

IV всероссийская молодежная конференция
«Методы и приборы для анализа биологических проб»

АналитБиоПрибор 2025

2-3 декабря, Санкт-Петербург

Сборник тезисов докладов



Четвертая ежегодная всероссийская молодежная конференция
по методам и приборам для анализа биологических объектов
«АналитБиоПрибор-2025»

Тезисы докладов
Четвертой ежегодной всероссийской
молодежной конференции по методам
и приборам для анализа биологических
объектов «АналитБиоПрибор-2025»

Санкт-Петербург
Издательско-полиграфическая ассоциация
высших учебных заведений
2025

УДК 53, 57, 60, 61, 62, 68

ББК 22.3, 28, 34.9

T29

Рецензенты:

А. Л. Буляница, ведущий научный сотрудник Лаборатории информационно измерительных био- и хемосенсорных микросистем Института аналитического приборостроения РАН, д-р физ.-мат. наук

А. В. Поволоцкий, профессор Кафедры лазерной химии и лазерного материаловедения, Институт химии СПбГУ, д-р физ.-мат. наук

Тезисы докладов Четвертой ежегодной всероссийской молодежной конференции по методам и приборам для анализа биологических объектов «АналитБиоПрибор-2025». — СПб.: Издательско-полиграфическая ассоциация высших учебных заведений, 2025. — 226 с.

02—03 декабря 2025 г. в Санкт-Петербургском отделении Российской академии наук (СПбО РАН) проходила IV ежегодная всероссийская молодежная конференция по методам и приборам для анализа биологических объектов «АналитБиоПрибор-2025». На конференции были представлены новейшие результаты и достижения молодых ученых, которые сопровождались докладами ведущих разработчиков и пользователей российского оборудования. На круглом столе прошла дискуссия возможностей и перспектив развития российского научного приборостроения для решения актуальных биологических и медицинских задач. В сборнике представлены тезисы 76 докладов участников конференции.



РХО



СПбО РАН



Публикуется в авторской редакции

Составители и технические редакторы: А. С. Букатин, М. А. Иванова
Дизайн: Е. А. Кополева, А. В. Кретинина, С. Е. Григорьева

Конференция проводится в рамках федерального проекта «Развитие отечественного приборостроения гражданского назначения для научных исследований» по Соглашению от «24» июня 2025 г. № 075-15-2025-513 при финансовой поддержке ООО «НПП Синтол».

© Коллектив авторов, 2025

© Издательско-полиграфическая ассоциация высших учебных заведений, 2025

ISBN 978-5-91155-490-3

DOI 10.52565/9785911554903

Организаторы конференции

Институт аналитического приборостроения
Российской академии наук
Санкт-Петербургское отделение Российской академии наук
Санкт-Петербургский национальный исследовательский
Академический университет им. Ж. И. Алферова
Российской академии наук
Российское химическое общество им. Д. И. Менделеева

Индустриальный партнер

Научно-производственная компания Синтол

Программный комитет

А. А. Евстапов — *председатель*, д.т.н., директор ИАП РАН
А. С. Букатин — *секретарь*, к.ф.-м.н., доцент, зам. директора по научной работе ИАП РАН, с.н.с., СПбАУ РАН им. Ж. И. Алферова
В. Е. Курочкин — д.т.н., проф., руководитель научного направления «Методы и приборы генетического анализа» ИАП РАН
Я. И. Алексеев — к.б.н., директор по науке ООО «Синтол»
Е. П. Подольская — д.т.н., ведущий научный сотрудник ИАП РАН
П. Н. Мелентьев — к.ф.-м.н., заведующий лабораторией Института спектроскопии РАН
А. Ю. Зайцева — к.ф.-м.н., заведующая лабораторией ИАП РАН
И. С. Мухин — д.ф.-м.н., профессор, проректор по науке СПбАУ РАН им. Ж. И. Алферова

Организационный комитет

А. С. Букатин — *председатель*
В. В. Романова — *секретарь*
К. Д. Ващенко
А. В. Крестина
А. С. Гладчук

ПРОГРАММА КОНФЕРЕНЦИИ

2 ДЕКАБРЯ

9:00—10:00

Регистрация участников

10:00—10:15

Торжественное открытие конференции

10:15—10:45

Пленарный доклад

Эволюция лечения рака в эпоху молекулярной диагностики

Имянитов Евгений Наумович

*д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующий научным отделом
биологии опухолевого роста, врач-генетик НМИЦ онкологии
им. Н. Н. Петрова*

10:45—11:30

Секция № 1

Методы исследования нуклеиновых кислот

Модератор — директор по науке ООО НПФ «Синтол»

Алексеев Яков Игоревич

10:45—11:00

Цифровые измерения нуклеиновых кислот

Филипенко Максим Леонидович

*д.б.н., зав. лабораторией фармакогеномики
ИХБФМ СО РАН*

11:00—11:15

**Технологии гибридной амплификации ДНК: особенности,
механизмы и практическое применение**

Игнатов Константин Борисович

*к.б.н., с.н.с. Института общей генетики
им. Н. И. Вавилова (ИОГен) РАН*

- 11:15–11:30 **Универсальная система диагностики инфекционных заболеваний на основе CAS нуклеаз и рекомбиназной полимеразной амплификации**
Морозова Наталия Евгеньевна
к.б.н., научный сотрудник Лаборатории молекулярной микробиологии Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого

11:30–12:00

Кофе-брейк

12:00–13:30

Секция № 2

Современные российские разработки в области биомедицинского приборостроения

Модератор — д.т.н., директор ИАП РАН

Евстрапов Анатолий Александрович

- 12:00–12:15 **Акустооптические приборы биомедицинского назначения: возможности и перспективы применения**

Пожар Витольд Эдуардович

д.ф.-м.н., заведующий отделом акустооптических информационных технологий НТИЦ УП РАН

- 12:15–12:30 **Промежуточные итоги разработки отечественной технологии нанопорового секвенирования**

Ермаков Артем Михайлович

к.б.н., ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН», г. Пущино; ООО Нанопорус; АНО Институт инженерной физики, г. Серпухов

- 12:30–12:45 **Методы валидации процессов в роботизированном комплексе для проведения ПЦР**

Климочкин Кузьма Олегович

начальник отдела разработок ДНК-Технологии

- 12:45—13:00 **Производство изделий из кварцевого стекла для химической промышленности и аналитического приборостроения: состояние и перспективы**
Померанцев Марк Аронович
заместитель технического директора по перспективным технологиям кварцевого производства АО «Гусевский стекольный завод им. Ф. Э. Дзержинского»
- 13:00—13:15 **Автоматизированное портативное устройство для экспресс-диагностики туберкулеза и определения антибиотикорезистентности**
Алатырев Артем Георгиевич
научный сотрудник ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России, ООО «ТИЦ»
- 13:15—13:30 **Определение летучих органических соединений в выдыхаемом воздухе с использованием времяпролетной масс-спектрометрии с импульсным тлеющим разрядом**
Кравцов Денис Вадимович
руководитель производственной группы ООО «Люмэкс»

13:30—14:30

Обед

14:30—15:00

Пленарный доклад

Новые приборы и методы в нейротехнологиях

Белоусов Всеволод Вадимович

д.б.н., член-корр. РАН, генеральный директор

Федерального центра мозга и нейротехнологий ФМБА РФ

15:00—16:00

Секция № 3

Новые подходы к созданию диагностических приборов и методов

Модератор — к.ф.-м.н., доцент, заместитель директора по научной работе ИАП РАН Букатин Антон Сергеевич

- 15:00—15:15 **Разработка и создание массивов микроэлектродов для регистрации электрических сигналов от нейронов и стимуляции клеток**
Мухин Иван Сергеевич
д.ф.-м.н., профессор, проректор по науке СПбАУ РАН им. Ж. И. Алферова
- 15:15—15:30 **(Пред)обработка данных в биомедицине — сигналы, изображения, тексты и чем тут полезен искусственный интеллект**
Пчицкая Екатерина Игоревна
к.ф.-м.н., заведующая Лабораторией анализа биомедицинских изображений и данных Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого
- 15:30—15:45 **Разработка экспресс тест-системы для оценки изменений функций фагоцитов при патологиях**
Авхачева Надежда Владимировна
к.б.н., и. о. директора ИБП РАН — обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН
- 15:45—16:00 **Неинвазивная оценка концентрации глюкозы в крови при помощи волоконно-оптических датчиков пульсовой волны**
Ушаков Николай Александрович
д.ф.-м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории «Волоконная оптика» Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого

16:00—18:00

Кофе-брейк и Постерная сессия

3 ДЕКАБРЯ

9:30—10:00

Регистрация участников

10:00—10:30

Пленарный доклад

Отечественный tandemный трехквadrupольный масс-спектрoметр для жидкостной хроматографии — tandemной масс-спектрoметрии

Сысoев Алексей Александрoвич

д.ф.-м.н., профессор, главный научный сотрудник НИЯУ МИФИ

10:30—11:30

Секция № 4

Успехи современной масс-спектрoметрии

Модератор — к.т.н., с.н.с. ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России

Гладчук Алексей Сергеевич

10:30—10:45

Транспортирующие радиочастотные каналы с эффектом а-волны при нестандартной конфигурации электродов и высокочастотных напряжений

Бердников Александр Сергеевич

д.ф.-м.н., главный научный сотрудник, заведующий лабораторией ИАП РАН

10:45—11:00

Оптимизация показателей назначения tandemного трехквadrupольного масс-спектрoметра с ионизацией электрораспылением

Крайнов Михаил Николаевич

инженер и аспирант НИЯУ МИФИ

11:00—11:15

Мобильная масс-спектрoметрия. Сложности в измерении вулканических газов

Титов Юрий Алексеевич

научный сотрудник ИАП РАН

11:15–11:30 **Разработка и тестирование прототипа микрокапельного химического реактора, работающего на основе мультикапиллярного электрораспыления**
Кулешов Денис Олегович
младший научный сотрудник ИАП РАН

11:30–12:00

Кофе-брейк

12:00–12:30

Пленарный доклад

Полноэкзомное секвенирование как основа репродуктивной генетики: современное состояние, открытые вопросы

Трофимов Дмитрий Юрьевич
д.б.н., член-корр. РАН, директор Института репродуктивной генетики НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова

12:30–13:30

Секция № 5

Приборы и методы секвенирования нуклеиновых кислот

Модератор — к.б.н., директор по науке ООО НПФ «Синтол»
Алексеев Яков Игоревич

12:30–12:45 **Технологии капельной микрофлюидики для секвенирования и скрининга лекарственных препаратов**
Букатин Антон Сергеевич
к.ф.-м.н., зам. директора по научной работе ИАП РАН, старший научный сотрудник СПбАУ РАН им. Ж. И. Алферова

12:45–13:00 **Первый отечественный прибор для массового параллельного секвенирования ДНК «Нанофор СПС»**
Пушкин Антон Андреевич
ведущий инженер ИАП РАН, старший научный сотрудник ООО НПФ «Синтол»

- 13:00—13:10 **Опыт первого пользовательского применения секвенатора «Нанофор СПС» в исследовании микробиома почв национальных парков Вьетнама**
Игнатьева Дарья Андреевна
младший научный сотрудник лаборатории ландшафтной экологии и геоматики ФИЦ ИнБЮМ
- 13:10—13:20 **Методика оценки аналитической чувствительности детекторов лазер-индуцированной флуоресценции капиллярных генетических анализаторов**
Козлова Полина Алексеевна
аспирант ИАП РАН, инженер ООО НПФ «Синтол»
- 13:20—13:30 **Особенности использования белков эффекторов Cas12a для диагностических приложений**
Арсениев Анатолий Николаевич
инженер-исследователь Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого

13:30—14:30

Обед

14:30—15:00

Пленарный доклад

Времяпролетная масс-спектрометрия с импульсным тлеющим разрядом — универсальный инструмент современной аналитической химии: от элементного и изотопного анализа твердотельных проб до определения ЛОС и неорганических соединений в воздухе

Ганеев Александр Ахатович

*д.ф.-м.н., заместитель руководителя отдела Спектрометрии
ООО «Люмэкс»*

15:00–15:50

Секция № 6

Доклады молодых ученых

Модератор — к.ф.-м.н., доцент, заместитель директора по научной работе ИАП РАН Букатин Антон Сергеевич

- 15:00–15:10 **Разработка и исследование импедиметрического иммуносенсора на основе восстановленного оксида графена**
Епифанова Елизавета Игоревна
студентка магистратуры СПбГЭТУ «ЛЭТИ»
- 15:10–15:20 **Оценка эффективности российских цеолитов в качестве сорбента для улавливания [^{11}C] CO_2 при синтезе [^{11}C] метионина**
Хромеева Мария Алексеевна
студент бакалавриата Института мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН
- 15:20–15:30 **Применение синхронного накопления для диагностики ишемической болезни сердца по методу электрокардиографии сверхвысокого разрешения**
Шевяков Даниил Олегович
младший научный сотрудник ИАП РАН
- 15:30–15:40 **Бескапельное электрораспыление морфина с масс-спектрометрическим детектированием**
Ильющонок Семен Кириллович
младший научный сотрудник ИАП РАН
- 15:40–15:50 **Мини электронно-оптическая система на основе электростатической линзы**
Вересов Сергей Олегович
аспирант СПбАУ РАН им. Ж. И. Алферова

15:50–16:15

Кофе-брейк

16:15–17:30

Круглый стол

Развитие российского научного приборостроения для биомедицинских исследований

*Модераторы — заместитель генерального директора
по научно-технической работе и проектам АО «ЭЗАН»
Веретенников Александр Владимирович и директор по науке
ООО НПФ «Синтол» Алексеев Яков Игоревич*

- 16:15–16:30 **О кризисе в отечественном научном приборостроении
и путях выхода из него**
Алексеев Яков Игоревич
к.б.н., директор по науке ООО НПФ «Синтол»
- 16:30–16:45 **Жесткий софт: наш увлекательный опыт разработки ПО
для научного и медицинского оборудования**
Долгушин Сергей Анатольевич
к.ф.-м.н., директор ООО «Айвок»
- 16:45–17:00 **Меры поддержки разработки научного оборудования
и опыт его передачи в серийное производство**
Веретенников Александр Владимирович
*заместитель генерального директора по научно-
технической работе и проектам АО «ЭЗАН»*
- 17:00–17:30 **Дискуссия**

17:30–18:00

Торжественное закрытие конференции

Награждение молодых ученых за лучшие устные и стендовые доклады

Стендовые доклады

1. Влияние отражения света в линейке капилляров на аналитическую чувствительность генетического анализатора
Владимиров Федор Львович
ведущий инженер ИАП РАН
2. Коррекция аддитивной и мультипликативной составляющих неравномерности освещения в изображениях секвениатора ДНК «Нанофор СПС»
Манойлов Владимир Владимирович
д.ф.-м.н., заведующий лабораторией ИАП РАН
3. Распознавание кластеров ДНК в данных высокопроизводительного секвенирования методами машинного обучения
Сараев Алексей Сергеевич
инженер 1 категории ИАП РАН
4. Калибровочное устройство для оценки качества реакционных ячеек генетического анализатора «Нанофор СПС»
Зубик Александра Николаевна
научный сотрудник ИАП РАН
5. Учет базовой линии и компенсация перекрестных помех сигналов флуоресценции при обработке данных секвенирования по Сэнгеру на приборе «Нанофор 05»
Гордеев Алексей Никитич
студент СПбАУ РАН им. Ж. И. Алферова
6. Использование обратных функций для обработки сигналов в задаче секвенирования ДНК
Логинов Александр Ярославович
инженер ИАП РАН

