеномный подход, поскольку выбор праймеров, алгоритма классификации и референсной базы способен влиять на итоговый детектируемый таксономический профиль [7,8,11,12].

Тем не менее, несмотря на активное развитие технологий длинных прочтений, сведения об их применении для анализа пробиотических продуктов остаются ограниченными.

В настоящем исследовании был проведён сравнительный анализ состава пяти пробиотических препаратов с использованием нанопорового секвенирования. Сопоставлялись результаты ампликонного секвенирования 16S рРНК, выполненного с применением двух наборов праймеров, а также данные метагеномного секвенирования, полученные на платформе MinION. Такой дизайн позволил оценить применимость нанопорового секвенирования для анализа пробиотиков и влияние этапов пробоподготовки, амплификации и биоинформатической обработки на конечный таксономический профиль [7,8,10–12].

Сравнительный анализ показал, что лишь в одном случае для одного из исследованных образцов полученный так-

сономический профиль качественно полностью совпадал с заявленным составом пробиотического препарата, хотя даже в этом случае не наблюдалось соответствия заявленным количествам копий. В остальных образцах были выявлены расхождения между ожидаемым и установленным составом. Между применёнными методами также отмечались различия по чувствительности и спектру детектируемых таксонов.

Наиболее полную картину состава обеспечило метагеномное секвенирование: в среднем данным методом удавалось идентифицировать $10,6 \pm 2,88$ видов на образец. При амплификационном секвенировании число выявляемых таксонов было ниже: при использовании универсальных праймеров в среднем определялось $6,6 \pm 2,2$ видов, а при использовании праймеров с расширенным таксономическим охватом — $6,8 \pm 2,6$ видов. При близком уровне выявляемого разнообразия наблюдались различия в таксономическом охвате, что согласуется с данными о влиянии праймерного дизайна и аналитического пайплайна на результаты микробиомного профилирования [7,8,11,12].

Полученные данные показали, что оценка состава пробиотических препаратов существенно зависит от выбранного аналитического подхода. Даже при анализе одного и того же образца относительное содержание отдельных таксонов может заметно различаться в зависимости от типа секвенирования и используемого инструмента таксономической классификации, что необходимо учитывать при интерпретации результатов [8,10,13].

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Hill C., Guarner F., Reid G., et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic // Nat. Rev. Gastroenterol Hepatol. 2014, 11(8), pp. 506–514.

- [2] *Huys G., Vancanneyt M., D’Haene K., et al.* Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use // *Res. Microbiol.* 2006, 157(9), pp. 803–810.
- [3] *Patro J.N., Ramachandran P., Barnaba T., Mammel M.K.* Culture-independent metagenomic surveillance of commercially available probiotics with high-throughput next-generation sequencing // *mSphere.* 2016, 1(2), e00057-16.
- [4] *Yeung P.S.M., Sanders M.E., Kitts C.L., Cano R., Tong P.S.* Species-specific identification of commercial probiotic strains // *J. Dairy Sci.* 2002, 85(5), pp. 1039–1051.
- [5] *Kim E., Won S., Hamidoghli A., et al.* Validation of probiotic species or subspecies identity in commercial probiotic products using targeted multiplex PCR // *Food Res Int.* 2022, 154, 110984.
- [6] *Johnson J.S., Spakowicz D.J., Hong B.Y., et al.* Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species- and strain-level microbiome analysis // *Nat. Commun.* 2019, 10, 5029.
- [7] *Regueira-Iglesias A., Balsa-Castro C., Cadarso-Suárez C., et al.* Critical review of 16S rRNA gene sequencing workflow in microbiome studies: From primer selection to advanced data analysis // *Mol Oral Microbiol.* 2023, 38(5), pp. 347–399.
- [8] *Siegwald L., Caboche S., Even G., et al.* Assessment of common and emerging bioinformatics pipelines for targeted metagenomics // *PLoS One.* 2017, 12(1), e0169563.
- [9] *Barnes C.J., van der Gast C.J., McNamara N.P., et al.* Comparing DADA2 and OTU clustering approaches in microbial community analysis // *Peer J.* 2020, 8, e9255.
- [10] *Kruasawan W., Thammasart S., Sangsritavong S., et al.* Nanopore sequencing discloses compositional quality of commercial probiotic feed supplements // *Sci. Rep.* 2023, 13, 4711.
- [11] *Abellan-Schneyder I., Matchado M.S., Reitmeier S., et al.* Primer, pipelines, parameters: Issues in 16S rRNA gene sequencing // *mSphere.* 2021, 6(1), e01202-20.

- [12] *Waechter C., Fehse L., Welzel E., et al.* Comparative analysis of full-length 16S ribosomal RNA genome sequencing in human fecal samples using primer sets with different degrees of degeneracy // *Front Genet.* 2023, 14, 1213829.
- [13] *Ge B., McDonald R.C., Yang Q., et al.* Exploring animal food microbiomes and resistomes via 16S rRNA gene amplicon sequencing and shotgun metagenomics // *Appl. Environ. Microbiol.* 2025, 91(2), e02230-24.

НАНОПОРОВОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ДНК БЕЗ ДНК. ROCHE ПРЕДСТАВЛЯЕТ SEQUENCING-BY-EXPANSION

Клещенко Е.В.

PCR.news.

e-mail: klesch990@gmail.com

Компания Roche в феврале 2025 года объявила, что запуск ее платформы нанопорового секвенирования Sequencing-by-Expansion (SBX) состоится в 2026 году. Работа над этой технологией продолжалась более десяти лет.

В 2014 году, Roche инвестировала 5 млн долларов в компанию Stratos Genomics из Сиэтла для разработки химии SBX, и затем еще 10 млн долларов, когда Stratos достигла “определенных технических вех”. В том же 2014 году Roche приобрела компанию Genia за 350 млн долларов; ее полупроводниковый чип наряду с химией SBX лег в основу новой платформы. Roche заявила о приобретении Stratos в мае 2020 года. Химию SBX создали соучредители Stratos Марк Кокорис и Роберт Макруэр.

Технология SBX достаточно необычна. Этапу нанопорового секвенирования в ней предшествует этап синтеза: на матрице ДНК-мишени строится молекула, которая уже не является ДНК и примерно в 50 раз длиннее матрицы. Разработчики назвали эту молекулу Xpandomer (икспандомер, Xp).