7. Влияние модификации внутренней поверхности капилляров на качество секвенирования по Сенгеру
Ващенко Кристина Дмитриевна
инженер ИАП РАН, инженер ООО НПФ «Синтол»
8. Желатиновые гель-лифтеры для сбора и дальнейшей экстракции нуклеиновых кислот с пористых поверхностей
Гермаш Наталия Николаевна
младший научный сотрудник ИАП РАН
9. Сравнение пространственных характеристик шаблонов для данных массового параллельного секвенирования
Ямановская Анастасия Юрьевна
инженер ИАП РАН
10. Опыт использования генетического анализатора «Нанофор 05» для молекулярной диагностики наследственных заболеваний на примере наборов для анализа генов HTT, AR И UGT1A1
Исаев Денис Алексеевич
научный сотрудник ООО НПФ «Синтол»
11. Разработка метода химической линейаризации ДНК для реализации парноконцевого секвенирования в приборах массового параллельного секвенирования
Малахова Мария Алексеевна
младший научный сотрудник ООО НПФ «Синтол»
12. Моделирование первичных данных при одномолекулярном секвенировании в реальном времени
Васильева Екатерина Кимовна
научный сотрудник ИАП РАН
13. Разработка гиротрона с холодным полевым эмиттером для спектроскопических приложений
Тарадаев Сергей Петрович
аспирант СПбПУ Петра Великого

14. Пространственная сепарация ионов, разделенных по времени пролета
Коваль Кирилл Алексеевич
студент СПбПУ Петра Великого
15. Радиочастотные каналы для транспортировки ионов, использующие мультипольное сегментирование электродов
Масюкевич Сергей Владимирович
старший научный сотрудник ИАП РАН
16. Транспортирующая радиочастотная воронка сложной формы как интерфейсный элемент для согласования аксептанса масс-анализатора и эмиттансов варьлируемых источников ионов
Лисицын Леонид Андреевич
ведущий инженер-исследователь ООО «Люмэкс», аспирант ИАП РАН
17. Особенности транспортировки ионов через первую ступень системы дифференциальной откачки с повышенным давлением
Ткач Егор Андреевич
младший научный сотрудник ИАП РАН
18. Функционализация мишени для малди-масс-спектрометрии металл-аффинными сорбентами на основе стеаратов лантаноидов
Хомяк Александра Евгеньевна
лаборант-препаратор ФГБУ НКЦТ им. С. Н. Голикова ФМБА России
19. Система экспрессного скрининга реакционноспособных метаболитов ксенобиотиков методом МАЛДИ масс-спектрометрии
Афанасьева Анна Андреевна
младший научный сотрудник ФГБУ НКЦТ им. С. Н. Голикова ФМБА России

20. Разработка гидрогелевых биочернил с желатиновыми микрогелями для 3D-биопечати
Тюшкевич Андрей Андреевич
аспирант СПбАУ РАН им. Ж. И. Алферова
21. Синтез PLGA наночастиц с оболочкой Pluronic F127 при помощи наноосаждения в микрофлюидном миксере
Наумов Евгений Игоревич
аспирант СПбАУ РАН им. Ж. И. Алферова
22. Создание тестовых структур для сканирующей капиллярной микроскопии
Жуков Михаил Валерьевич
научный сотрудник ИАП РАН
23. Полимерные микрофлюидные чипы для исследования клеточных культур в экстремальных условиях
Шубина Мария Алексеевна
студентка магистратуры СПбГЭТУ «ЛЭТИ»
24. Оптимизация технологии термокомпрессионного связывания функциональных слоев полимерных микрофлюидных чипов
Глазкова Анастасия Александровна
студентка магистратуры СПбГЭТУ «ЛЭТИ»
25. Гибридный микрофлюидный реактор для выделения белковых структур
Новикова София Павловна
студентка СПбГЭТУ «ЛЭТИ»
26. Исследование технологии формирования массивов полимерных микролинз для флуориметрических биосенсорных систем
Хасанова Диана Ильдаровна
аспирант СПбГЭТУ «ЛЭТИ»

27. Разработка методики определения активности фермента аргининдеиминазы при помощи вольтамперометрического аммиачного сенсора на основе сульфата меди (II) с полимерной мембраной
Сычинская Ксения Алексеевна
студентка СПбГУ
28. Интеграция моделирования и эксперимента в исследовании капиллярных клапанов: подход к ускоренной разработке микрофлюидных диагностических чипов
Агишева Александра Романовна
ученый-исследователь ООО «Рapid Био»
29. Создание и оптимизация диагностической платформы для детекции мутаций вируса гриппа на основе технологии CRISPR-Cas
Горьковская Александра Андреевна
лаборант-исследователь СПбПУ Петра Великого
30. Классификация электрокардиосигналов сверхвысокого разрешения с помощью нейронных сетей
Денисова Елена Артемовна
младший научный сотрудник ИАП РАН
31. Обнаружение характерных точек электрокардиосигнала на основе дробных преобразований
Логачев Евгений Павлович
младший научный сотрудник ИАП РАН
32. Миниатюрный оптический датчик для мониторинга микроциркуляции при тепловой пробе
Медведева Екатерина Александровна
доцент СПбПУ Петра Великого

33. Разработка методики градуировки сенсоров на аммиак
Матьяш Екатерина Валерьевна
студентка магистратуры Института химии СПбГУ
34. Регистрация белков с помощью твердотельной нанопоры
Друян Лидия Михайловна
студентка Университета ИТМО
35. Интеграция оптических и электрофизиологических методов *in vivo* для исследования нарушений нейронной активности при болезни Альцгеймера
Кулясов Кирилл Денисович
студент СПбПУ Петра Великого
36. Вольтамперометрическое определение адреналина на электроде, модифицированном молекулярно импринтированным полимером
Хайруллина Дарина Юрьевна
аспирантка Казанского (Приволжского) федерального университета
37. Прототипирование зрительных имплантов с помощью биолобораторного оборудования
Гагарина Марина Михайловна
лаборант СПБАУ РАН им. Ж. И. Алферова
38. PiPer4 и NELM — открытые программные пакеты для создания биоэлектронных приборов и обработки получаемых с их помощью данных
Бойцова Наталья Андреевна
студентка СПБАУ РАН им. Ж. И. Алферова
39. Прижизненная флуоресцентная диагностика клеток в биоэлектронных устройствах при помощи красителя abds
Абелит Анна Андреевна
аспирантка и младший научный сотрудник СПБАУ РАН им. Ж. И. Алферова

40. Разработка гибридной микрофлюидной системы на основе пленочного фоторезиста для синтеза магнитных липосом
Вальшина Ралина
студентка СПбГЭТУ «ЛЭТИ»
41. Технологические возможности, опыт разработки и производства твердотельных устройств для применения в биомедицинских изделиях
Тугушев Марат Шамильевич
начальник сектора АО «Светлана-Электронприбор»
42. Регистрация функциональной активности одиночных белковых молекул с помощью твердотельного нанопорового биосенсора
Ваулин Никита Васильевич
младший научный сотрудник СПбАУ РАН им. Ж. И. Алферова
43. Опыт использования генетического анализатора «Нанофор 05» для оценки качества геномных библиотек на примере образцов, приготовленных наборами Syntera 2 ДНК и NEB
Монахова Юлия Андреевна
научный сотрудник ООО НПФ «Синтол»
44. Разработка оптически прозрачного термоциклера для микрофлюидных чипов
Жуков Николай Павлович
инженер ИАП РАН
45. Сравнение алгоритмов обработки графиков плавления ДНК
Морозов Роман Ростиславович
инженер ИАП РАН
46. Разработка биосенсорной системы на основе наностержней оксида цинка для обнаружения лактоферрина
Принцева Алина Сергеевна
студентка СПбГЭТУ «ЛЭТИ»

47. Изготовление гибкой имплантируемой электроники методами лазерной абляции

Катунов Тимур Дмитриевич

аспирант СПбАУ РАН им. Ж. И. Алферова

48. Платформенное решение для IVD: приборы и ПО

Телегина Александра Валерьевна

проектный менеджер ООО «РapidБио»

49. Электрохимическое детектирование лактата с применением наноструктурированных покрытий на основе оксида и гидроксида никеля

Полидаускайте Анна Валерьевна

студентка СПбГЭТУ «ЛЭТИ»

ЦИФРОВЫЕ ИЗМЕРЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

М. Л. Филипенко
mlfilipenko@gmail.com

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090, Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 8*

В презентации рассматриваются современные достижения в области цифровых измерений биологических молекул, включая цифровую ПЦР (dPCR), цифровой иммуноферментный анализ белков (dELISA, SIMOA, SMCT), а также высокопроизводительные платформы для анализа протеомных биомаркеров (Olink).

Цифровые измерения это абсолютное количественное определение молекул аналита (в штуках), основанное на распределении образца по большому количеству микрореакционных ячеек (капель, лунок и др.), часто существенно превышающему количество молекул в образце, с последующим детектированием присутствия или отсутствия целевой молекулы в каждой ячейке. Ключевое условие — возможность обнаружения одиночной молекулы, что достигается за счет систем амплификации сигнала (например, real-time PCR, ELISA). Метод опирается на распределение Пуассона, позволяющее точно рассчитать исходную концентрацию аналита по доле «пустых» ячеек, без использования калибровочных кривых.

Исторически концепция цифровых измерений восходит к работам Маккрэди (1915) по серийным разведениям при посеве бактерий для определения их титра, а в молекулярной биологии — к экспериментам Ротмана (1961) по детекции единичных молекул фермента бета-галактозидазы. Цифровая ПЦР (digital PCR; dPCR) как метод цифрового анализа нуклеиновых кислот стала возможной после появления real-time PCR, в которой гидролиз специфического флуоресцентно меченого зонда генерирует флуоресцентный сигнал, пропорциональный накоплению ДНК ампликона, что позволяет выявлять единичные молекулы ДНК. Современная цифровая ПЦР обеспечивает высокую точность, воспроизводимость и чувствительность

анализа ДНК ($LOQ < 5$ копий), что делает ее «золотым стандартом» для: приготовления референсных образцов ДНК/РНК, выявления редких соматических мутаций, количественного профилирования бактерий, вирусов, хромосом и их фрагментов в геноме человека, высокоточного профилирования микроРНК и мРНК и многого другого. Проникновение dPCR в клинику и другие практические отрасли неразрывно связано с эволюционированием технологических платформ для осуществления этого метода.

Современные платформы (SCI Digital, RainSure, Bio-Rad QX600, QIAcuity, QuantStudio Absolute Q, Digital LightCycler) поддерживают до 6 флуоресцентных каналов и десятки тысяч ячеек на реакцию, что расширило возможности измерений и привело к появлению новых возможностей для практического применения. Современные цифровые методы обеспечивают принципиально новый уровень чувствительности, точности и динамического диапазона анализа биологических молекул, что невозможно достичь традиционными подходами.

В презентации мы попытались отразить текущие проблемы и задачи для совершенствования как технологических платформ и реagentной базы, так и расширение спектра применения цифровой ПЦР в биологии, медицине и сельском хозяйстве.

ТЕХНОЛОГИИ ГИБРИДНОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДНК: ОСОБЕННОСТИ, МЕХАНИЗМЫ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

К. Б. Игнатов^{1,*}, Д. А. Варламов², И. О. Маркина²

*** ignatovkb@bk.ru**

*¹ Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, 119991, Москва,
ул. Губкина, 3*

² НПФ Синтол, 127434, Москва, ул. Тимирязевская, 42, корп. Б

Методы амплификации нуклеиновых кислот (НК) широко используются в науке, медицине и криминалистике для различных молекулярно-биологических анализов и детекции генетического материала. Пандемия COVID-19, вызванная вирусом SARS-CoV2, ярко показала значимость этих технологий для быстрого и надежного выявления НК-содержащих патогенов.

«Золотым стандартом» амплификации НК является полимеразная цепная реакция (ПЦР) (polymerase chain reaction, PCR), старейший и наиболее популярный метод амплификации ДНК. ПЦР протекает в режиме термоциклирования, и для ее проведения требуется термостабильная ДНК-полимераза. К основным достоинствам метода следует отнести: высокую чувствительность (позволяет детектировать единичные молекулы НК), специфичность реакции и распространенность оборудования для проведения ПЦР.

Методы изотермической амплификации НК стали завоевывать популярность с начала 2000-х гг., с момента появления технологии петлевой амплификации НК (loop-mediated isothermal amplification, LAMP). Для проведения изотермической амплификации необходимо использовать ДНК-полимеразу с цепь-вытесняющей активностью. Основным достоинством LAMP и других изотермических методов в сравнении с ПЦР является высокая скорость реакции амплификации из-за отсутствия термоциклирования и, как следствие, короткое время проведения анализа. Однако чувствительность анализов, основанных на изотермических

реакциях, в ряде случаев оказывается существенно ниже, чем чувствительность ПЦР.

С созданием ДНК-полимераз обладающих одновременно высокой термостабильностью и высокой цепь-вытесняющей активностью [1], стало возможно соединить в одной реакции процессы термоциклической (ПЦР) и изотермической амплификации ДНК. Такое совмещение процессов позволило увеличить эффективность амплификации и чувствительность анализа, одновременно существенно сократив время его проведения. Среди методов гибридной амплификации, сочетающих ПЦР и изотермическую амплификацию, следует отметить: полимеразную цепную вытесняющую реакцию (polymerase chain displacement reaction, PCDR) [1, 2], coupled PCR-LAMP [3], pulse rolling circle amplification (pulse-RCA) [4] и недавно разработанную цепную реакцию с вытеснением цепи (strand displacement chain reaction, SDCR) [5]. В докладе рассмотрены механизмы и особенности этих реакций, а также их практическое использование для детекции и анализа генетического материала.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ, (проект № 125040404873-4).

Литература

1. Ignatov, K. B.; Barsova, E. V.; Fradkov, A. F.; Blagodatskikh, K. A.; Kramarova, T. V.; Kramarov, V. M. A Strong Strand Displacement Activity of Thermostable DNA Polymerase Markedly Improves the Results of DNA Amplification // *BioTechniques*, 2014, 57, 81–87.
2. Harris, C. L.; Sanchez-Vargas, I. J.; Olson, K. E.; Alphey, L.; Fu, G. Polymerase Chain Displacement Reaction. // *BioTechniques*, 2013, 54, 93–97.
3. Varlamov, D. A.; Blagodatskikh, K. A.; Smirnova, E. V.; Kramarov, V. M.; Ignatov, K. B. Combinations of PCR and Isothermal Amplification Techniques Are Suitable for Fast and Sensitive Detection of SARS-CoV-2 Viral RNA // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020, 8, 604793.
4. Maslov, A.Y.; Makhortov, S.; Sun, S.; Heid, J.; Dong, X.; Lee, M.; Vijg, J. Single-Molecule, Quantitative Detection of Low-Abundance Somatic Mutations by High-Throughput Sequencing. // *Sci. Adv.*, 2022, 8, eabm3259.

5. Smirnova, E. V.; Barsova, E. V.; Varlamov, D. A.; Kramarov, V. M.; Blagodatikh, K. A.; Ignatov, K. B. Strand Displacement Chain Reaction (SDCR): New Hybrid Amplification Technique for Fast and Sensitive Detection of Genetic Materials. // Biomolecules. 2025. 15, 1313.

**УНИВЕРСАЛЬНАЯ СИСТЕМА ДИАГНОСТИКИ
ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НА ОСНОВЕ CAS
НУКЛЕАЗ И РЕКОМБИНАЗНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ
АМПЛИФИКАЦИИ**

А. А. Алексеев¹, А. Д. Ведяйкин¹, А. Н. Арсениев¹, Т. А. Заир-Бек¹,
Л. А. Кунгурова², Н. В. Бирало¹, В. Д. Воробьева¹, А. С. Мельников¹,
П. Ю. Сердобинцев¹, И. В. Курдюмова¹, А. Б. Криворучко²,
М. А. Ходорковский¹, **Н. Е. Морозова^{1,*}**
* morozova_ne@spbstu.ru

¹ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29

² Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова, 194044,
Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6, лит. Ж

Рост числа новых вирусных инфекций и стремительное распространение антимикробной устойчивости среди бактерий значительно увеличивают показатели заболеваемости и летальности от инфекционных заболеваний. Эффективное сдерживание эпидемиологического распространения таких инфекций и назначение адекватной терапии пациентам требуют быстрой, высокочувствительной и доступной диагностики — особенно в условиях, где важна возможность проведения тестирования непосредственно у постели пациента.

На сегодняшний день «золотым стандартом» выявления патогенов остается ПЦР-диагностика, отличающаяся универсальностью, возможностью мультиплексного анализа и исключительной

чувствительностью. Вместе с тем ее применение ограничено необходимостью дорогостоящего оборудования, высокой квалификации персонала и относительно длительным временем выполнения теста. В условиях массового скрининга или при необходимости срочного результата эти факторы становятся критическими.

В связи с этим перспективным направлением является разработка универсальных диагностических платформ, сочетающих высокую скорость, простоту использования, мобильность и низкую стоимость. Современные подходы, такие как SHERLOCK [1] и DETECTR [2], основаны на применении систем CRISPR-Cas и их коллатеральной активности. Упомянутая активность заключается в том, что, после распознавания целевой нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК искомого патогена) комплексом Cas-нуклеазы с направляющей РНК, происходит неспецифическая деградация флуоресцентных зондов, что позволяет визуализировать результат. Такие системы отличаются высокой специфичностью и чувствительностью, работают при сравнительно низких температурах (около 37 °С) и могут быть совмещены с изотермическими методами амплификации, например, рекомбиназно-полимеразной амплификацией (РПА), что дополнительно ускоряет анализ. Таким образом, полный цикл тестирования при таком подходе занимает 20–40 минут при сохранении высокой чувствительности.

Нами разрабатывается отечественная система изотермической амплификации РПА, полностью состоящая из самостоятельно синтезированных белков, системы детекции генетического материала патогенов на основе коллатеральной активности Cas-белков собственного производства, а также портативное устройство для экспресс-регистрации сигнала.

Прототип созданной нами системы диагностики успешно прошел апробацию в ГБУЗ «МНПЦЛИ ДЗМ» на клинических образцах с использованием SARS-CoV-2 в качестве модельного патогена.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке ООО НПФ «Синтол».

Литература

1. Kellner, M. J., Koob, J. G., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Zhang, F. (2019). SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases // Nature protocols, 14(10), 2986–3012.
2. Chen, J. S., Ma, E., Harrington, L. B., Da Costa, M., Tian, X., Palefsky, J. M., & Doudna, J. A. (2018). CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. Science (New York, N.Y.), 360(6387), 436–439.

МЕТОДЫ ВАЛИДАЦИИ ПРОЦЕССОВ В РОБОТИЗИРОВАННОМ КОМПЛЕКСЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР

К. О. Климочкин

klimochkin@dna-technology.ru

НПО ДНК-Технология, 142281, г. Протвино, Железнодорожная ул., 20

В докладе представлены решения компании ДНК-Технологии в области контроля технологических процессов выделения, пробоподготовки и контроля оборудования для проведения ПЦР.

Данные решения представлены в рамках концепции «тотального контроля», включающего в себя:

- контроль треков;
- контроль процессов;
- контроль оборудования.

Объединение оборудования ПЦР-лаборатории в единый роботизированный комплекс позволяет оптимизировать типовые сценарии рутинных исследований и повысить эффективность и устойчивость получаемых лабораториями результатов.

Предлагаемый подход от ДНК-Технологии позволяет реализовать сквозной алгоритм действий сотрудников лабораторий от

преаналитического этапа до выдачи готовых решений в максимально сжатые сроки при сохранении принципа воспроизводимости и достоверности результата.

ПРОИЗВОДСТВО ИЗДЕЛИЙ ИЗ КВАРЦЕВОГО СТЕКЛА ДЛЯ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ И АНАЛИТИЧЕСКОГО ПРИБОРОСТРОЕНИЯ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

М. А. Померанцев^{1, *}, В. В. Романова²

* markaron@yandex.ru

¹ АО «Гусевский стекольный завод имени Ф. Э. Дзержинского», 601550, г. Гусь-Хрустальный, пр. 50-летия Советской Власти, 8

² Институт аналитического приборостроения РАН, 198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А

Акционерное общество «Гусевский стекольный завод им. Ф. Э. Дзержинского» (АО СЗД) является единственным в России предприятием полного производственного цикла по выпуску изделий из кварцевого стекла в виде оптических заготовок, труб широкого размерного ряда и изделий разнообразных форм. В органической химии и биологической промышленности использовались изделия из многокомпонентных специальных стекол. Кварцевое стекло обладает избыточными свойствами для этих направлений и является более дорогостоящим [1].

Целью работы является развитие отечественного направления кварцевого химического машиностроения и аналитического приборостроения в рамках государственной программы по увеличению объемов малотоннажной и среднетоннажной химии на 30 % к 2025 г. и на 70 % — к 2030 г. по сравнению с 2020 г. Проект направлен на создание опытного производства изделий из синтетического кварцевого стекла с полным технологическим циклом — от плавки до

готовой аппаратуры, включая элементы для фотохимических, плазмохимических, УФ- и высокотемпературных процессов. Задачами проекта являются разработка и внедрение аппаратов из кварцевого стекла, обеспечивающих проведение реакций при температурах до 400–600 °С, создание миниатюрных реакторов для фотохимических синтезов, арматуры и клапанов для агрессивных сред, а также формирование технологической базы для серийного выпуска лабораторных и промышленных узлов аналитического применения.

АО СЗД является единственным в России предприятием полного производственного цикла. Предприятием разработаны и утверждены технические условия (ТУ 21-23-238-88) на изделия из прозрачного кварцевого стекла специального назначения. Инфраструктура предприятия обеспечивает изготовление изделий среднего уровня точности с габаритами: диаметр до 150 мм и длина до 2500 мм (рис. 1).

Освоены разработки кранов, клапанов и инжекторов платформы «кран — инжектор — клапан» для рабочих сред с температурой до 400 °С, выполненные из кварцевого стекла с высокой химической стойкостью и прозрачностью. Разработаны и изготовлены опытные образцы технологического оборудования: ректификационная колонна из кварцевого стекла диаметром 180 мм, собранная из до 7 модулей для непрерывного режима работы; опытный реактор для ректификации, экстракции и синтеза кремнийорганических

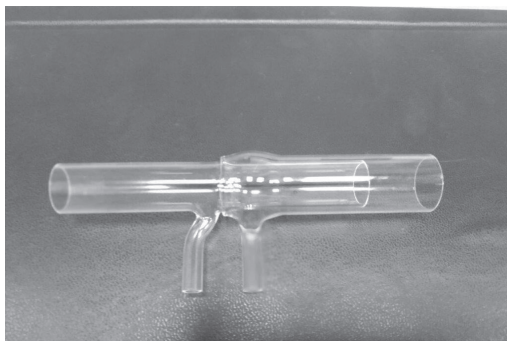


Рис. 1. Горелки индуктивно связанной плазмы с габаритами: диаметр до 150 мм и длина до 2500 мм

соединений. Была реализована совместная разработка: установка плазмохимической обработки сыпучих материалов, оснащенная плазмотроном, разработанным АО СЗД, и электронным пускорегулирующим аппаратом плазмотрона, созданным Институтом сильноточной электроники Сибирского отделения РАН. Также разработана опытная установка утилизации хлорорганических соединений методом сжигания, реализующая технологию газофазного синтеза диоксида кремния (SiO_2) из летучего тетрахлорида кремния (SiCl_4) с последующим формированием полученного продукта в конструкционные изделия. В направлении аналитического приборостроения изготовлены кварцевые горелки индуктивно связанной плазмы, модернизированные камеры распыления, оптические кюветы и фотореакторы на светодиодах (одно- и трехканальные модули), а также кварцевые гранулы для оптических реакторов. Основными преимуществами изделий из кварцевого стекла являются высокая температурная стойкость (до 1100 °С), устойчивость к агрессивным реакционным средам, оптическая прозрачность в широком диапазоне длин волн, возможность создания экстремальных условий проведения процессов и применение передовых методов активации химических реакций — плазменных, радиочастотных, микроволновых и фотохимических (ультрафиолетовых). Компактность и высокая точность кварцевых изделий позволяют разрабатывать миниатюрные реакторы для аналитических и биотехнологических систем. Проведенные инициативные разработки показывают высокую степень готовности АО СЗД к переходу на выпуск аппаратуры для инновационных химических технологий и аналитического приборостроения. Представлен проект создания на предприятии направления кварцевого химического машиностроения и оснащения аналитических приборов соответствующими изделиями с целью обеспечения импортозамещения отечественного приборного производства.

Благодарности

Работа выполнена при участии АО СЗД в рамках инициативных разработок по направлению «КварцХимМаш» и «КварцАналитПрибор».

Авторы выражают благодарность компании ООО «ЭКОС-1» за методологическую помощь при изготовлении опытных образцов клапанов и кранов, а также за участие в проектировании опытной ректификационной колонны (Трохин В. Е., Левин Ю. И.).

Литература

1. M. Liu, G. Wang, F. Zhao, W. Li, G. Zhu, G. Liang, W. Jian, L. Liao, G. Lv. Advances in purification technologies and applications of high-purity quartz resources // Progress in Natural Science: Materials International. 2025. Vol. 35, № 1. P. 51–64.

АВТОМАТИЗИРОВАННОЕ ПОРТАТИВНОЕ УСТРОЙСТВО ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА И ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

А. А. Алатырев^{1,*}, А. П. Ткачук¹, Д. В. Каникевич², Ю. К. Дзагоева²,
В. О. Алябин², А. А. Воробьев², А. Г. Самойлова¹, И. А. Васильева¹
* artem.alatyrev@gmail.com

¹ Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127473, Москва, ул. Достоевского, 4, корп. 2

² ООО «Троицкий инженерный центр», 108840, Москва, г. Троицк,
ул. Академика Франка, 16

Ранняя диагностика туберкулеза с одновременным определением лекарственной устойчивости — ключевое условие эффективно-го лечения и прерывания цепи передачи инфекции. Современные молекулярно-генетические методы анализа, реализованные в таких системах, как Xpert MTB/RIF Ultra и Truenat, обеспечивают выявление *M. tuberculosis* и рифампицин-устойчивости в течение 2 часов с высокой чувствительностью и специфичностью [1]. В России доля

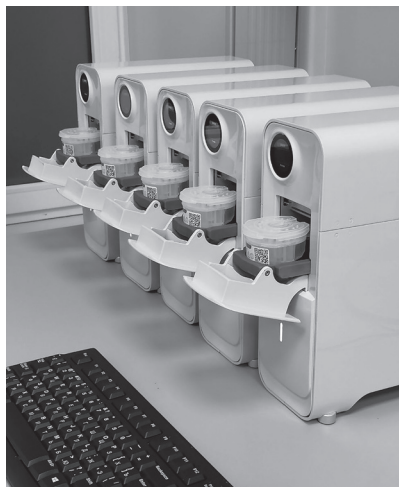


Рис. 1. Внешний вид пяти устройств с установленными картриджами в предстартовом положении

МЛУ-ТБ среди новых случаев превышает 30 % в отдельных регионах [2], и такие методы экспресс-диагностики позволяют незамедлительно назначить адекватную терапию, избегая неэффективного лечения и формирования широкой устойчивости. Однако доступность и стоимость указанных импортных устройств не позволяет применять их на уровне первичного звена и удаленных областях страны. Актуальной задачей является создание отечественных автоматизированных устройств для молекулярной диагностики туберкулеза и определения устойчивости к антибиотикам.

В данной работе описывается автоматическое устройство для диагностики туберкулеза и антибиотикорезистентности — от идеи до реализации. Рассмотрены ключевые этапы разработки в технической и биологической части. Представлены характеристики реализованной в устройстве ПЦР тест-системы по определению МБТ и устойчивости к рифампицину.

Краткое описание системы: устройство состоит из анализатора, управляющего компьютера и набора реагентов в виде одноразовых картриджей и расходных материалов. Для выполнения анализа не требуется специальных условий и дополнительного оборудования. Пробоподготовка не более 10 минут. Общее время анализа 2–2,5 часа. По завершении система автоматически обрабатывает полученные в ходе анализа данные и выдает результат в доступном и понятном виде. Внешний вид устройства представлен на рис. 1.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке ГЗ Минздрава России, 2023-2025 (QСAM-2023-0008).

Литература

1. Global tuberculosis report 2024, WHO, ISBN 978-92-4-010153-1
2. Васильева И. А., Тестов В. В., Стерликов С. А., Елисеев П. И., Гусева В. А., Кузнецов Е. О., Самойлова А. Г. Сравнительный анализ результатов тестирования лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* среди случаев туберкулеза в России в 2023–2024 гг. // Туберкулез и болезни легких. 2025;103(5):8–14.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В ВЫДЫХАЕМОМ ВОЗДУХЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВРЕМЯПРОЛЕТНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ С ИМПУЛЬСНЫМ ТЛЕЮЩИМ РАЗРЯДОМ

Д. В. Кравцов^{1, 2, *}, А. А. Ганеев¹, А. Р. Губаль¹

* kravtsovdv@lumex.ru

¹ ООО «Люмэкс-маркетинг», 192029, Санкт-Петербург,
пр. Обуховской обороны, д.70, корп. 2, лит. Е

² Институт аналитического приборостроения РАН, 198095,
Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А

Традиционной сферой применения масс-спектрометрии с тлеющим разрядом является элементный и изотопный анализ твердых проб. Однако было показано, что данный метод может применяться для определения летучих органических соединений (ЛОС) в воздухе, что может быть применено для малоинвазивной диагностики заболеваний по маркерам в выдыхаемом воздухе, например, для ранней диагностики рака легких и различных инфекционных заболеваний.

Использование масс-спектрометрии с микросекундным импульсным тлеющим разрядом позволяет определять широкий круг ЛОС с высокой чувствительностью и низкой степенью фрагментации [1, 2].

В ходе данного исследования были определены оптимальные условия ионизации ЛОС в воздухе, позволяющие достичь пределов обнаружения на уровне единиц ppb_v при существенно более низкой степени фрагментации в сравнении с электронной ионизацией. Были исследованы образцы выдыхаемого воздуха с использованием масс-спектрометра с ионизацией в микросекундном импульсном тлеющем разряде Люмас ИТР-301 (ООО «Люмэкс», Санкт-Петербург, Россия). Использование масс-спектрометрии с высоким разрешением (6000 , $m/z = 208$ Да) позволило установить брутто-формулы с использованием значений точных масс для порядка 70 компонент. Для данных компонент была проведена оценка концентрации в выдыхаемом воздухе, а также для части компонент были предложены возможные соединения.

Литература

1. Kravtsov D., Gubal A., Chuchina V., Ivanenko N., Solovyev N., Stroganov A., Jin H., Ganeev A. Volatile Organic Compound Fragmentation in the Afterglow of Pulsed Glow Discharge in Ambient Air // *Molecules*. 2022. Vol. 27, no. 20. P. 6864. DOI: 10.3390/molecules27206864.
2. Ganeev A. A., Gubal A. R., Kravtsov D. V. et al. Time-of-Flight Mass Spectrometry with Pulsed Glow Discharge for the Direct Determination of Volatile Organic Compounds in Air, Nitrogen, and Argon: Ionization Processes of Volatile Organic Compounds // *Journal of Analytical Chemistry*. 2025. Vol. 80. P. 339–350. DOI: 10.1134/S1061934824701818.