В ходе “классического” нанопорового секвенирования молекула ДНК или РНК проходит через пору в мембране, разделяющую два резервуара с раствором, — из резервуара с отрицательным потенциалом в резервуар с положительным. При этом можно зарегистрировать изменения тока, так как

нуклеотиды блокируют перемещение ионов через пору. Анализ изменений позволяет восстановить последовательность нуклеотидов. Однако различия в геометрии нуклеотидов не очень велики, поэтому точность секвенирования с самого начала была слабым местом нанопора.

Эту проблему решает синтез Хр. Высокоинженерная ДНК-полимераза (Хр-синтаза) строит комплементарную матрицу нить не из обычных нуклеотидов, а из X-NTPs. Каждый из этих мономеров похож на нуклеотидтрифосфат, к которому прикреплена в двух точках (к первой фосфатной группе и азотистому основанию) сложенная в виде шпильки полимерная молекула. К каждому из четырех нуклеотидов присоединяется свой полимерный участок с характерным строением. На верхушке шпильки находится объемная боковая группа — разветвленная структура, которая называется “элемент контроля трансляции” (ТСЕ).

В итоге на матрице синтезируется молекула, имеющая вид “ламповой щетки” — с боковыми петлями полимеров на каждом нуклеотиде. Это и есть Xrandomer. В каждом нуклеотиде X-NTP атом кислорода между остатком дезоксирибозы и первой фосфатной группой заменен на NH-группу, так что связь между азотом и фосфором может быть расщеплена кислотой. Когда циклы размыкаются, образуется линейная полимерная последовательность, в которой чередуются полимерные фрагменты четырех типов, в соответствии с последовательностью нуклеотидов ДНК-матрицы.

При прохождении молекулы Хр нужно направить в пору на мембране, и при этом в полной мере выявляется преимущество новой технологии. Полимерные участки, из которых состоит Xrandomer (авторы назвали их Symmetrically Synthesized Reporter Tethers, или SSRT), отличаются “толщиной” за счет различного количества боковых групп, поэтому перепады тока в нанопоре различаются четко и легко интер-

претируются. Кроме того, TCE — разветвленная группа в каждом SSRT — настолько велика, что задерживает молекулу в поре на время, достаточное, чтобы зафиксировать изменения тока. Группы TCE последовательно “протаскивают” через пору регулярными короткими импульсами повышенного напряжения на электродах. Все это делает процесс высококонтролируемым и облегчает интерпретацию измерений ионного тока.

Для сборки X-NTP и других молекул сложного строения, необходимых для синтеза Xp, были использованы подходы клик-химии. Синтез происходит на специально разработанных чипах. Фермент Xp-синтаза был получен из ДНК-полимеразы Dpo4 термофильной археи *Sulfolobus solfataricus*, которая изначально могла работать с объемными структурами вместо обычных тринуклеотидов.

Приборы для SBX-секвенирования поддерживают два режима: симплексный, с высокой пропускной способностью, и дуплексный, с повышенной точностью (качество полногеномного секвенирования до Q39). Подготовка дуплексной библиотеки требует 20–50 нг нефрагментированной геномной ДНК или 2,5–10 нг бесклеточной ДНК. Длины ридов составляют 150–350 пар оснований для дуплексного секвенирования и от 200 до более 1000 — для симплексного секвенирования.

На вебинаре, который Roche провела в феврале 2025 года, Марк Кокорис подчеркнул, что рабочий процесс SBX совместим с автоматизацией, и пользователи могут преобразовать для этой технологии свои библиотеки Illumina. Не так давно было объявлено, что цена прибора составляет 750 тысяч долларов.

В конце 2025 года Roche объявила, что ее метод попал в Книгу рекордов Гиннеса. Сотрудники Детской больницы Бостона, Broad Clinical Labs и Roche Sequencing Solutions опубликовали в *NEJM* сообщение о рекордно быстром, менее чем

за день, прочтении геномов человека (с такой скоростью было прочитано семь геномов новорожденных в отделении интенсивной терапии).

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Mark Kokoris, Robert McRuer, et al.* Sequencing by Expansion (SBX) — a novel, high-throughput single-molecule sequencing technology // BioRxiv. 2025. DOI: 10.1101/2025.02.19.639056
- [2] Introducing sequencing by expansion (SBX): a versatile, high-throughput single-molecule sequencing technology // <https://sequencing.roche.com/us/en/videos/webinar-sequencing-by-expansion-technology.html>
- [3] *Monica H. Wojcik, et al.* Toward Same-Day Genome Sequencing in the Critical Care Setting // New England Journal of Medicine. 2025, 393, 20, pp. 2063–2065. DOI: 10.1056/NEJMc2512825

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАНОПОРОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ АНАЛИЗА НАТИВНОЙ МИКРОБИОТЫ ПИТЬЕВОГО ПАСТЕРИЗОВАННОГО МОЛОКА

Малыхина Е.А.^{1,2}, Кольжецов Н.П.², Фролова М.С.², Шавкунов К.С.², Озолинъ О.Н.²

¹ Биотехнологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия.

² Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Пушкино, Россия.

e-mail: elisavetamalyhina@yandex.ru

Молоко представляет собой не только ценный пищевой продукт, но и сложную микробную экосистему, компоненты которой могут существенно влиять на качество, безопасность и вкусовые свойства молочной продукции. Пастеризация обеспечивает санитарную безопасность, однако и после нее в продукте могут оставаться микроорганизмы и споры, присутствие и рост которых способны оказывать непредсказуемое действие на заквасочные культуры и эффективность ферментации. В связи с этим, анализ микробиома пастеризованного молока является этапом для решения прикладной задачи по обеспечению стабильности технологического процесса для получения кисломолочной продукции высокого качества.

Материалом для исследования послужило пастеризованное питьевое молоко от российских и белорусских производителей. Исследование проводили на трех группах образцов: свежее молоко, отобранное непосредственно после вскрытия упаковки; молоко после инкубации при 40°C в течение

ние 16 часов; а также молоко, в которое перед инкубацией внесли лабораторный штамм *Streptococcus thermophilus* для оценки его роста под влиянием исходного микробного сообщества. Тотальную ДНК из образцов выделяли, используя комбинированный метод, включающий лизис (EDTA, 10% SDS, СТАВ/NaCl, протеиназа К), а также очистку и концентрацию с использованием набора EasyPure® Stool Genomic DNA Kit (Transgen Biotech, КНР). Секвенирование выполняли на платформе PromethION 2 Solo (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания) с предварительной подготовкой библиотек с использованием Native Barcoding Kit 96 V14 (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). Таксономическую классификацию проводили с использованием пайплайна wf-metagenomics (алгоритм Kraken2, база данных Standard-8) в среде EPI2ME Agent v. 5.2.5. Статистическую обработку данных и визуализацию проводили в среде RStudio v.2026.01.0 + 392 (язык программирования R v. 4.5.2 2025-10-31).