РАЗРАБОТКА ЭКСПРЕСС ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ИЗМЕНЕНИЙ ФУНКЦИЙ ФАГОЦИТОВ ПРИ ПАТОЛОГИЯХ

Н. В. Авхачева

avkhacheva@gmail.com

Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН — обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, 142290, г. Серпухов, г. Пушкино, ул. Институтская, 7

Хемилюминесцентные методы широко применяются для решения множества научно-исследовательских и рутинных задач, требующих количественной характеристики химических/биохимических/клеточных процессов, сопровождающихся явлением хемилюминесценции. Так, в практической медицине они используются при решении ряда задач, включая:

- оценку состояния (про/анти)оксидантных систем больных и эффективности проводимых терапевтических мероприятий; определение непереносимости лекарственных препаратов;
- изучение функциональной активности клеток крови, включая оценку состояния фагоцитарного звена иммунитета в норме и патологии; выявление осложнений у беременных женщин и новорожденных;
- определение антиоксидантной активности фармакологических препаратов, поиск новых лекарственных кандидатов.

Хемилюминесцентный анализ используется также для контроля безопасности продуктов питания, пищевых добавок и косметологических средств, исследования качества питьевой воды, анализа водоемов, почвы, воздуха и помещений на содержание вредных веществ, контроля отходов и сбросов промышленных предприятий, определения токсичности новой продукции, контроля технологических процессов в режиме реального времени и т. д.

Для решения многих рутинных задач требуется применение производительных многоканальных хемилюминометров, причем изучение быстротекущих процессов требует регистрации данных с частотой на уровне 10 Гц. При этом желательно использование

по возможности меньшего объема пробы, что становится особенно критичным, например, при анализе функциональной активности клеток крови новорожденных. Большинство хемилюминометров, представленных на отечественном рынке (Lum-5773 и Lum-1200, МГУ им. М. В. Ломоносова; Флюорат-02, Люмэкс, Россия; Ormed-LUM, НВП «Орбита», Россия; БХЛ-06, НИЦ «Биоавтоматика», Россия; Биотокс-10М, ООО «НЕРА-С», Россия; БХЛ-1, БГУ, Белоруссия), являются одноканальными, предназначены для работы с пробами объема свыше 0,5 мл и не обеспечивают частоту регистрации данных свыше 1 Гц. Наиболее близок к оптимальному для решения рутинных задач набору технических характеристик 12-канальный хемилюминометр Lum-1200, МГУ им. М. В. Ломоносова, но он характеризуется предельной частотой регистрации данных, равной 1 Гц, и минимальным объемом пробы 50 мкл (макс. 3 мл). Скоростной многоканальный микрохемилюминометр при том же самом количестве каналов способен обеспечить минимальный объем пробы, равный 10 мкл (макс. 0,2 мл), при частоте регистрации данных вплоть до 50 Гц. Прибор обеспечивает термостатирование проб в диапазоне температур 32–42 °С с точностью $\pm 0,5$ °С, автоматическое поддержание нулевого уровня сигнала и широкий динамический диапазон измерений, не менее 3 порядков величины. В 2009 г. на базе ИБП РАН с участием специалистов ИБК РАН был разработан экспериментальный образец аналогичного прибора, испытания которого на базе нескольких организаций (ИБП РАН, ИБК РАН, НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова, РГМУ, больница Отрадинского ТМК (Ступинский р-н Моск. обл.), СПбГТУ) получили высокую оценку. В ФИЦ ПНЦБИ РАН прибор применяется для проведения исследований регуляции оксидазной активности в гранулоцитах, выявления особенностей оксидазной активности в клетках крови при различных заболеваниях, а также оценки свойств фармацевтических препаратов и воздействия на них различных факторов. Разработанный ранее прибор требует проведения глубокой модернизации, в том числе расширения температурного диапазона кюветодержателя до 32–42 °С, обновления программного обеспечения, актуализации интерфейса связи с компьютером, перевода на отечественные элементную базу

и комплектующие в связи с санкционными запретами, наложенными на Россию, что сопряжено с внесением конструктивных изменений.

НЕИНВАЗИВНАЯ ОЦЕНКА КОНЦЕНТРАЦИИ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ ПРИ ПОМОЩИ ВОЛОКОННО-ОПТИЧЕСКИХ ДАТЧИКОВ ПУЛЬСОВОЙ ВОЛНЫ

А. А. Маркварт, Н. А. Ушаков*

* n.ushakoff@spbstu.ru

*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29*

Неинвазивный мониторинг глюкозы необходим для улучшения качества жизни больных диабетом, однако существующие методы сложны, дороги и пока не пригодны для портативных устройств. В настоящей работе рассматривается возможность оценки концентрации глюкозы в крови по параметрам пульсовой волны (ПВ), регистрируемой неинвазивным датчиком, а также анализируются биофизические процессы, влияющие на такие измерения и варианты реализации портативного устройства.

Пульсовая волна — это механическая волна, распространяющаяся по артериям из-за сердечных сокращений. Ее характеристики зависят от механических свойств крови, стенок сосудов и окружающих тканей, которые зависят от уровня глюкозы. Осмотическое проникновение глюкозы в биологические ткани также влияет на их упругость [2], что позволяет использовать параметры волны для прямой оценки концентрации глюкозы.

Первым этапом работы является разработка высокоточных неинвазивных датчиков ПВ с минимальными искажениями сигнала. Наиболее перспективными являются оптические методы измерений

благодаря их точности, безопасности и компактности. В отличие от фотоплетизмографии, чувствительной к капиллярному кровотоку [1], оптические волоконные датчики позволяют регистрировать параметры артериальной ПВ. В работе исследованы несколько типов таких датчиков: волоконно-оптический интерферометр Фабри — Перо (ИФП), брэгговская решетка, межмодовый интерферометр и оптическая когерентная томография с волоконным зондом.

Отдельной задачей было сравнение работоспособности и эффективности различных подходов измерения сигналов ПВ. Для этого был предложен ряд метрик качества сигнала ПВ: отношение сигнал — шум; доля успешно извлеченных сигнальных признаков (систолические пики и основания волн); корреляция повторяющихся интервалов ПВ; повторяемость параметров разложения ПВ.

Измерения сигналов ПВ для сравнения чувствительных элементов производились одновременно в четырех точках: на сонной артерии, на лучевых артериях обеих рук (запястья), на большеберцовой артерии (бедро). В измерениях участвовали 10 здоровых испытуемых, все измерения проходили в течение 5 минут в двух режимах: испытуемый находился в неподвижном состоянии либо совершал телодвижения. Полученные сигналы были обработаны, и для всех испытуемых и режимов испытаний были найдены критерии качества сигналов ПВ. Оптимальными по соотношению качества сигналов и требований к оптоэлектронной системе регистрации сигналов оказались ИФП [4]. Данные чувствительные элементы использовались для регистрации сигналов ПВ при дальнейших исследованиях.

В измерениях участвовало 3 испытуемых, применялась следующая методика измерений: с интервалом в несколько дней для каждого испытуемого проводились два стандартных теста на толерантность к глюкозе, во время каждого из них испытуемый выпивал стакан теплой воды с растворенными 75 граммами глюкозы, после чего в течение часа регистрировались сигналы ПВ и каждые 2 минуты инвазивно измерялся уровень глюкозы в крови. В результате концентрация глюкозы в крови испытуемых варьировалась в пределах от 3,6 до 9 ммоль/л (от 65 до 160 мг/дл).

Результаты инвазивного измерения концентрации глюкозы использовались в качестве референсных значений при разработке математической модели и в качестве опорных значений для верификации модели. Измерения ПВ проводились одновременно при помощи четырех мультиплексированных ИФП в четырех точках: на запястьях обеих рук (лучевые артерии), на шее (сонная артерия) и на лодыжке (большеберцовая артерия).

Для снижения размерности входных данных при построении физико-математической модели, производилась декомпозиция сигналов ПВ на прямую и 5 отраженных волн, в результате каждый период сигнала ПВ описывался 18 параметрами (амплитуды, положения и ширины прямой и отраженных волн). Модель, описывающая связь концентрации глюкозы в крови с параметрами сигнала ПВ, строилась по данным, полученным в ходе первого измерения, и верифицировалась по данным, полученным в ходе повторного измерения. Для данных, полученных от разных испытуемых, строились независимые математические модели. Наилучшую точность из реализованных моделей показал метод опорных векторов с квадратичным ядром, средняя для всех испытуемых ошибка оценки составила 0,39 ммоль/л.

При проведении вышеупомянутых измерений регистрация сигналов волоконно-оптических датчиков производилась методами спектральной интерферометрии с использованием относительно дорогостоящих и громоздких суперлюминисцентного диода и оптического спектрометра. Также была исследована возможность регистрации сигналов ПВ волоконно-оптическим датчиком, регистрация сигналов которого происходит при помощи смартфона. В результате проведенных измерений было показано, что при помощи такой низкобюджетной и портативной системы возможна регистрация сигналов ПВ с показателями качества, сравнимыми с сигналами, полученными системой спектральной интерферометрии [3].

При помощи системы оптической когерентной эластографии с пространственным разрешением около 10 мкм были исследованы эластические свойства артериальных стенок при проведении стандартного теста на толерантность к глюкозе, а также при внешнем локальном применении раствора глюкозы в качестве просветляющего

агента. Было показано, что при изменении концентрации глюкозы в крови от 4 до 9 ммоль/л жесткость капиллярных и артериальных стенок изменяется у разных испытуемых на 10–20 %, что хорошо согласуется с наблюдаемыми изменениями скорости ПВ.

Полученные результаты указывают на возможность неинвазивной оценки концентрации глюкозы в крови при помощи коммерчески доступных носимых устройств. Дальнейшие исследования будут направлены на разработку более точных и универсальных математических моделей, описывающих связь концентрации глюкозы с параметрами ПВ.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (измерения сигналов пульсовой волны, разработка метода оценки концентрации глюкозы в рамках проекта № 19-72-00051, прямая оценка эластических свойств тканей при помощи оптической когерентной эластографии в рамках проекта № 23-72-10095).

Литература

1. A. Kamshilin, E. Nippolainen, I. Sidorov, P. Vasilev, N. Erofeev, N. Podolian, R. Romashko A new look at the essence of the imaging photoplethysmography // Scientific Reports, 2015, Vol. 5, No. 1. P. 10494.
2. C. Liu, M. Singh, J. Li, Z. Han, C. Wu, S. Wang, R. Idugboe, R. Raghunathan, E. Sobol, V. Tuchin, M. Twa, K. Larin Quantitative Assessment of Hyaline Cartilage Elasticity During Optical Clearing Using Optical Coherence Elastography // Sovremennye tehnologii v medicine, 2015, Vol. 7, No. 1. P. 44.
3. A. Markvart, A. Petrov, S. Tataurtshikov, L. Liokumovich, N. Ushakov Low-Cost Fiber-Optic Sensing System with Smartphone Interrogation for Pulse Wave Monitoring // Photonics, 2023, Vol. 10, No 10. P. 1074.
4. N. Ushakov, A. Markvart, D. Kulik, L. Liokumovich Comparison of Pulse Wave Signal Monitoring Techniques with Different Fiber-Optic Interferometric Sensing Elements // Photonics, 2021, Vol. 8, № 5. P. 142.

ОТЕЧЕСТВЕННЫЙ ТАНДЕМНЫЙ ТРЕХКВАДРУПОЛЬНЫЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТР ДЛЯ ЖИДКОСНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ — ТАНДЕМНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

А. А. Сысоев^{1, *}, А. Ю. Адамов¹, С. В. Масюкевич², Д. Н. Кузьмин³
* aasysoyev@mephi.ru

¹ Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», 115409, Москва, Каширское шоссе, 31

² Институт аналитического приборостроения РАН, 198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А

³ АО «Экспериментальный завод научного приборостроения со специальным конструкторским бюро РАН», 142432, г. Черноголовка, проспект Академика Семенова, 9

С момента своего появления тандемная трехкварупольная масс-спектрометрия нашла широчайшее применение во многих критически важных областях человеческой деятельности, в особенности в области биомедицинских исследований и приложений [1], постепенно вытесняя альтернативные технологии. В частности, число биомедицинских исследований на основе тандемной трехкварупольной масс-спектрометрии за последнее десятилетие выросло в 2–3 раза [2].

Введенные в 2022 г. экспортные ограничения затронули продукцию всех ведущих производителей тандемных масс-спектрометров, официальные поставки оборудования в Россию и авторизованное сервисное обслуживание было прекращено. Одним из ответов на этот вызов стала разработка в НИЯУ МИФИ в кооперации с ИАП РАН, АО «ЭЗАН», Первым МГМУ им. И. М. Сеченова, БФУ им. И. Канта отечественного тандемного трехкварупольного масс-спектрометра с ионизацией методом электрораспыления.

Проведенные предварительные исследования и опрос пользователей позволили сформулировать круг минимальных требований, которым должен удовлетворять тандемный масс-спектрометр,

чтобы обеспечивать большую часть наиболее актуальных потребностей в целевых областях приложений. Ключевым параметром являлась чувствительность, которая должна была быть соизмерима с этим параметром у наиболее массовых приборов, таких как Sciex Triple Quad 4500, Shimadzu LCMS-8045, Agilent 6460. Основными областями применения таких приборов являются научные исследования, предиктивная и персонализированная медицина, контроль животноводческой и растениеводческой продукции, безопасность и криминалистика, экологический мониторинг.

В настоящее время в НИЯУ МИФИ созданы макетный и опытный образцы прибора, проведены государственные приемочные испытания опытного образца, собираются образцы установочной серии для испытаний у заинтересованных потребителей. В приборе для ионизации пробы используется источник электрораспыления, транспорт ионов в камеру анализатора осуществляется через двухступенчатый интерфейс дифференциальной откачки, диссоциация ионов предшественников осуществляется в ячейке столкновений на основе гексаполя, в качестве детектора используется вторично-электронный умножитель с непрерывным динодом канального типа. Результаты

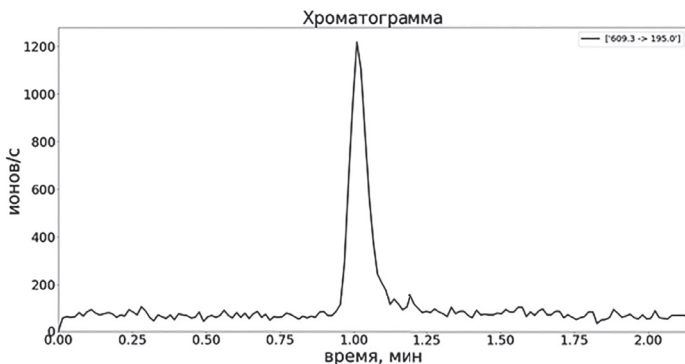


Рис. 1. Хроматограмма 1 пг стандартного образца резерпина (РЗП-ВНИИМ-ЭС) ГСО 12061-2022 в ацетонитриле в режиме масселективного детектирования (m/z 609 \rightarrow m/z 195) без математической обработки (сырые данные)

испытаний показывают достижимость показателей назначения, соизмеримых с достигаемыми на наиболее массовых масс-спектрометрах. В частности, на рис. 1 представлена хроматограмма 1 пг стандартного образца резерпина (РЗП-ВНИИМ-ЭС) ГСО 12061-2022 в режиме масс-селективного детектирования без математической обработки (сырые данные).

В дальнейшем планируется организовать в партнерстве с АО «ЭЗАН» серийное производство, обеспечить условия для продвижения и последующего сервисного обслуживания масс-спектрометра, а также расширить модельный ряд дифференцируемыми по чувствительности моделями ВЭЖХ-МС/МС, охватывающими широкий диапазон современных приложений.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках федерального проекта «Развитие отечественного приборостроения гражданского назначения для научных исследований» (соглашения № 075-02-2022-1674 от 10.08.2022, № 075-03-2023-097/10 от 22.09.2023, № 075-03-2024-096/7 от 03.07.2024, № 075-03-2025-423/5 от 23.05.2025).

Литература

1. Bravo-Veyrat S., Hopfgartner G. Mass spectrometry based high-throughput bioanalysis of low molecular weight compounds: Are we ready to support personalized medicine? // *Anal. Bioanal. Chem.* 2022. Vol 414, N 1. P. 181–192.
2. Andreas Tsakalof, Alexey A. Sysoev, Kira V. Vyatkina, Alexander A. Eganov, Nikolay N. Eroshchenko, Alexey N. Kiryushin, Alexey Yu. Adamov, Elena Yu. Danilova, Alexander E. Nosyrev, Current Role and Potential of Triple Quadrupole Mass Spectrometry in Biomedical Research and Clinical Applications // *Molecules*. 2024. Vol. 29, N 23. P. 5808.

ТРАНСПОРТИРУЮЩИЕ РАДИОЧАСТОТНЫЕ КАНАЛЫ С ЭФФЕКТОМ А-ВОЛНЫ ПРИ НЕСТАНДАРТНОЙ КОНФИГУРАЦИИ ЭЛЕКТРОДОВ И ВЫСОКОЧАСТОТНЫХ НАПРЯЖЕНИЙ

А. С. Бердников^{1,*}, Л. А. Лисицын^{1,2}, С. В. Масюкевич¹

*** asberd@yandex.ru**

*¹ Институт аналитического приборостроения РАН, 198095,
Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А*

*² ООО «Люмэкс-маркетинг», 192029, Санкт-Петербург,
пр. Обуховской обороны, 70, корп. 2, лит. Е*

Транспортирующие масс-спектрометрические устройства являются полезной и важной составляющей частью современных масс-спектрометров. Один из вариантов подобных устройств это транспортирующие каналы с высокочастотными электрическими полями, обеспечивающие бегущую волну псевдопотенциала на оси (эффект «А-Волны») [1].

В силу того, что между псевдопотенциалом высокочастотного электрического поля и самим высокочастотным электрическим полем отсутствует взаимно однозначная связь (см. монографии [2, 3], где последовательно излагается метод псевдопотенциала), эффект А-волны может наблюдаться при очень разных способах подачи высокочастотных напряжений на электроды системы, которые визуально и технически сильно различаются. В частности, несмотря на то, что в первичном российском патенте [4] его авторы постарались перечислить максимально широкий класс электродов и радиочастотных напряжений, с помощью которых возможно создание бегущей волны псевдопотенциала, это не стало преградой для появления впоследствии аналогичных зарубежных патентов, эксплуатирующих этот же эффект [5].

Особенности положений патентного права и сложившиеся практики его применения достаточно часто позволяют выдавать за новые изобретения конструкции, которые с точки зрения любого не-

предвзятого физика совпадают с уже имеющимися патентами (особенно при столкновении интересов российских и зарубежных бизнесов). Однако и сама по себе задача анализа неоднозначной математической связи между высокочастотными электрическими полями и их псевдопотенциальными функциями, которая рассматривается в данном докладе с помощью модельных высокочастотных электрических потенциалов [6], представляет несомненный теоретический интерес и является нетривиальным интеллектуальным вызовом как для опытных исследователей, так и для молодых ученых.

Благодарности

Исследование выполнено в рамках темы FFZM-2025-0006 Государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-00444-25-00 от 26.12.2024 для ИАП РАН.

Литература

1. Андреева А. Д., Бердников А. С. Масс-спектрометрические устройства на основе радиочастотных электрических полей с архимедовыми свойствами // Масс-спектрометрия. 2011. Т. 8, № 4. С. 293–296.
2. Заславский Г. М., Сагдеев Р. З. Введение в нелинейную физику. От маятника до турбулентности и хаоса. М.: Наука, 1988. 368 с.
3. Gerlich D. Inhomogeneous RF fields: A versatile tool for the study of processes with slow ions // Ng Ch.-Y., Baer M. (Eds.). State-selected and state-to-state ion–molecule reaction dynamics. Part 1: Experiment (Book Series: Advances in Chemical Physics. Vol. LXXXII). New York: John Wiley & Sons Inc., 1992.
4. Патент на изобретение RU 2465679 от 27.10.2012 (заявка от 05.05.2011).
5. Патент на изобретение US 10692710 от 23.06.2020 (заявка от 16.11.2018).
6. Бердников А. С., Масюкевич С. В. Научное приборостроение, 2024, Т. 34, № 1, с. 107–116.
7. Бердников А. С., Масюкевич С. В., Помозов Т. В., Соловьев К. В. Научное приборостроение, 2025, Т. 35, № 3, с. 18–37.

ОПТИМИЗАЦИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ НАЗНАЧЕНИЯ ТАНДЕМНОГО ТРЕХКВАДРУПОЛЬНОГО МАСС- СПЕКТРОМЕТРА С ИОНИЗАЦИЕЙ ЭЛЕКТРОРАСПЫЛЕНИЕМ

М. Н. Крайнов*, А. Ю. Адамов, Е. Е. Сильников, А. А. Сысоев

* MNKrainov@mephi.ru

*Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», 115409,
Москва, Каширское шоссе, 31*

Жидкостная хроматография / тандемная масс-спектрометрия сегодня стала «золотым стандартом» точного и селективного определения содержания продуктов метаболизма в биологических жидкостях. Число опубликованных результатов биомедицинских исследований на основе тандемной трехквадрупольной масс-спектрометрии за последнее десятилетие выросло в 2-3 раза [1]. Экспортные ограничения основных производителей таких приборов выявили технологические риски развития научных исследований в области персонализированной и предиктивной медицины в нашей стране. С целью предотвращения негативных сценариев, связанных с возможностью реализации этих рисков, в НИЯУ МИФИ при участии ИАП РАН, АО «ЭЗАН», БФУ им. И. Канта и Первого МГМУ им. И. М. Сеченова была поставлена опытно-конструкторская работа «Разработка тандемного трехквадрупольного масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением», в рамках которой был выпущен опытный образец изделия, успешно прошедший государственные приемочные испытания.

При создании нового прибора помимо инструментального обеспечения важную роль играет разработка методов анализа. Демонстрируются первые результаты исследования возможности применения аналитических методов, основанных на использовании прототипа отечественного тандемного трехквадрупольного масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением, для решения отдельных практических задач. Приводятся результаты оптимизации параметров тандемного масс-спектрометра. Высокая селективность и чув-

ствительность тандемного трехкврупольного масс-спектрометра, работающего в режиме ДАС (диссоциативной активации соударением), позволяет добиться надежного определения целевых аналитов. Рассматриваются перспективные приложения в области биомедицинских исследований, контроля пищевой продукции и нефтехимии.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках федерального проекта «Развитие отечественного приборостроения гражданского назначения для научных исследований» (соглашения № 075-02-2022-1674 от 10.08.2022, № 075-03-2023-097/10 от 22.09.2023, № 075-03-2024-096/7 от 03.07.2024, № 075-03-2025-423/5 от 23.05.2025).

Литература

1. Andreas Tsakalof, Alexey A. Sysoev, Kira V. Vyatkina, Alexander A. Eganov, Nikolay N. Eroshchenko, Alexey N. Kiryushin, Alexey Yu. Adamov, Elena Yu. Danilova, Alexander E. Nosyrev, Current Role and Potential of Triple Quadrupole Mass Spectrometry in Biomedical Research and Clinical Applications // Molecules. 2024. Vol. 29, N 23. P. 5808.

МОБИЛЬНАЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ. СЛОЖНОСТИ В ИЗМЕРЕНИИ ВУЛКАНИЧЕСКИХ ГАЗОВ

Ю. А. Титов^{1,*}, А. Г. Кузьмин¹, А. А. Нуждаев², Р. А. Кузнецов²

*** top1m@mail.ru**

*¹ Институт аналитического приборостроения РАН, 198095,
Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31—33, лит. А*

*² Институт вулканологии и сейсмологии ДВО РАН, 683023, Камчатский край,
г. Петропавловск-Камчатский, б-р Пийпа Б. И., 9*

Задача измерения газового состава парогазовых струй на фумаролах, а также на приповерхностных участках термальных полей в зонах вулканической активности, как показала практика, имеет ряд нетривиальных особенностей. Помимо интуитивно понятных требований к прибору: влаго- и виброзащищенность корпуса, небольшая масса и компактность, прибор также должен иметь возможность переключаться в режим ручного управления, уметь работать от аккумулятора, а также иметь возможность управления со смартфона.

Как правило, объекты, представляющие интерес для вулканологов и геологов, труднодоступны. Для организации экспедиций и полевых работ на таких объектах требуются большие материальные и человеческие ресурсы. Зачастую ввиду погодных условий (ветер, осадки, туман) возможность проведения газового анализа в интересующем месте может быть сильно ограничена во времени. Ввиду этого необходимо, чтобы масс-спектрометр максимально быстро мог выйти на рабочий режим и записать масс-спектры интересующих газов, выходящих на поверхность, а затем также максимально быстро его можно было бы переместить на другую точку измерений. Поскольку полевые работы часто сопряжены с пешими походами, иногда автономными, то существует необходимость быстрого и простого дробления прибора на составные части для переноски.

Все эти рекомендации были выработаны в процессе экспедиций на полуострове Камчатка и острове Парамушир.

С 2009 г. в Институте аналитического приборостроения РАН совместно с коллегами из Института вулканологии и сейсмологии ДВО РАН ведутся работы по созданию мобильного квадрупольного масс-спектрометра для вулканологических и геологических измерений состава газов. За это время удалось снизить массу прибора с 27 до 13,5 кг. Первый прототип прибора имел масляную вакуумную откачку и работал от бензинового генератора (массой 10 кг). Второй прототип масс-спектрометра уже имел сухую безмасляную вакуумную откачку, меньшие габариты и массу около 16 кг, но для его работы также требовался бензиновый генератор. Третий прототип прибора (2025 г.) получил возможность работать от литий-ионного аккумулятора (масса 1,2 кг). Прибор был разделен на две части: первая — высоковакуумная откачка с анализатором и системой ввода пробы в прочной трубе (8,5 кг), и вторая — ударопрочный чемодан с системой управления прибором, аккумулятором и форвакуумной откачкой (5 кг). Для работы прибора необходим ноутбук или планшет. Во всех этих приборах использовалась электронная ионизация пробы, анализатором служил квадруполь, а ввод пробы осуществлялся через капилляр.

В процессе испытаний первого прототипа масс-спектрометра были обнаружены такие вещества, как гелий, водород, метан, углекислый газ и сероводород. Измерения проводились на полуострове Камчатка на геотермальных скважинах и открытых местах выхода газа на поверхность.

В процессе испытаний второго прототипа прибора на северном прорыве большого трещинного толбачинского извержения 1975–1976 гг. были обнаружены: на 1-м конусе и лавовом потоке Cl_2 и SO_2 , на 2-м конусе SO_2 .

Испытания третьего прототипа масс-спектрометра проходили летом — осенью 2025 г., на острове Парамушир, в рамках экспедиции Русского географического общества, а также на Камчатке. На Парамушире удалось проверить работоспособность прибора на разных высотах, вплоть до 1000 м, и протестировать удобство и безопасность его транспортировки на дальние расстояния. Аналитические измерения ввиду плохих погодных условий провести не удалось. Позже

в сентябре при измерениях на термальном поле вулкана Шивелуч на Камчатке, на одной из фумарол был обнаружен углекислый газ в высоких концентрациях.

В настоящее время работы по мобильному масс-спектрометру для вулканологии и геологии продолжаются, в частности ведется работа над модификацией прибора для работы на водных поверхностях вулканических озер.

Благодарности

Работа выполнена по государственному заданию Минобрнауки РФ № 075-01157-23-00.

Испытания прибора проводились в рамках государственного задания Института вулканологии и сейсмологии ДВО РАН «Геохимия продуктов современной вулканической и поствулканической деятельности» (FWME-2024-0013), утвержденного Минобрнауки России (тема № 124080600037-9).

Отдельная благодарность выражается Русскому географическому обществу за возможность участия в экспедиции «Восточный бастион — Курильская гряда 2025».

Литература

1. Кузьмин Ю. Д., Кузьмин А. Г. Масс-спектрометрический анализ состава газов на термальных площадках Камчатки в полевых условиях. // Труды III научно-технической конференции «Проблемы комплексного геофизического мониторинга Дальнего Востока России», г. Петропавловск-Камчатский, 9–15 октября 2011 г.. Обнинск: ГС РАН, 2011. С. 362–367

РАЗРАБОТКА И ТЕСТИРОВАНИЕ ПРОТОТИПА МИКРОКАПЕЛЬНОГО ХИМИЧЕСКОГО РЕАКТОРА, РАБОТАЮЩЕГО НА ОСНОВЕ МУЛЬТИКАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОРАСПЫЛЕНИЯ

Д. О. Кулешов^{1,*}, И. А. Громов^{1,2}, И. С. Воронов³, И. И. Пиковской³,
Д. М. Мазур⁴, Н. Р. Галль², А. Т. Лебедев⁴

* hellchemist@yandex.ru

¹ Институт аналитического приборостроения РАН, 198095,
Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А

² ФТИ им. А. Ф. Иоффе, 194021, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 26

³ Северный (Арктический) федеральный университет имени М. В. Ломоносова,
ЦКП НО «Арктика», 163002, г. Архангельск, ул. Северодвинская, 14

⁴ Химический факультет, Московский государственный университет
имени М. В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/3

Прогресс в области синтетической органической химии неразрывно связан с развитием новых методов химического синтеза. В настоящее время активно развивается новый метод химического синтеза, предполагающий проведение химических реакций в микро- и нанокapлях, в том числе и электрически заряженных. Показана высокая эффективность использования микрокапель для проведения в них химических реакций, что выражается в значительном ускорении химических реакций по сравнению с их протеканием в объеме раствора (в некоторых случаях до миллионов раз), а также в изменении характера протекания реакций, что делает возможным получение веществ, синтез которых при использовании имеющихся методов синтеза крайне затруднен [1]. Несмотря на уникальные возможности, которые дает использование микрокапель для проведения химических реакций, широкое внедрение данного подхода в практику, для задач органического синтеза, ограничено его низкой производительностью. Представляется, что оптимальным подходом к увеличению производительности микрокапельного синтеза является использование распылительных методов, позволяющих

генерировать электрически заряженные микрокапли. Наличие заряда у капли является значительным преимуществом указанных методов перед альтернативными методами генерации микрокапель, так как открывает широкие возможности для управления параметрами микрокапли, такими как время жизни, размер, величина заряда, траектория движения, что, соответственно, позволит управлять такими характеристиками химических реакций, как скорость и селективность. Использование данных методов позволяет увеличить производительность микрокапельного синтеза за счет увеличения количества распылительных капилляров, а также увеличения объема распыляемой жидкости в единицу времени через единственный капилляр. В целом необходимо отметить, что направление, предполагающее создание оборудования, на практике реализующего микрокапельный синтез (в условиях аэрозоля) и позволяющего производить необходимые химические вещества в количествах, достаточных для практического применения, только начинает развиваться. Для изучения возможности масштабирования микрокапельного химического синтеза нами был разработан и изготовлен прототип микрокапельного химического реактора (далее — прототип МХР) [2], в основе работы которого лежит проведение химических реакций в положительно и отрицательно заряженных микрокаплях, генерируемых при помощи мультикапиллярного электрораспыления / пневмораспыления. Работа прототипа МХР была протестирована на примере реакции конденсации фенилгидразина с карбонильными соединениями. С использованием устройства удалось достичь значительного ускорения исследуемых реакций относительно их протекания в объеме раствора (значения кажущегося фактора ускорения ААФ достигали десятков миллионов раз). Используемая в устройстве мультикапиллярная пневмоэлектрораспылительная система [3] позволяет достичь производительность на уровне единиц граммов / час. Представленная установка — прототип МХР найдет применение как в прикладных задачах химического синтеза, так и в фундаментальных исследованиях в области микрокапельного химического синтеза.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Фонда содействия инновациям (Договор 4732ГС1/79601 от 27.09.2022). Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП НО «Арктика».