Полученную таблицу разнообразия отфильтровали по частоте встречаемости таксонов в образцах ($\geq 30\%$) и медианному содержанию ($\geq 0,05\%$), после чего трансформировали в CLR. В качестве метода снижения размерности и выявления группировки образцов использовали UMAP. Для более строгого выделения кластеров и оценки их устойчивости был применён алгоритм PAM с последующей валидацией с помощью расчета силуэт-значений. Снижение размерности позволило получить 3 группы образцов, что подтверждается методами кластеризации. В первый кластер вошли преимущественно пробы свежего молока, тогда как два других кластера сформировали все инкубированные образцы независимо от наличия в них *S. thermophilus*. Анализ тепловых карт CLR трансформированных значений представленности таксонов позволил получить микробиологические профили вы-

деленных групп образцов. Кластер, содержащий преимущественно свежие образцы, как и ожидается, обладает достаточно большим разнообразием представленных таксонов. При этом один из гибридных кластеров отличается низким микробиологическим разнообразием со значительным доминированием родов *Streptococcus* и *Bacillus*. В данном кластере также можно выделить две подгруппы, в каждой из которых больше доминирует один из двух упомянутых родов. В подкластере с доминированием *Bacillus* в ряде образцов наблюдается также обогащение родственными родами — *Brevibacillus* и *Paenibacillus*. Второй гибридный кластер наполнен образцами с высоким содержанием микроорганизмов, принадлежащих родам *Streptococcus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Pseudomonas* и др. Наличие многих микроорганизмов из названного списка может вызывать опасение, хотя при этом их содержание в большинстве образцов находится значительно ниже среднего уровня и является скорее следовым. На основании полученных результатов можно сделать вывод, что применяемые методы анализа способны выявлять сырье с потенциально опасной микрофлорой, даже если в исходных образцах не выявляются заметные отличия. Такое разделение, не зависящее от присутствия закваски *S. thermophilus*, указывает на то, что исходная микробиота и/или состав молока играют ключевую роль в развитии патогенов при нарушении температурного режима.

Работа выполнена в рамках тематики госзадания ФИЦ ПНЦБИ РАН “Разработка геном-ориентированных технологий и методов метаболической инженерии для создания высокопроизводительных бактериальных продуцентов и поливидовых консорциумов для биотехнологии, агропромышленного комплекса и пищевой промышленности” (№ 1025013100015-5).

НАНОПОРОВОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ: ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА

*Петров А.А.¹, Ермаков А.М.^{2,3}, Белозеров Д.П.¹,
Кутаев Д.А.¹, Борисевич С.В.¹*

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«48 Центральный научно-исследовательский институт»
Министерства обороны Российской Федерации, г. Сергиев
Посад-6, Россия;

e-mail: 48cnii@mil.ru

² ООО «Нанопорус», г. Серпухов, Россия;

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт теоретической и экспериментальной биофизики»
Российской академии наук, г. Пущино, Россия.

e-mail: beoluchi@yandex.ru

Современный этап развития молекулярной биологии и геномных технологий характеризуется активным внедрением методов высокопроизводительного секвенирования нуклеиновых кислот. Использование данных технологий позволяет получать детальную генетическую информацию о структуре геномов различных организмов, анализировать генетическое разнообразие микроорганизмов и выявлять патогенные агенты. Развитие технологий секвенирования нового поколения существенно расширило возможности фундаментальных и прикладных исследований в области геномики, микробиологии и биомедицины, а также способствовало совершенствованию методов эпидемиологического мониторинга и обеспечения биологической безопасности [1].

Переход от традиционных методов анализа генетической информации к технологиям секвенирования нового поколения привёл к значительному увеличению производительности геномных исследований и снижению стоимости анализа

нуклеиновых кислот. В последние годы особое внимание уделяется технологиям секвенирования третьего поколения, которые обеспечивают возможность прямого анализа длинных молекул ДНК и РНК без необходимости предварительной амплификации [2,3].

Одним из наиболее перспективных направлений развития современных геномных технологий является нанопоровое секвенирование. Принцип работы нанопоровых секвенаторов основан на регистрации изменений электрического тока, возникающих при прохождении молекулы нуклеиновой кислоты через нанопору, встроенную в биологическую мембрану. Анализ параметров электрического сигнала позволяет определять последовательность нуклеотидов в исследуемых молекулах ДНК [2].

Существенным преимуществом нанопоровых технологий является возможность получения длинных прочтений (long reads), что значительно упрощает реконструкцию геномов и анализ структурных вариаций генетического материала. Использование методов длинного чтения позволяет эффективно исследовать сложные участки генома, содержащие повторяющиеся последовательности, а также повышает точность геномных сборок и анализа генетических перестроек [3]. Вместе с тем обработка данных длинного чтения требует применения специализированных биоинформатических методов, обеспечивающих корректный анализ больших массивов геномной информации [4].

Нанопоровое секвенирование активно применяется для анализа микробных сообществ и метагеномных образцов. Возможность получения длинных фрагментов ДНК и высокая глубина секвенирования позволяют более детально изучать структуру микробных популяций и выявлять генетические особенности микроорганизмов, включая наличие генов патогенности и устойчивости к антибиотикам [5].

Важной особенностью современных нанопоровых платформ является возможность создания компактных и портативных секвенаторов. Портативные устройства, такие как MinION, обладают небольшими размерами и позволяют осуществлять геномный анализ непосредственно в полевых условиях, а также проводить обработку данных в режиме реального времени. Это существенно расширяет возможности оперативного биологического мониторинга и ускоряет процесс идентификации микроорганизмов в исследуемых образцах [6].

В рамках настоящего исследования проведён сравнительный анализ возможностей отечественной экспериментальной платформы нанопорового секвенирования и зарубежной системы MinION. Экспериментальные исследования выполнялись с использованием референсного штамма *Escherichia coli* XL1-Blue. Методика исследования включала выделение геномной ДНК, подготовку библиотек для секвенирования, проведение процесса нанопорового секвенирования и последующую биоинформатическую обработку полученных данных.

Для анализа результатов секвенирования применялись современные алгоритмы сборки геномов и методы оценки качества полученных геномных последовательностей. Использование специализированных биоинформатических инструментов позволяет повысить точность реконструкции геномов и улучшить качество анализа генетических данных [4].