Литература

1. Lebedev A. T. Ambient ionization mass spectrometry // Russian Chemical Reviews. 2015. Т. 84, № 7. Р. 665–692.
2. Kuleshov D. O., Gromov I. A., Pikovskoi I. I., Onuchina A. A., Voronov I. S., Mazur D. M., Lebedev A. T. Microdroplet chemical reactor prototype based on multiplexed electrospray // Reaction Chemistry & Engineering. 2024. Т. 9, № 10. Р. 2683–2690.
3. Громов И. А., Кулешов Д. О., Дьяченко А. А., Булович С. В., Васильев А. А. Гибридная мультикапиллярная пневмоэлектрораспылительная система для генерации заряженных микрокапель // Журнал технической физики. 2024. Т. 94, №9. С. 1532–1539.

ТЕХНОЛОГИИ КАПЕЛЬНОЙ МИКРОФЛЮИДИКИ ДЛЯ СЕКВЕНИРОВАНИЯ И СКРИНИНГА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

**А. С. Букатин^{1,2,3,*}, П. С. Плешаков¹, А. А. Тюшкевич¹, Д. А. Белоусова¹,
Н. А. Филатов^{1,3}
* info@flixbio.ru**

¹ СПбАУ РАН имени Ж. И. Алферова, 194021, Санкт-Петербург, ул. Хлопина, 8/3, лит. А

² Институт аналитического приборостроения РАН, 198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А

³ ООО «ФЛИКСБИО», 194021, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 6, стр. 1

Одним из трендов современного научного приборостроения является миниатюризация и автоматизация всех стадий химического синтеза и анализа биологических проб. Одним из векторов этого тренда является развитие микрофлюидных технологий, которые находят широкое применение в таких передовых областях, как прецизионный синтез микро- и наночастиц, разработка и скрининг фармацевтических соединений, создание высокочувствительных систем для диагностики заболеваний, анализ единичных клеток, а также разработка портативных систем для диагностики на месте (Point-of-Care Testing, РОСТ). Широкое внедрение этих технологий обусловлено их неоспоримыми преимуществами: возможностью точного контроля параметров процессов в микрообъеме, интеграция всех стадий анализа (от ввода пробы до детектирования) в едином устройстве (лаборатория-на-чипе) и работа с ультрамалыми объемами жидкостей (вплоть до пико- и аттолитров), что обеспечивает высокую эффективность и экономию реагентов.

Одним из направлений развития микрофлюидных технологий является «капельная» микрофлюидика. В ее основе лежит идея замены лабораторных пробирок и многоруночных планшетов на монодисперсные капли эмульсии типа «вода-в-масле» (В/М) или «во-

да-масло-вода» (В/М/В). Это используется при проведении высокопроизводительного скрининга лекарственных препаратов, секвенировании транскриптомов одиночных клеток, синтезе гидрогелевых микрочастиц и др. В рамках данной работы была создана микрофлюидная платформа на основе специализированного контроллера давления [1] для синтеза эмульсий типа «вода-в-масле» (В/М), «вода-масло-вода» (В/М/В), позволяющая формировать капли эмульсии диаметром 10–200 мкм и частотой до 800 капель в секунду. Синтез капель эмульсии происходит в микрофлюидных чипах с фокусировкой потока, изготовленных из полидиметилсилоксана (ПДМС, PDMS) по технологии «мягкая» литография, что обеспечивает стабильность и воспроизводимость результатов. Во время синтеза в капли можно упаковывать живые бактериальные и эукариотические клетки для последующего секвенирования, отбора или формирования 3D-культур (клеточных сфероидов). Кроме того, упаковка в капли эмульсии гидрогелевых преполимеров (альгинат, полиакриламид, ПЭГДА, агароза) позволяет формировать монодисперсные гидрогелевые микрочастицы с производительностью до 200 мкл/час по гидрогелю. Культивирование живых клеток СТ26 и HepG2 внутри альгинатных микрочастиц привело к образованию клеточных сфероидов с жизнеспособностью клеток >90 %, которые перспективны для использования в высокопроизводительном скрининге лекарственных препаратов.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-74-10117).

Литература

1. Filatov N. A. et al. Open-source pressure controller based on compact electro-pneumatic regulators for droplet microfluidics applications //IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement. 2022. T. 71. P. 1–10.

ПЕРВЫЙ ОТЕЧЕСТВЕННЫЙ ПРИБОР ДЛЯ МАССОВОГО ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДНК

«НАНОФОР СПС»

Я. И. Алексеев^{1,2}, А. И. Петров¹, И. В. Чубинский-Надеждин¹, В. С. Резник¹,
В. В. Никаноров¹, **А. А. Пушкин^{1,2,*}**, К. С. Вашенко^{1,2}, К. Е. Герасимов¹,
Д. А. Квон¹, А. В. Веретенников³, А. А. Воробьев⁴, В. А. Кудряшов¹,
А. А. Евстапов¹, В. Е. Курочкин¹

* anton.a.pushkin@gmail.ru

¹ Институт аналитического приборостроения РАН, 198095,
Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А

² НПФ Синтол, 127434, Москва, ул. Тимирязевская, 42, корп. Б

³ АО «Экспериментальный завод научного приборостроения со Специальным
конструкторским бюро Российской академии наук», 142432, Московская
область, городской округ Черноголовка, г. Черноголовка, проспект академика
Семенова, 9

⁴ ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, 141306, Московская область,
Сергиево-Посадский район, городок Сергиев Посад-6, Октябрьская ул., 11

Технологии секвенирования ДНК, или прочтения (расшифровки) последовательности нуклеотидов в молекуле, которая определяет свойства всех живых организмов.

В рамках выполнения Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2015–2020 годы)» Министерством здравоохранения Российской Федерации была поставлена задача по разработке отечественного аналога секвенатора ДНК MiSeq производства американской компании «Иллюмина». Коллектив исполнителей, представляющих организации консорциума Российских генетических технологий (ООО «НПФ Синтол», ИАП РАН и АО «ЭЗАН»), выполнял разработку и доработку платформы для массового параллельного секвенирования «НАНОФОР СПС» в течение 5 лет, с 2018 г.

Первые 3 прибора были выпущены и поставлены пользователям в конце 2023 — начале 2024 г. [1].

Принцип работы «НАНОФОР СПС» основан на секвенировании путем синтеза, состоящего из ряда последовательных этапов. На первом этапе молекулы предварительно денатурированной геномной библиотеки вводятся в канал микрофлюидной ячейки, к поверхности которой пришиты олигонуклеотиды, комплементарные последовательностям адаптеров геномной библиотеки. Гибридизованные молекулы геномной библиотеки подвергаются изотермической амплификации, формируя кластеры копий исходной молекулы на твердой подложке [2]. После линеаризации двухцепочечных молекул и гибридизации секвенирующего праймера происходит последовательное присоединение обратимо терминированных флуоресцентно меченых дезоксинуклеозидтрифосфатов А, Т, Г, Ц с этапом сканирования после каждого цикла встраивания по принципу комплементарности.

Для выполнения всех этапов полного цикла секвенирования прибор должен соответствовать ряду ключевых требований:

1. Детектировать сигналы флуоресценции 4 спектрально разнесенных красителей.

2. Обеспечивать точность позиционирования, равную 1 мкм, так как объект детекции — молекулярная колония имеет характерный размер 1 кв. мкм.

3. Обеспечивать заданную протоколом секвенирования последовательность смены реагентов через канал проточной ячейки при заданной температуре ячейки с заданной скоростью в течение заданного времени.

Соответствие указанным и ряду других требований реализовано в первом российском генетическом анализаторе для массового параллельного секвенирования «Нанофор СПС».

Комбинация этапов секвенирования позволяет получить последовательности длиной до 250 нуклеотидов (в одно- или парноконцевом режиме) до 15 миллионов кластеров с общим количеством данных около 7–8 мегабаз. Таким образом, производительности «Нанофора СПС» достаточно для расшифровки небольших геномов таких организмов, как вирусы, бактерии, грибы. Также получаемый объем данных позволяет проводить

	MiSeq	SPS
Количество чтений	29.028458 M	28.253974 M
Количество оснований	3.956668 G	3.910683 G
Q20	3.767017 G (95.206810%)	3.145519 G (80.433993%)
Q30	3.724392 G (94.129499%)	3.007064 G (76.893578%)
GC-контент	37.481295%	37.663898%

Рис. 1. Сравнение результатов запуска одной и той же библиотеки на приборах «Нанофор СПС» и MiSeq

таргетное секвенирование в рамках решения задач медицинской генетики.

Вторым важным показателем является качество получаемых данных, которое оценивается значением Phred score (Q). На рис. 1 приведено сравнение результатов парноконцевого прочтения одинаковых геномных библиотек для таргетного секвенирования панели из двух генов BRCA1 и BRCA2, ассоциированных с риском возникновения рака молочной железы и яичников, на приборах MiSeq и «Нанофор СПС». Приведенные данные, полученные в одном из запусков на секвенаторе «Нанофор СПС», уступают по качеству Q20 (1 ошибка на 100 нуклеотидов) на 15 % и по качеству Q30 (1 ошибка на 1000) на 17 % данным, полученным на секвенаторе MiSeq. В настоящее время продолжается работа над оптимизацией протокола секвенирования и состава реакционных смесей, реализующих принцип секвенирования путем синтеза на приборе «Нанофор СПС».

Качество и количество получаемых данных демонстрирует платформу «Нанофор СПС» как надежный инструмент для проведения рутинных исследований методом массового параллельного секвенирования для решения актуальных научных и клинических задач.

На конец 2025 г. компанией ООО «НПФ Синтол» выпущена малая серия из 15 «Нанофоров СПС», которые в настоящее время успешно работают в различных научно-исследовательских организациях России.

Литература

1. Ignateva D. A., Gorbunova T. Yu., Keita I., Alekseev Ya. I., Gorbunov R. V., Shvartsev A. A., Volkov A. A., Monakhova Yu. A., Tabunshchik V. A., Diakité S., Baldé A. M., Sow M. D., Diallo A. I. P. Bacterial composition of soils in the Fatala river basin (Guinea) during the dry season: an examination of its relationship with ecological landscape characteristics // South of Russia: Ecology, Development. 2024. Т. 19. № 4 (73). Р. 110–130.
2. Четверин А.Б., Четверина Е.В. 1995. Способ размножения нуклеиновых кислот, способ их экспрессии и среда для их осуществления. Патент РФ № 2048522

ОПЫТ ПЕРВОГО ПОЛЬЗОВАТЕЛЬСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ СЕКВЕНАТОРА «НАНОФОР СПС» В ИССЛЕДОВАНИИ МИКРОБИОМА ПОЧВ НАЦИОНАЛЬНЫХ ПАРКОВ ВЬЕТНАМА

Д. А. Игнатьева^{1,*}, М. С. Бабич^{1,2}, Я. И. Алексеев^{1,3}, Т. Ю. Горбунова¹,
Р. В. Горбунов¹, А. А. Пушкин⁴, А. А. Келип¹, Н. С. Гусар^{1,2}, А. С. Гушина⁵,
А. Н. Кузнецов⁶, С. П. Кузнецова⁶

* da_ignateva@ibss-ras.ru

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН», 299011, г. Севастополь, просп. Нахимова, 2

² ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет», 299053, г. Севастополь, ул. Университетская, 33

³ НПФ Синтол, 127434, Москва, ул. Тимирязевская, 42, корп. Б

⁴ Институт аналитического приборостроения РАН, 198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А

⁵ Национальный исследовательский университет ИТМО, 197101, Санкт-Петербург, ул. Саблинская, 14

⁶ Совместный Российско-Вьетнамский научно-исследовательский и технологический центр, Вьетнам, г. Ханой, ул. Нгуен Ван Хуен

Современным методом экологического мониторинга является массовое параллельное секвенирование (МПС). Стандартным подходом для оценки таксономического состава микробных сообществ служит таргетное секвенирование ампликонов гена 16S рРНК, позволяющее идентифицировать микроорганизмы до рода или вида. Наличие баз данных с референсными последовательностями 16S рРНК делает метод высокоинформативным и эффективным [1]. Результаты МПС позволяют оценивать биоразнообразие микроорганизмов, изучать влияние антропогенного воздействия на микробиоту и выявлять биоиндикаторы. Биоинформатические инструменты предоставляют возможность выдвигать гипотезы о метаболическом потенциале сообщества на основе его таксономического состава [2].

Российский рынок оборудования для МПС долгое время контролировался международными корпорациями. Высокая стоимость зарубежного оборудования, ограничения поставок под давлением санкций, сложности с оперативным сервисным обслуживанием создают препятствия для развития МПС в нашей стране. Разработка первого отечественного прибора для массового параллельного секвенирования «Нанофор СПС» (ООО «НПФ Синтол», Россия) является стратегическим шагом, способствующим обретению технологического суверенитета в этой критически важной области.

Целью работы является проведение первого независимого пользовательского тестирования «Нанофора СПС» в рамках реальной научной задачи по сравнительному анализу бактериальных сообществ почв национальных парков Бидуп-Нуйба, Бузямап и Йокдон и заповедника Контюранг (Вьетнам).

Отбор проб почвы проводился в 2022 г. на территории заповедника Контюранг (5 участков) и национального парка Бидуп-Нуйба (3 участка) и в 2023 г. на территории национальных парков Бузямап (3 участка) и Йокдон (3 участка) с транспортировкой образцов в 96 % этаноле. Тотальную ДНК экстрагировали с использованием набора «Почва-Экспресс» (ООО «НПФ Синтол», Россия). Библиотеки ампликонов переменных участков V3-V4 гена 16S рРНК готовили с применением набора «MetaGen-16sRNA» (ООО «НПФ Синтол», Россия). Высокопроизводительное секвенирование проводили на

платформе КАП МПС «Нанофор СПС» с использованием картриджа MiSeq Reagent Nano Kit v2 (500 циклов) (Illumina, Inc., США) в режиме парноконцевых чтений длиной 250 нуклеотидов. В картридж загружали 400 мкл пула библиотек (4 пМ) и 200 мкл библиотеки PhiX с загрузочной концентрацией 4 пМ.

Биоинформатический анализ включал демультиплексирование образцов, оценку качества секвенирования (FastQC и MultiQC), фильтрацию низкокачественных ридов (Trimmomatic). Для таксономической классификации применяли Kraken2 с базой данных SILVA138. Статистическую обработку выполняли в среде R (4.4.3).

Среднее качество сырых данных составило около Q35 на первых циклах и постепенно снижалось к концу запуска. На протяжении всех циклов качество большей части данных соответствовало уровню Q30, однако качество отдельных чтений снижалось до уровня Q25.