Полученные результаты демонстрируют перспективность применения технологий нанопорового секвенирования для решения задач молекулярной диагностики и биологического мониторинга. Использование портативных секвенаторов позволяет существенно сократить время от момента отбора биологических проб до получения результатов генетического анализа, что имеет важное значение при оперативном реагировании на биологические угрозы.

Таким образом, внедрение технологий нанопорового се-

квенирования в практику молекулярно-генетических исследований может способствовать повышению эффективности систем биологического мониторинга, а также расширению возможностей применения современных геномных методов в области диагностики, эпидемиологического контроля и обеспечения биологической безопасности [7].

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Wang Y., Zhao Y., Bollas A., Wang Y., Au K.F.* Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications // *Nature Biotechnology*. 2021, Vol. 39, No. 11, pp. 1348–1365.
- [2] *Pugh J.* The Current State of Nanopore Sequencing // *Methods in Molecular Biology*. 2023, Vol. 2632, pp. 3–14.
- [3] *Logsdon G.A., Vollger M.R., Eichler E.E.* Long-read human genome sequencing and its applications // *Nature Reviews Genetics*. 2020, Vol. 21, No. 10, pp. 597–614.
- [4] *Amarasinghe S.L., Su S., Dong X., Zappia L., Ritchie M.E., Gouil Q.* Opportunities and challenges in long-read sequencing data analysis // *Genome Biology*. 2020, Vol. 21, No. 1, p. 30.
- [5] *Nicholls S.M., Quick J.C., Tang S., Loman N.J.* Ultra-deep, long-read nanopore sequencing of mock microbial community standards // *GigaScience*. 2019, Vol. 8, No. 5.
- [6] *Jain M., Olsen H.E., Paten B., Akeson M.* The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community // *Genome Biology*. 2016, Vol. 17, p. 239.
- [7] *Goodwin S., McPherson J.D., McCombie W.R.* Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies // *Nature Reviews Genetics*. 2016, Vol. 17, No. 6, pp. 333–351.

ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДЛЯ АНАЛИЗА ЦИФРОВЫХ ИЗОБРАЖЕНИЙ ДНК КОМЕТ, НАХОДЯЩЕЕСЯ В СВОБОДНОМ ДОСТУПЕ

Сирота Н.П.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Пушино, Россия

e-mail: sirota@iteb.ru

При оценке ДНК-повреждающих эффектов разнообразных физико-химических факторов на уровне генома индивидуальных клеток млекопитающих применяется метод Comet assay (метод ДНК-комет). Метод впервые был описан Ostling and Johanson in 1984 [1], под названием SCGE (гель электрофорез индивидуальных клеток). Позднее (1988) была предложена щелочная версия Singh et al. [2]. После чего началось интенсивное тестирование описанного протокола на лимфоцитах животных подвергнутых воздействию ионизирующего излучения. Первоначально, регистрация изображений ДНК-комет, наблюдаемых во флуоресцентном микроскопе, проводилась путем фотографирования. На распечатанных фотографиях проводили измерения с помощью линейки. Затем применили измерение сигнала (интенсивности флуоресценции) с помощью ФЭУ с записью сигнала на самописце, (лаб. В.Н.Карнаухова ИБФ АН СССР), а далее снова линейка, т.е. ручная работа. И только с появлением в ИБФ АН СССР вычислительной техники ПК “Правец” Ильясов Фуат Энмарович сделал программный продукт для записи сигнала с ФЭУ через АЦП на дискету ПК.

В результате мы получили массив цифровых данных, который можно было анализировать с помощью методов статистики и строить графическое представление результатов.

Следующим этапом в становлении метода было появление аппаратуры захвата наблюдаемых в флуоресцентном микроскопе изображений в цифровом формате.

Такая возможность стимулировала появление специализированного программного обеспечения (сПО), работающего с цифровыми микрофотографиями. В 2003 году польскими исследователями было выложено в Интернет в свободный доступ сПО для анализа цифровых изображений ДНК комет [3]. Дальнейшее развитие вычислительной техники с применением искусственного интеллекта привело к появлению очередного сПО [4].

Используя пакет цифровых изображений, опубликованный в работе [6] мы провели сравнительный анализ цифровых микрофотографий из этого набора доступным нам сПО. Результаты представлены на рис.1.

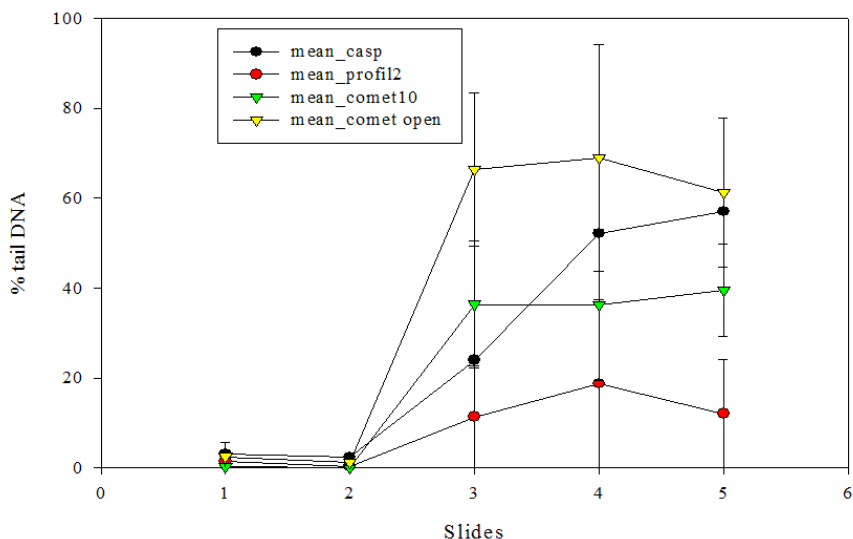


Рис. 1: Результаты оценки уровня поврежденности ДНК различными пакетами.

Из представленных данных видно, что в результатах, полученных при использованными пакетов от разных производителей, наблюдается существенные различия в средних значениях %TDNA

Согласно наших исследований, наиболее удобным для работы, является плагин OpenComet встроенный в пакет ImageJ [5].