В ходе оценки альфа-разнообразия непараметрический анализ (критерий Крускала — Уоллиса) показал достоверные различия на уровне индекса Шеннона ($H = 18,1$, $p = 0,0004$). Наибольшие медианные значения индекса Шеннона были зарегистрированы в парках Бидуп-Нуйба (4,76) и Контюранг (4,63), что свидетельствует о более высоком и сбалансированном разнообразии микробиомов их почв по сравнению с парками Бузямап (4,40) и Йокдон (3,88).

Анализ бета-разнообразия, оценивающий различия в видовом составе между местообитаниями, не выявил статистически значимой кластеризации образцов по признаку принадлежности к национальному парку. Многомерный дисперсионный анализ (PERMANOVA) на основе дистанции Брея — Кертиса показал, что фактор «парк» объясняет лишь 6,1 % общей вариабельности состава сообществ ($R^2 = 0,061$, $p = 0,105$).

Таксономический анализ на уровне типов выявил сходное доминирующее ядро микробиома во всех исследуемых парках. На долю трех ведущих типов — *Proteobacteria* (19,6–24,5 %), *Actinobacteriota* (18,7–24,6 %) и *Acidobacteriota* (16,8–20,4 %) суммарно приходилось от 58 до 65 % общего обилия бактерий в каждом парке. Наблюдались и специфические черты, в парках Бидуп-Нуйба и Контюранг было отмечено максимальное относительное обилие *Proteobacteria* (24,5 %

и 23,5 % соответственно), в то время как в парке Бузямап доминировали *Actinobacteriota* (24,6 %), а в парке Йокдон — *Acidobacteriota* (20,4 %). На уровне семейств различия между парками стали более выраженными, в парках Бузямап и Йокдон наблюдалось доминирование семейства *Gemmataceae* (10,2 % и 10,5 % соответственно), в то время как в парках Бидуп-Нуйба и Контюранг его доля была существенно ниже. Для Бидуп-Нуйба характерно повышение обилия *Solirubrobacteraceae* (3,6 %), а для Контюранга — *Gemmatimonadaceae* (3,7 %). На уровне рода картина микробного сообщества оказалась наиболее специфичной для каждого парка.

Проведенное исследование с использованием прибора «Нанофор СПС» позволило комплексно охарактеризовать почвенный микробиом ряда национальных парков Вьетнама. Показано, что парки Бидуп-Нуйба и Контюранг характеризуются статистически значимым повышением уровня альфа-разнообразия. Ключевые различия проявляются на уровне конкретных родов, что указывает на потенциальные таксоны-биоиндикаторы.

Благодарности

Работа выполнена в рамках темы Э-1.3 «Изучение особенностей функционирования и динамики ландшафтов Центрального и Южного Вьетнама в условиях антропогенной нагрузки и изменения климата для создания научных основ их рационального использования» Совместного Российско-Вьетнамского тропического научно-исследовательского и технологического центра и государственного задания ФИЦ ИнБЮМ «Изучение особенностей функционирования и динамики субтропических и тропических прибрежных экосистем в условиях изменения климата и антропогенной нагрузки с использованием методов дистанционных исследований, технологий облачной обработки информации и машинного обучения для создания научных основ их рационального использования», регистрационный номер: 124030100030-0. Работа выполнена на базе научно-образовательного центра коллективного пользования «Филогеномика и транскриптомика» (ФИЦ ИнБЮМ).

Литература

1. Regueira-Iglesias A., Balsa-Castro C., Blanco-Pintos T., Tomás I. Critical review of 16S rRNA gene sequencing workflow in microbiome studies: From primer selection to advanced data analysis // *Molecular Oral Microbiology*. 2023. Т. 38, № 5. P. 347–399.
2. Case R. J., Boucher Y., Dahllöf I., Holmström C., Doolittle W. F., Kjelleberg S. Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies // *Applied and environmental microbiology*. 2007. Т. 73, № 1. P. 278–288.

МЕТОДИКА ОЦЕНКИ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ДЕТЕКТОРОВ ЛАЗЕР-ИНДУЦИРОВАННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ КАПИЛЛЯРНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ АНАЛИЗАТОРОВ

П. А. Козлова^{1, 2, *}, Я. И. Алексеев^{1, 2}, Д. О. Новиков³,
И. В. Чубинский-Надеждин², Ю. В. Куликов², В. Е. Курочкин²
* opolynka@yandex.ru

¹ НПФ Синтол, 127434, Москва, ул. Тимирязевская, 42, корп. Б

² Институт аналитического приборостроения РАН, 198095,
Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А

³ МГТУ имени Н. Э. Баумана, 105005, Москва, 2-я Бауманская ул., 5, стр. 1

В настоящее время приборы капиллярного гель-электрофореза с детекцией лазер-индуцированной флуоресценции (ЛИФ) широко используются для расшифровки последовательности ДНК по методу Сенгера, а также для анализа длин фрагментов ДНК, полученных различными методами, прежде всего методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). На рынке постоянно появляются новые модели генетических анализаторов, однако производители не указывают важную техническую характеристику прибора — аналитическую чувствительность детекции.

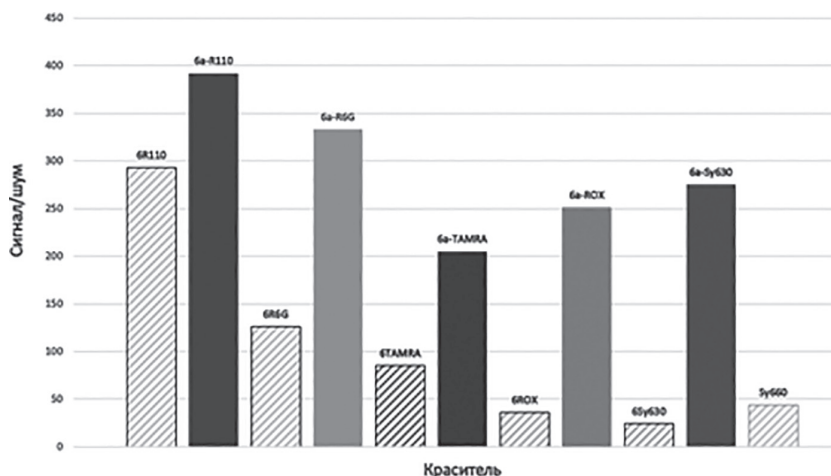


Рис. 1. Результаты измерения соотношения сигнал/шум для генетического анализатора «Нанофор 05» с использованием растворов одиночных и двойных красителей в концентрации 1 нМ

В работе проведена экспериментальная оценка значений аналитической чувствительности измерения сигналов флуоресценции для отечественных капиллярных генетических анализаторов «Нанофор 05». Оценка проведена для шести спектральных диапазонов, соответствующих флуоресценции наиболее распространенных в практике генетических исследований одиночных (6R110, 6R6G, 6TAMRA, 6ROX, 6Sy630, Sy660) и двойных (6a-R110, 6a-R6G, 6a-TAMRA, 6a-ROX, 6a-Sy630) красителей, входящих в состав синтетических олигонуклеотидов (далее — красители). Полученные данные могут быть полезными для исследователей при планировании экспериментов, в которых необходимо выявлять одновременно несколько мишеней с разной концентрацией в анализируемом образце, меченых различными флуоресцентными красителями.

В первой части работы проводился эксперимент по измерению значений фона, шума и сигнала флуоресценции от одиночных и двойных красителей на генетическом анализаторе «Нанофор 05» (ИАП РАН, Россия) при прямой закачке (ПЗ) в капилляры,

Таблица 1. Соотношение значений сигнал/шум для двойных и одиночных флуоресцентных красителей

Красители	6a-R110 vs 6R110	6a-R6G vs 6R6G	6a-TAMRA vs 6TAMRA	6a-ROX vs 6ROX	6a-Sy630 vs 6Sy630
Соотношение	1,34	2,64	2,41	6,97	11,46

Таблица 2. Значения концентраций растворов красителей, необходимых для достижения одинаковых значений сигнал/шум при прямой закачке и при электрокинетической инъекции

Краситель	6a-R110	6a-R6G	6a-TAMRA	6a-ROX	6a-Sy630	Sy660
Сигнал/шум	392	333	205	251	275	44
Концентрация ПЗ, нМ	1	1	1	1	1	1
Концентрация ЭКИ, пМ	4,5	4,0	7,4	4,4	4,9	8,9

Таблица 3. Средние значения аналитической чувствительности приборов, концентраций растворов красителей и стандартных отклонений при использовании калибратора

Красители	6a-R110	6a-R6G	6a-TAMRA	6a-ROX	6a-Sy630	Sy660
Сигнал/шум	773	871	740	759	1098	1056
Среднее значение концентрации, пМ	8,9	10,4	26,7	13,4	19,7	215,9
СКО, пМ	2,9	2,8	7,6	3,0	4,6	62,8
Сигнал/шум, рассчитанный для концентрации 1 пМ	86,7	83,5	27,8	56,8	55,9	4,9

заполненные 1 ТЕ буфером pH 8,0, растворов красителей с известными концентрациями. Измеряли значения сигналов фона буфера без красителя, а затем регистрировались значения сигнала и шума для каждого красителя при определенной концентрации. Рассчитанные средние значения аналитической чувствительности (соотношение сигнал/шум) приборов для шести одиночных и пяти двойных красителей в концентрации 1 нМ представлены на рис. 1.

В табл. 1 представлены соотношения сигнал/шум для пяти пар двойной/одиночный флуоресцентный краситель.

Во второй части работы проводился эксперимент по измерению соотношений сигнал/шум по шести каналам при электрокинетической инъекции (ЭКИ) растворов синтетических олигонуклеотидов, содержащих двойные и один одиночный краситель на 5'-конце. По результатам экспериментов были рассчитаны концентрации красителей, которые требуются для достижения таких же значений сигнал/шум в максимуме пика детектируемого фрагмента флуоресцентно-меченого олигонуклеотида, как и при прямой закачке раствора того же красителя в капилляры. Было показано, что для достижения одинаковых значений сигнала флуоресценции при ЭКИ и ПЗ, для ЭКИ требуется существенно меньшая исходная концентрация флуоресцентно-меченого олигонуклеотида в образце, что может быть объяснено концентрированием молекул олигонуклеотида на входе в капилляр в процессе ЭКИ (табл. 2).

В третьей части работы проводился эксперимент по измерению значений сигнал/шум по шести каналам детекции для спектрального калибратора, содержащего двойные красители на шести генетических анализаторах «Нанофор 05». По результатам эксперимента были рассчитаны средние значения аналитической чувствительности приборов, концентраций растворов красителей и стандартных отклонений значений концентраций растворов красителей (табл. 3).

По итогам проведенной работы были рассчитаны значения аналитической чувствительности (сигнал/шум) детекторов на шести спектральных каналах для генетических анализаторов «Нанофор 05» с использованием растворов одиночных и двойных красителей. Показано, что использование двойных красителей позволяет добиться

более высокого значения аналитической чувствительности, а также установлено, что для достижения одинакового значения сигнал/шум при электрокинетической инъекции требуется существенно меньшая концентрация раствора красителя, чем при прямой закачке раствора красителя в капилляры.

РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ ИМПЕДИМЕТРИЧЕСКОГО ИММУНОСЕНСОРА НА ОСНОВЕ ВОССТАНОВЛЕННОГО ОКСИДА ГРАФЕНА

Е. И. Елифанова^{1,*}, Ю. В. Чебуркин^{1,2}, А. А. Рябко^{1,3}, Н. О. Ситков^{1,2}
* lizbon767@mail.ru

¹ Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В. И. Ульянова (Ленина), 197376, Санкт-Петербург, Инструментальная, 2

² Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2

³ ФТИ им. А. Ф. Иоффе, 194021, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 26

Фактор роста фибробластов 21 (FGF21) представляет собой перспективный инструмент белковой терапии, обладающий потенциалом для лечения метаболических нарушений, в том числе связанных с сахарным диабетом и ожирением. Разработка оптимальных методов его обнаружения и исследований открывает широкие возможности работы с ним и его антителами для дальнейших терапевтических применений.

Разработка и создание импедиметрического иммуносенсора включали проектирование топологии структуры гребенчатых электродов. Чипы были реализованы при помощи фотолитографии и представляют собой встречно-штыревые электроды из слоя нихрома на стеклянной подложке.

Восстановленный оксид графена был получен двумя разными методами. Первый метод включал добавление к водной дисперсии оксида графена раствора гидразина и аммиака с последующей обработкой ультразвуком и нагреванием на водной бане. Второй способ представлял собой модификацию метода химического восстановления при помощи сонирования с добавлением этилового спирта, SDS буфера и NaBH_4 , а также трех циклов центрифугирования и последующего удаления надосадочной жидкости [1]. В ходе отработки данного метода было предложено заменить этиловый спирт на изопропиловый, что дало наиболее оптимальное по стойкости покрытие электродов. На основе анализа поверхности нанесенных пленок восстановленного оксида графена на кремниевые подложки при помощи АСМ и СЭМ, способ с изопропанолом показал наиболее однородное покрытие, в связи с чем он был выбран для дальнейших исследований по созданию иммуносенсора.

Перед нанесение полученные растворы диспергировали с помощью ультразвука в ванне в течение 3 минут. На электроды, после предварительной обработки коронным разрядом, капельным путем

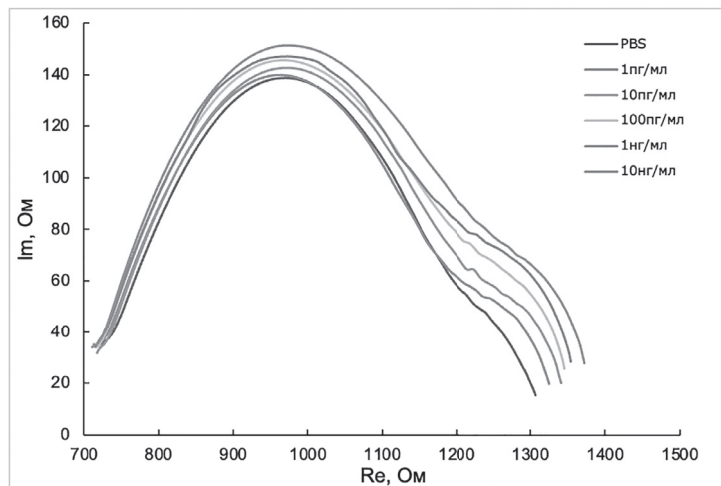


Рис. 1. Концентрационные зависимости комплекса связывания FGF21 с очищенным антителом

наносили APTMS [2], а после просушивания — восстановленный оксид графена. Сушка полученных структур проводилась в сушильной печи при 60 °C в течение 3 часов. Поверхность иммуносенсора была модифицирована белком А, с помощью которого на электроды иммобилизовывали антитела к белку FGF21. Рабочий раствор для иммобилизации антител представлял собой натрий-фосфатный буфер (PBS) с добавлением 10 мг антител и 0,4 мг бычьего сывороточного альбумина для блокировки неспецифичных сайтов связывания. Промывка чипа осуществлялась последовательно при помощи двух буферов: PBS и PBS-T (PBS с 0,05 % Tween-20). Измерения импеданса производились на потенциостате-гальваностате PS-50.

На начальном этапе исследования была предпринята попытка иммобилизовать на сенсор антитела, находящиеся непосредственно в сыворотке крови, в которой содержатся еще и другие белки, в том числе альбумин. На семействе кривых наблюдалось достаточно слабое изменение импедансного отклика и только в области низких частот. Измерения на меньших концентрациях несли несистематический характер во всем частотном диапазоне, что не позволило охватить клинический диапазон концентраций анализируемого маркера. Это говорит о наличии неспецифичных артефактов, заполняющих пространство биосенсорной структуры и не позволяющих обнаружить целевой белок в необходимом диагностическом диапазоне.