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Ostling O., Johanson K.J.* Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells // *Biochem Biophys Res Commun* 1984, 123. pp. 291–8.
- [2] *Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells // *Exp. Cell Res.* 1988, 175, pp. 184–91.
- [3] *Końca K., Lankoff A., Banasik A., Lisowska H., Kuszewski T., Gózdź S., et al.* A crossplatform public domain PC image-analysis program for the comet assay // *Mutat Res/Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2003, 534(1–2), 15–20.
- [4] *Attila Beleon, Sara Pignatta.* Comet Analyser: A user-friendly, open-source deep-learning microscopy tool for quantitative comet assay analysis // *Computational and Structural Biotechnology Journal.* 2022, 20, 4122–4130.
- [5] *Gyori B.M., Venkatachalam G., Thiagarajan P.S., Hsu D., Clement M.V.* Open Comet: an automated tool for comet assay image analysis // *Redox Biol.* 2014, 2, 457–65.
- [6] *Mahsa Karbaschi et al.* Evaluation of the Major Steps in the Conventional Protocol for the Alkaline Comet Assay // *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 6072. doi:10.3390/ijms20236072.

БЕСКОНТАКТНАЯ АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ — ОКНО В НАНОМИР БИМОЛЕКУЛ

Чуев Г.Н., Мамедов Т.В., Аракелян А.Г.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Пушино, Россия

e-mail: genchuev@rambler.ru

Бесконтактная атомно-силовая микроскопия (АСМ) является перспективным методом исследования биомолекул. Особую роль для биосистем играют бесконтактный режимы работы АСМ, которые можно выполнять как в воздухе, так и в жидкости. В последнем случае возможно проводить исследования *in vitro*. Основным достоинством метода является то, что он способен обеспечить атомарное разрешение молекулярных деталей без повреждения образца. Изначально АСМ была разработана для определения упругих деформаций зонда при силовом контакте с образцом, только недавно исследования в динамическом режиме обрели популярность и стали массовыми.

Существует довольно большое число примеров успешного использования АСМ для исследования ДНК [1-4]. Это связано с двумя факторами. Во-первых, это простота нанесения ДНК на подложку, что обусловлено высокой адгезией ДНК к полярным подложкам. Во-вторых, большая длина ДНК и специфичность ее конформации позволяют легко отличить ДНК в процессе визуализации от любых других адсорбированных комплексов. В качестве примера приведем работу [1], в которой исследователи визуализировали ДНК и распределение заряда на ее поверхности. АСМ позволяет определить не только тип конформации ДНК, но и субнанометровые детали гидратации ее различных участков. Так, в [2] было обнаружено, что наиболее высокой плотностью гидратная оболочка

ДНК обладает вблизи желобков ДНК. Использование специального протокола экспериментов дает возможность визуализировать не только саму ДНК, но и образование комплексов ДНК-белок [3]. Помимо этого АСМ позволяет оценить отдельные молекулярные характеристики ДНК, например, среднюю плотность заряда. Масштаб, в котором работает бесконтактная АСМ, делает его идеальным инструментом для решения широкого спектра вопросов: от управления состоянием бимолекулы до разработки биочипов на основе ДНК [5]. Разработанная методика может стать фундаментом для создания новых подходов к анализу структуры ДНК, позволяющих получать количественную информацию о ее физико-химических свойствах в физиологических условиях с беспрецедентной точностью.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Kominami H., Kobayashi K., Yamada H.* // *Sci. Rep.* 2019, 9, 6851.
- [2] *Kuchuk K., Sivan U.* // *Nano Lett.* 2018, 18(4), 2733.
- [3] *Heenan P.R., Perkins T.T.* // *ACS Nano.* 2019, 13, 4220.
- [4] *Sotres J., Baró A.M.* // *Nano Lett.* 2018, 18, 2733.
- [5] *Мамедов Т., Шварц А., Федотова М.В., Чув Г.Н.* // *Биофизика.* 2024, т. 69, с. 723-736.

ВНЕДРЕНИЕ CAR-T-ТЕРАПИИ В КАЗАХСТАНЕ: СОЗДАНИЕ АКАДЕМИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА ЛЕНТИВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ И CAR-T-КЛЕТОК

Шустов А.В.

Национальный центр биотехнологии, Астана, Казахстан

e-mail: shustov@biocenter.kz

Введение

Терапия Т-клетками с химерным антигенным рецептором (CAR-T) стала революцией в онкогематологии, потому что демонстрирует эффективное лечение рецидивирующих/рефрактерных В-клеточных лейкозов и лимфом, а также множественной миеломы. Однако внедрение терапии CAR-T в развивающихся странах сталкивается с серьёзными барьерами: высокая стоимость зарегистрированных препаратов от ведущих мировых поставщиков (более 400 000 долларов США за инфузию), отсутствие локального производства всех компонентов, сложности с поставкой клинических лентивирусных векторов и недостаток обученного персонала. В Казахстане – стране с населением 20 миллионов человек – CAR-T-терапия до настоящего времени не была доступна. Ежегодно около 1300 пациентов диагностируются с лейкозами, лимфомами и множественной миеломой, причём примерно у 300 больных развивается рецидив или рефрактерность к стандартной терапии. Целью данной работы было создание первой в Центральной Азии академической платформы для производства CAR-T-клеток, включая локальный выпуск лентивирусных векторов и отработку автоматизированного GMP-совместимого процесса.

Материалы и методы

В работе использовали два вектора с рецептором CD19 CAR. Вектор V1 кодирует CAR с ко-стимулирующим доменом 4-1BB (аналог Kymriah, Novartis), вектор V2 - с доменом CD28 (аналог Yescarta, Kite/Gilead). Лентивирусный вектор V1 производили локально путём трансфекции HEK293FT клеток методом осаждения фосфатом кальция с последующей двух-этапной концентрацией (тангенциальная поточная фильтрация и ультрацентрифугирование). CAR-T-клетки изготавливали из криоконсервированных лейкоферезов с использованием автоматизированной системы CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec) по протоколу TCT 2.0. Анализ фенотипа проводили методом проточной цитометрии (маркёры CD3, CD4, CD8, CD45RA, CCR7). Функциональную активность оценивали по продукции цитокинов (IFN- γ , TNF- α , IL-2) и цитотоксической активности в отношении аутологических CD19+ B-клеток.

Результаты

Локальное производство лентивирусного вектора V1 обеспечило получение функциональных титров до концентрирования $1,5 \times 10^7 - 4,1 \times 10^7$ TU/мл, а после концентрирования - $1,5 \times 10^{10} - 1,5 \times 10^{10}$ TU/мл, что достаточно для клинического применения. Изготовлено 12 CAR-T-клеточных продуктов (по 6 на каждый вектор). Трансдукционная эффективность составила 39–57% для V1 и 32–51% для V2. Выход CAR+ клеток варьировал от $3,4 \times 10^8$ до $1,9 \times 10^9$ на продукт, что достаточно для лечения пациентов массой до 100 кг (стандартная доза 1×10^6 клеток/кг). Жизнеспособность конечных продуктов превышала 93%.

Иммунофенотипирование показало, что CAR+ клетки имели преимущественно центральный и эффекторный фенотип памяти (T_{cm}/T_{em}) с минимальным содержанием наив-

ных и терминально дифференцированных клеток. При этом в субпопуляции CD8+CAR+ выявлены статистически значимые различия в зависимости от вектора: V1 (4-1BB) обеспечивал более высокую долю Tcm (58,3% против 29,9%, $p < 0,01$), тогда как V2 (CD28) - более высокую долю Tem (69,4% против 41,5%, $p < 0,01$). В CD4+CAR+ субпопуляции различий не наблюдалось.

Функциональные тесты подтвердили антиген-специфическую активацию CAR-T-клеток: в кокультуре с CD19+ мишенями значительно возростала продукция IFN- γ , TNF- α и IL-2. При этом клетки, полученные с вектором V2, продуцировали достоверно больше этих цитокинов (IFN- γ : в 1,7 раза, $p = 0,015$; TNF- α : в 2,7 раза, $p = 0,002$; IL-2: в 4,4 раза, $p = 0,002$). Цитотоксическая активность была сопоставима между группами, хотя V2 демонстрировал тенденцию к более высокому лизису мишеней.

Обсуждение

Данное исследование демонстрирует успешное внедрение полного цикла производства CAR-T-клеток в Казахстане. Ключевым элементом для снижения затрат является само локальное производство в академическом формате, которое, по оценкам зарубежных публикаций, может снижать стоимость дозы на 60–80% по сравнению с коммерческими продуктами. Использование закрытой автоматизированной системы CliniMACS Prodigy позволяет осуществлять производство в условиях ISO 7 (класс C) с минимальными требованиями к помещениям производственной зоны, что критически важно для развивающихся стран. Полученные данные по эффективности трансдукции, жизнеспособности и выходу клеток сопоставимы с результатами ведущих академических центров Бразилии, Таиланда, Мексики, Испании и России. Выявленные различия в фенотипе CD8+ CAR+ клеток (преоблада-

ние Tcm для 4-1BB и Tem для CD28) соответствуют известным различиям между коммерческими продуктами Kymriah и Yescarta и могут иметь значение для выбора оптимального конструктора в зависимости от клинической задачи. Несмотря на различия в продукции цитокинов, цитотоксическая активность оказалась сопоставимой. Важным нерешённым вопросом остаётся отсутствие в Казахстане обученного клинического персонала по применению CAR-T-терапии, что требует организации стажировок в зарубежных центрах.

Заключение

Впервые в Казахстане и Центральной Азии создана академическая платформа для производства CAR-T-клеток, включающая локальный выпуск лентивирусных векторов и автоматизированное изготовление клеточных продуктов с использованием системы CliniMACS Prodigy. Полученные CAR-T-клетки обладают высокой жизнеспособностью, трансдукционной эффективностью и функциональной активностью. Эта работа создаёт основу для внедрения CAR-T-терапии в Казахстане в рамках правил госпитального исключения и может служить моделью для других развивающихся стран, стремящихся обеспечить доступ к современной клеточной иммунотерапии.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Maude S.L., Laetsch T.W., Buechner J., et al.* Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia // *N. Engl. J. Med.* 2018, 378(5), 439-448.
- [2] *Locke F.L., Miklos D.B., Jacobson C.A., et al.* Axicabtagene Ciloleucel as Second-Line Therapy for Large B-Cell Lymphoma // *N. Engl. J. Med.* 2022, 386(7), 640-654.

- [3] *Keyer V., Syzdykova L., Ingirbay B., et al.* Non-industrial production of therapeutic lentiviral vectors: How to provide vectors to academic CAR-T // *Biotechnol. Bioeng.* 2024, 121(11), 3252-3268.
- [4] *Mock U., Nickolay L., Philip B., et al.* Automated manufacturing of chimeric antigen receptor T cells for adoptive immunotherapy using CliniMACS prodigy // *Cytotherapy.* 2016, 18(8), 1002-1011.

ПРИМЕНЕНИЕ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ ЧАСОВ ДЛЯ УСТАНОВЛЕНИЯ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ МЕТИЛИРОВАНИЕМ ДНК, УСКОРЕННЫМ СТАРЕНИЕМ И ВОЗРАСТ-АССОЦИИРОВАННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

*Даниэль В.В.¹, Иванов М.В.¹, Мамчур А.А.¹,
Спектор Е.Д.¹, Зеленова Е.А.¹, Маткава Л.Р.¹,
Николаева Е.А.¹, Юдин В.С.¹, Кескинов А.А.¹,
Буханова А.А.¹, Гребнев П.А.¹, Стражеско И.Д.²,
Ткачева О.Н.², Скворцова В.И.³, Юдин С.М.¹,
Капитанова Д.А.¹*

- ¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение “Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью” Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ “ЦСП” ФМБА России), Москва, Россия;
- ² Обособленное структурное подразделение “Российский геронтологический научно-клинический центр” федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования “Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова” Министерства здравоохранения Российской Федерации (ОСП РГНКЦ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России), Москва, Россия;
- ³ Федеральное медико-биологическое агентство (ФМБА России), Москва, Россия;

Актуальность исследования

Демографическое старение диктует необходимость разработки инструментов, позволяющих прогнозировать возникновение возраст-ассоциированных заболеваний. Хронологический возраст не всегда точно отражает индивидуальную скорость старения, поэтому была принята концепция биологического возраста, определяемого совокупностью различных биомаркеров. Эпигенетические часы, учитывающие изменения метилирования ДНК с возрастом, считаются одним из наиболее перспективных инструментов для этого.

Цель

Разработать эпигенетические часы и провести комплексный анализ для определения комплекса факторов, ассоциированных с ускоренным старением.

Методы

В исследование включены 4 584 участника, для которых провели клинико-лабораторное обследование и анализ метилирования ДНК. Для построения модели часов отобраны CpG-сайты, значимо ассоциированные с возрастом; для них проведен функциональный анализ, и на их основе обучены 12 моделей для предсказания биологического возраста. С помощью наилучшей модели для каждого участника рассчитан биологический возраст. Участники разделены на группы с ускоренным, нормальным и замедленным старением; далее с помощью межгруппового сравнения и логистической регрессии проведен анализ факторов, ассоциированных с ускоренным старением.

Результаты

Функциональный анализ возраст-ассоциированных CpG-сайтов показал, что с возрастом происходит гиперметилюро-

вание промоторов генов, связанных с нейрональной сигнализацией, и гипометилирование промоторов генов иммунного ответа. Модель эпигенетических часов, основанная на алгоритме `extra_trees` и включающая 374 CpG-сайта, продемонстрировала высокую точность ($R^2 = 0,975$; MAE=2,52 года). У участников в возрасте до 25 лет ускоренное старение ассоциировано с повышенным употреблением алкоголя, нарушением барьерных функций кожи и слизистой желудка, а также с нарушениями в мышечной системе и фототрансдукции по данным функционального анализа. К 45 годам ускоренно стареющие участники имели более высокий ИМТ. Ранее выявленные изменения усугублялись; активировались пути, ответственные за воспаление, эндокринные и сердечно-сосудистые нарушения, а также переработка жиров. В возрасте до 60 лет ускоренно стареющие участники чаще страдали артериальной гипертензией; к нарушениям метилирования добавлялись изменения всасывания белков и воспалительные процессы, что находило отражение в лабораторных анализах. У участников 75 лет и старше усугублялись дисфункции сердечно-сосудистой и выделительной систем, нарушалась нейропластичность, а у самых пожилых наблюдалось глобальное гипометилирование, затрагивающее функциональные пути, ответственные за нейродегенерацию, воспаление и онкопроцессы.

Выводы

В исследовании разработаны высокоточные эпигенетические часы для расчета биологического возраста. Анализ работы этих часов на исследуемой выборке, обогащенный анамнестическими, клинико-лабораторными данными и функциональным анализом, показал, что старение – это не единый процесс, а последовательная смена доминирующих механизмов: от поведенческих к метаболическим, от метаболических

– к дисфункции органов, и в конечном итоге – к функциональному дефициту. Полученные результаты демонстрируют необходимость учета специфичных для каждого возрастного периода факторов при разработке персонализированных профилактических и диагностических подходов, а также при применении геропротективных вмешательств.

ФЕНОТИПЫ СТАРЕНИЯ И ИХ СВЯЗЬ С ОСОБЕННОСТЯМИ МИКРОБИОМА У ПОЖИЛЫХ ЛЮДЕЙ:

АНАЛИЗ СУЩЕСТВУЮЩИХ РАЗЛИЧИЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОФИЛЕЙ

*Игнатъева О.А.¹, Мамчур А.А.¹, Побережный Д.Ю.¹,
Зеленова Е.А.¹, Маткава Л.Р.¹, Даниэль В.В.¹,
Иванов М.В.¹, Ивашечкин А.А.¹, Чердакли А.А.¹,
Волков М.А.¹, Шегурова А.Ф.¹, Загайнова А.В.¹,
Белошевская О.А.², Майтесян Л.В.², Тарасова И.В.²,
Ткачева О.Н.², Стражеско И.Д.², Кескинов А.А.¹,
Юдин В.С.¹, Макаров В.В.¹, Юдин С.М.¹, Каштанова Д.А.¹*

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение “Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью” Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ “ЦСП” ФМБА России), Москва, Россия;

² Обособленное структурное подразделение “Российский геронтологический научно-клинический центр” федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования “Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова” Министерства здравоохранения Российской Федерации (ОСП РГНКЦ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России), Москва, Россия;

e-mail: oIgnatieva@csppfmba.ru

Актуальность исследования

Микробиом кишечника является жизненно важным компонентом человеческого организма. На сегодняшний день хорошо известно, что особенности кишечного микробиома тесно

ассоциированы с благополучным или неблагополучным старением, а также во многом влияют на качество жизни, когнитивные функции и продолжительность жизни человека.

Цель

Изучение связи между особенностями кишечного микробиома пожилых людей в возрасте 90 лет и старше и ранее идентифицированными фенотипами старения.

Методы

В исследование были включены 411 пожилых людей в возрасте 90 лет и старше из Москвы и Московской области. У всех участников были собраны образцы стула, из которых выделяли ДНК и проводили анализ их микробного состава методом Shotgun секвенирования. Всем участникам проводилась также комплексная гериатрическая оценка, включающая лабораторное обследование.

Обработка результатов секвенирования проводилась с использованием программ kraken2 и Bracken. Статистический анализ проводился в среде R с использованием пакетов phyloseq, vegan, ANCOMBC.

Результаты

Было установлено, что участники исследования делятся на четыре кластера в соответствии с особенностями их микробиома. Три из четырех идентифицированных кластеров продемонстрировали заметное доминирование одного таксона, а именно *Segatella*, *Bacteroides* или *Escherichia*, в то время как в одном кластере не было доминирующего бактериального рода, но он характеризовался самыми высокими показателями разнообразия. В кластере с доминированием *Escherichia* был зафиксирован гораздо более высокий процент участников с низкофункциональным фенотипом, в то время как в класте-

ре без доминирующего рода была выше доля участников с сохранным фенотипом.

Функциональный анализ позволил обнаружить в общей сложности 48 метаболических путей, дифференциально представленных по крайней мере в одной паре кластеров. Кластер с доминированием *Bacteroides* характеризовался повышенной представленностью генов подавляющего большинства метаболических путей категорий “метаболизм углерода”, “метаболизм углеводов” и “метаболизм аминокислот”. В кластере с доминированием *Escherichia* были более представлены гены, вовлеченные в формирование биопленок, и гены, ассоциированные с антибиотикорезистентностью.

Выводы

Нами были выявлены 4 специфических микробиотных кластера, три из которых характеризовались доминированием одного таксона. Была зафиксирована ассоциация между выявленными кластерами и ранее установленными клиническими фенотипами старения. Кластеры также различались по представленности метаболических путей: 48 путей демонстрировали дифференциальную представленность по крайней мере в одной паре кластеров.

РЕКОНСТРУКЦИЯ ТРЕХМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ ХРОМАТИНА: СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ И ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ ПОНИМАНИЯ РЕГУЛЯЦИИ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ

Масулис И.С.

*Институт биофизики клетки РАН “Федерального исследовательского центра “Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”, Пушкино, Россия;
e-mail: masulus@icb.psn.ru*

“Внутренняя жизнь” нашего генетического материала в составе хроматина на протяжении более полувека остается одним из самых интригующих вопросов молекулярной и клеточной биологии. До недавнего времени (начало 2020-х гг.) наши представления о роли пространственной структуры хроматина в регуляции экспрессии генов в процессе индивидуального развития организма и при патологических изменениях в клетках базировались на незыблемых биохимически подтвержденных данных о нуклеосомной организации, энхансерно-промоторных взаимодействиях и эпигенетических модификациях. Однако, огромное количество данных, накопленных за полувековую историю исследований, было получено либо на модельных генетических конструкциях или фрагментах генома, что сужало масштабы их экстраполяции на геном как целое, либо, напротив, носили слишком генерализованный характер. Ароморфозом в технике и методологии эксперимента в области геномики стало применение высокопроизводительного секвенирования к картированию межхромосомных контактов, в том числе, на уровне единичной клетки (Hi-C), и развитие инструментальных методов визуализации и позиционирования олигонуклеотидных зондов в нативном хроматине (FISH - Fluorescence in situ hybridization). Понимание

важности информации о динамическом поведении генетического материала для воссоздания траектории дифференцировки и малигнизации клеток привело к организации международного консорциума, 4-Dimensional Nucleome (4DN), на базе NIH, призванного депонировать экспериментальные данные о трехмерной организации хроматина с различным временным разрешением [1]. Данные представлены на портале <https://data.4dnucleome.org/> и насчитывают на сегодняшний день 3156 экспериментальных наборов по результатам 7083 экспериментов. Из них для различных типов клеток человека доступно 249 наборов данных DNA-FISH, 359 наборов in-situ-Hi-C, 7 наборов данных Hi-C для одиночных клеток. Формат представления данных позволяет выявить колокализацию участков хромосом с разрешением около 1 тнп. Одним из последних результатов деятельности консорциума является масштабное сравнение локализации межхромосомных контактов для эмбриональных стволовых клеток человека H1 и иммортализованных фибробластов (HFFc6) с использованием альтернативных методов (Hi-C, SPRITE (split-pool recognition of interactions by tag extension), ChIA-PET (chromatin interaction analysis by paired-end tag sequencing), HiChIP (proximity ligation-assisted (PLAC)-seq) [2]. Комбинированное использование данных, полученных разными методами, позволило существенно увеличить общее количество хромосомных петель (141,365 для клеток H1 и 146,140 для HFFc6), ранее для клеток HFFc6 это количество оценивалось как 28,922 [3]. При этом конфигурация петель и соотношение их границ с интенсивно экспрессируемыми генами существенно отличаются для эмбриональных и дифференцированных клеток. Именно образование петель является структурной основой для формирования транскрипционных хабов – локальных конгломератов хроматина, объединенных взаимодействием с характерным для данного типа клеток

набором транскрипционных факторов. Дальнейшее развитие платформы 4DN связывают не только с экстенсивным накоплением данных, но и развитием новых алгоритмов предсказания структурного состояния хроматина в зависимости от нуклеотидного контекста, генетического окружения (плотность распределения генов в совокупности с уровнем их экспрессии), наличия участков связывания с регуляторными белками. Появление вычислительных инструментов предсказания пространственной организации хроматина представляет интерес для более точного выбора мишеней для направленного редактирования генома и оценки его потенциальной эффективности.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Sparks T.M., Harabula I., Pombo A.* Evolving methodologies and concepts in 4D nucleome research // *Current Opinion in Cell Biology*, 2020, 64:105-111. DOI: 10.1016/j.ceb.2020.04.005.
- [2] *Dekker J., Oksuz B.A., Zhang Y., Wang Y., Minsk M.K., Kuang S., Yang L., Gibcus J.H., Krietenstein N., Rando O.J., Xu J., Janssens D.H., Henikoff S., Kukalev A., Andréa W., Winick-Ng W., Kempfer R., Pombo A., Yu M., Kumar P., Zhang L., Belmont A.S., Sasaki T., van Schaik T., Brueckner L., Peric-Hupkes D., van Steensel B., Wang P., Chai H., Kim M., Ruan Y., Zhang R., Quinodoz S.A., Bhat P., Guttman M., Zhao W., Chien S., Liu Y., Venev S.V., Plewczynski D., Azcarate I.I., Szabó D., Thieme C.J., Szczepińska T., Chyliński M., Sengupta K., Conte M., Esposito A., Abraham A., Zhang R., Wang Y., Wen X., Wu Q., Yang Y., Liu J., Boninsegna L., Yildirim A., Zhan Y., Chiariello A.M., Bianco S., Lee L., Hu M., Li Y., Barnett R.J., Cook A.L., Emerson D.J., Marchal C., Zhao P., Park P.J., Alver B.H., Schroeder A.J., Navelkar R.,*

Bakker C., Ronchetti W., Ehmsen S., Veit A.D., Gehlenborg N., Wang T., Li D., Wang X., Nicodemi M., Ren B., Zhong S., Phillips-Cremins J.E., Gilbert D.M., Pollard K.S., Alber F., Ma J., Noble W.S., Yue F. An integrated view of the structure and function of the human 4D nucleome // *Nature*, 2026, 649(8097), pp. 759-776. DOI: 10.1038/s41586-025-09890-3.

- [3] *Dekker J., Alber F., Aufmkolk S., Beliveau B.J., Bruneau B.G., Belmont A.S., Bintu L., Boettiger A., Calandrelli R., Disteche C.M., Gilbert D.M., Gregor T., Hansen A.S., Huang B., Huangfu D., Kalhor R., Leslie C.S., Li W., Li Y., Ma J., Noble W.S., Park P.J., Phillips-Cremins J.E., Pollard K.S., Rafelski S.M., Ren B., Ruan Y., Shav-Tal Y., Shen Y., Shendure J., Shu X., Strambio-De-Castillia C., Vertii A., Zhang H., Zhong S.* Spatial and temporal organization of the genome: Current state and future aims of the 4D nucleome project // *Molecular Cell*, 2023, 3, 83(15), pp. 2624-2640. DOI: 10.1016/j.molcel.2023.06.018.

Для заметок

Благодарим за помощь в организации конференции:



ООО «Гордиз»



АО «БИОКАД»



ООО «НПФ СИНТОЛ»



PCR-News



БИОХИММАК
Группа компаний

АО «Биохиммак»



ТД «Химмед»

Материалы конференции
«День ДНК – 2026».
24 апреля 2026 года.

СБОРНИК ТЕЗИСОВ

Составители
пресс-служба ИТЭБ РАН:
к.б.н. Перевязова Т.А.,
к.б.н. Дюкина А.Р.,
оформление Панчелюга В.А.,
дизайн обложки Абакумова Ю.Ю.,
обложка изображение от freerik.

Издательство «Синхробук» (Synchrobook™)
Пушино, 2026.