Далее проводились измерения на очищенных антителах, результаты измерений приведены на рис. 1.

В области высоких частот зависимость определяется свойствами пленки rGO, эта часть достаточно слабо зависит от концентрации целевого белка FGF21. В низкочастотном диапазоне доминирует сопротивление переноса заряда на биораспознающем слое. Таким образом, основное изменение импеданса при связывании белка FGF21 на электродах биосенсора обусловлено ростом сопротивления переноса заряда на биораспознающем слое, что нашло отражение на концентрационной зависимости.

В заключение проводилось исследование сенсора на взаимодействие с неспецифичным белком хемотрипсиногеном. Зависимость не демонстрировала явной картины концентрационных изменений,

что, в свою очередь, свидетельствует о селективности разработанной биосенсорной системы. Это связано с предварительной блокировкой возможных неспецифичных сайтов при помощи BSA.

Литература

1. G. C. Zaccariotto, M. K. L. Silva, G. S. Rocha, I. Cesarino A Novel Method for the Detection of SARS-CoV-2 Based on Graphene-Impedimetric Immunosensor // Materials 2021, 14(15), 4230.
2. S. Tanislass, M. K. Md Arshad, S. C. B. Gopinath, M. F. M. Fathil, C. Ibaui, P. Anbu. Impedimetric cardiac biomarker determination in serum mediated by epoxy and hydroxyl of reduced graphene oxide on gold array microelectrodes // Microchim Acta 188, 257 (2021).

ИССЛЕДОВАНИЕ СОРБЦИИ И ДЕСОРБЦИИ $[^{14}\text{C}]\text{CO}_2$ НА РОССИЙСКИХ ЦЕОЛИТАХ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В СИНТЕЗЕ $[^{14}\text{C}]$ МЕТИОНИНА

М. А. Хромеева*, Д. Д. Ваулина, О. Ф. Кузнецова, В. В. Орловская
hromeeva2@mail.ru

*Лаборатория радиохимии, Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой
РАН, 197022, Санкт-Петербург, ул. академика Павлова, 9*

Позитронная эмиссионная томография (ПЭТ) — передовой метод ядерной медицины, позволяющий визуализировать биохимические процессы, происходящие в организме человека *in vivo*, с помощью радиофармацевтических лекарственных препаратов (РФЛП), в состав которых входят короткоживущие радионуклиды с позитронным типом распада. В отличие от КТ или МРТ, показывающих анатомию, ПЭТ демонстрирует именно функцию тканей, что особенно важно в онкологии. Важнейшим РФЛП в диагностике церебральных гли-

ом является L-[^{11}C -метил]метионин, меченный углеродом-11 ($T_{1/2} = 20,4$ мин). В ИМЧ РАН синтез этого РФЛП проводят из [^{11}C]CO₂, получаемого в газовой мишени циклотрона ($^{14}\text{N}(p,\alpha) ^{11}\text{C}$). Методом выделения и концентрирования [^{11}C]CO₂ из облученной смеси газов (99 % N₂ + 1 % O₂) является конденсация на петлеобразной ловушке — технологически сложный процесс, требующий применения жидкого азота, что усложняет синтез РФЛП. Кроме того, данный процесс сопровождается потерей значительной части активности ≥ 30 %. Разработка и внедрение альтернативных, более простых в реализации методов, в частности, использование молекулярных сит (цеолитов), является актуальной задачей, направленной на повышение доступности РФЛП на основе углерода-11.

Целью работы являлась экспериментальная оценка применимости российского цеолита для улавливания [^{11}C]CO₂ путем определения эффективности сорбции и десорбции при температурных режимах, таких как 300, 350 и 400 °C, с учетом радиоактивного распада.

В работе апробировался образец цеолита NaA (завод молекулярных сит «РеалСорб») в качестве сорбента. Эксперименты проводились на автоматизированном модуле синтеза GE TRACERlab FX N Pro. Облученный газ, полученной в результате облучения циклотронной мишени, с [^{11}C]CO₂ с активностью (620–680) мКи пропускали через колонку с цеолитом (0,73 грамма, 60–120 mesh) при комнатной температуре. Эффективность сорбции оценивали по величине проскака [^{11}C]CO₂, улавливаемого на колонке, заполненной аскаритом, и измеряли с помощью изотопного калибратора. Последующую десорбцию проводили при температурах 300–400 °C.

По экспериментальным результатам установлено, что исследуемый цеолит при комнатной температуре сорбирует [^{11}C]CO₂ с проскоком (0,3–4,8) %. Выяснена зависимость процента высвобождения активности [^{11}C]CO₂ от температуры десорбции. Нагрев при 300, 350 и 400 °C в течение 3 минут обеспечивал 48, 75 и 79 % десорбции соответственно, с учетом поправки на радиоактивный распад.

Выводы. Метод выделения [^{11}C]CO₂ из облученного газа на исследуемых молекулярных ситах является эффективной альтернативой конденсации на петлеобразной ловушке. Температура десорбции

350–400 °С является оптимальной для эффективного высвобождения $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$. Внедрение метода сорбции на молекулярных ситах позволит упростить синтез и снизить расходы на производство РФЛП за счет отказа от использования жидкого азота.

Благодарности

Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ, тема номер FMMW-2025-0010.

ПРИМЕНЕНИЕ СИНХРОННОГО НАКОПЛЕНИЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА ПО МЕТОДУ ЭЛЕКТРОКАРДИОГРАФИИ СВЕРХВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

Д. О. Шевяков*

sevakovdaniil@gmail.com

*Институт аналитического приборостроения РАН, 198095,
Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А*

В настоящее время общепринятым методом исследования активности сердца является применение стандартной электрокардиографии. Последние исследования показывают, что данный метод не способен регистрировать диагностически важные компоненты сердечной активности, которые имеют низкую амплитуду и высокую частоту. Это связано с принятыми в медицинской практике частотными и амплитудными диапазонами регистрации электрокардиосигналов (ЭКС). Для регистрации этих низкоамплитудных и высокочастотных составляющих ЭКС — микропотенциалов используется новый высокоэффективный авторский метод — электрокардиография сверхвысокого разрешения (ЭКГ СВР), который разрабатывается в лаборатории «Радио- и оптоэлектронные при-

боры ранней диагностики патологий человека» под руководством д. т. н., проф. К. В. Зайченко [1].

Апробация метода проходит совместно с Институтом экспериментальной медицины НМИЦ им. В. А. Алмазова, в котором проводится серия экспериментов по моделированию острой ишемии миокарда на мелких подопытных животных. Во время проведения экспериментов происходит регистрация и запись электросигналов сверхвысокого разрешения (ЭКС СВР) [2]. Следует отметить, что в основу устройства регистрации ЭКС СВР заложена многоканальная обработка и регистрация ЭКГ СВР. Для этого каждое из трех регистрируемых отведений разделяется на два параллельных канала: низкочастотный (НЧ), соответствующий классической ЭКГ, и высокочастотный (ВЧ), содержащий микропотенциалы. Такой подход позволяет, при необходимости, проводить независимую обработку разных составляющих ЭКС СВР. Результаты обработки полученных во время проведения экспериментов записей демонстрируют возможность обнаружение острой ишемии миокарда на более ранних стадиях, по сравнению со стандартной ЭКГ [3].

Одной из самых актуальных и важных на сегодняшний день задач вторичной цифровой обработки биоэлектрических сигналов является проведение полного и точного морфологического анализа тонкой структуры регистрируемых ЭКС СВР. Синхронный анализ позволяет определять и изучать различные статистические и морфологические характеристики биоэлектрических сигналов на разных временных участках записи, соответствующих разным физическим состояниям биологического объекта.

Возможность проведения независимой обработки ВЧ- и НЧ-каналов позволяет использовать различные подходы для обработки каждого из каналов. В первую очередь на НЧ-канале производится поиск путей деформации для масштабирования кардиоциклов. Применение этих путей деформации для кардиоциклов из ВЧ-канала позволяет провести синхронизацию, а затем синхронное накопление независимо для каждого из каналов. Полученный в результате синхронного накопления НЧ-кардиоцикл демонстрирует морфологические признаки, типичные для определенного состояния

биологического объекта. ВЧ-кардиоцикл, в свою очередь, не имеет определенных морфологических признаков, однако его можно использовать для дальнейшего спектрального анализа. Расчет спектров кардиоциклов, полученных в результате проведения синхронного накопления на участках сигнала, соответствующих разным состояниям биологического объекта, демонстрирует наличие частотных областей, наиболее явно изменяющихся при изменении состояния биологического объекта.

Использование метода синхронного накопления на всем протяжении кардиоцикла позволяет существенно улучшить показательность метода ранней диагностики острой ишемии по методу ЭКГ СВР. Расчет спектральной плотности мощности только на тех частотных диапазонах, которые демонстрируют наиболее показательное падение, позволяет увеличить разницу между рассчитанной спектральной плотностью мощности во время стабилизации и ишемии.

На рис. 1 показаны спектры ЭКС на разных стадиях эксперимента, полученные без использования синхронного накопления (а) и с его использованием (б). Хорошо заметен шумоподавляющий эффект синхронного накопления. Кроме того, становятся различимы частотные диапазоны наибольших изменений в сигнале. В то время как вычисление разницы между спектральной плотностью мощности во время стабилизации и ишемии на всем диапазоне спектра показывает падение порядка 30 %, такой же расчет в областях, показывающих наибольшее падение, демонстрирует разницу порядка 60 %.

Применение синхронного накопления на всем протяжении кардиоцикла к участкам сигнала, соответствующим разным физическим

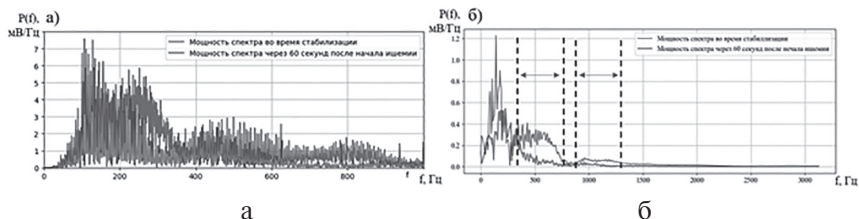


Рис. 1. Сравнение расчета разности спектральной плотности мощности без синхронного накопления (а) и с ним (б)

состояниям биологического объекта, с последующим выделением частотных областей с наибольшим падением позволяет повысить показательность ранней диагностики острой ишемии по методу ЭКГ СВР. Следует отметить, что частотные диапазоны с наиболее явным падением мощности отличаются на разных записях и зависят от исследуемого биологического объекта. Дальнейшее развитие метода позволит улучшить показательность диагностически важных маркеров наличия сердечных патологий.

Литература

1. Zaichenko K. V., Kordyukova A. A., Logachev E. P., Luchkova M. N. Medical aspects of the signal processing radar methods application in ultra-high resolution electrocardiography realization // Medical engineering. 2021. Vol. 1. P. 21–24.
2. Zaichenko K. V., Gurevich B. S., Zhmyleva A. A., Knyazev A. A., Logachev E. P. A method for electrocardiographic investigations in experiments creating artificial ischemia in experimental animals // Biomedical Engineering, vol. 4, p. 249–253.
3. Zaichenko K. V., Kordyukova A. A., Sonin D. L., Galagudza M. M. Ultra-High-Resolution Electrocardiography Enables Earlier Detection of Transmural and Subendocardial Myocardial Ischemia Compared to Conventional Electrocardiography. *Diagnostics*. 2023. 13(17):2795. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13172795>

ОСОБЕННОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БЕЛКОВ ЭФФЕКТОРОВ CAS12A ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРИЛОЖЕНИЙ

Т. А. Заир-Бек, А. А. Алексеев, М. А. Ходорковский, А. Н. Арсениев*

* arsenievanatoly@gmail.com

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29

Системы CRISPR-Cas, изначально представляющие собой адаптивные защитные ситемы прокариот, в настоящее время выступают в качестве мощного инструмента для развития современных биотехнологий и медицины. Центральное место в этом занимает свойство нуклеаз Cas осуществлять направленное расщепление нуклеиновых кислот, программируемое посредством гидовых РНК [1]. Помимо приложений в редактировании генома, для эффекторов таких систем, как Cas12a и Cas13 и др., была описана побочная (коллатеральная) активность [2, 3]. Данная активность индуцируется после специфического узнавания и разрезания целевой ДНК и проявляется в неспецифическом расщеплении одноцепочечных молекул ДНК. Такая функциональная особенность белков-эффекторов Cas легла в основу создания новых диагностических платформ для детекции специфических последовательностей ДНК/РНК патогенных организмов, а также для анализа их антибиотикорезистентности [4].

Комбинирование «CRISPR-детекции» с методами изотермической амплификации позволяет создавать диагностические системы, обладающие значительным потенциалом для применения как в клинической практике, так и в полевых условиях. Важным преимуществом таких платформ является их независимость от сложного и дорогостоящего оборудования, а также высокая скорость анализа, составляющая 20–30 минут [5].

Ключевым аспектом при разработке надежных диагностических систем на основе Cas12a является минимизация ложноположительных результатов, что, в свою очередь, требует глубокого понимания молекулярных основ функционирования эффекторных комплексов.

Целью работы являлось определение особенностей детекции нуклеиновых кислот с использованием различных ортологов Cas12a и исследование их взаимодействия с флуоресцентными репортерными зондами. Для изучения коллатеральной активности применяли одноцепочечные ДНК-зонды, меченные флуорофорами FAM и ROX (FAM-8, ROX-8, ROX-12). Цифрами обозначена длина последовательности между гасителем и флуорофором.

В результате исследования установлено, что кинетика коллатерального расщепления зондов существенно зависит как от специфичности мишени, так и от типа используемого зонда. Показано, что скорость накопления флуоресцентного сигнала при использовании зонда FAM-8 на 50–100 % превышает аналогичный показатель для зонда ROX-8. При этом зонды ROX-12 демонстрировали более высокую скорость расщепления по сравнению с ROX-8. Кроме того, выявлены эффекты неспецифического связывания зонда ROX-12 с эффекторным комплексом AsCas12a, способные приводить к артефактам и некорректной интерпретации диагностических результатов. Важно отметить, что для ортолога ScCas12a подобные неспецифические взаимодействия были минимальными.

Полученные данные вносят существенный вклад в оптимизацию диагностических систем на основе нуклеаз Cas12a, определяя критически важные параметры выбора эффекторного белка и дизайна репортерных зондов для достижения максимальной чувствительности и специфичности детекции.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания Минобрнауки РФ (№FSEG-2023-0014).

Литература

1. Jinek M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity // Science. 2012. Т. 337, № 6096. Р. 816–821.
2. Chen J.S. et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity // Science. 2018. Т. 360, № 6387. Р. 436–439.

3. Gootenberg J.S. и др. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2 // Science. 2017. Т. 356, № 6336. С. 438–442.
4. Kellner M.J. и др. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases // Nat Protoc. 2019. Т. 14, № 10. С. 2986–3012.
5. Mao X. et al. Advancements in the synergy of isothermal amplification and CRISPR-cas technologies for pathogen detection // Front Bioeng Biotechnol. 2023. Т. 11. P. 1273988.

БЕСКАПЕЛЬНОЕ ЭЛЕКТРОРАСПЫЛЕНИЕ МОРФИНА С МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

С. К. Ильюшонок*, Е. П. Подольская
ilushonoksem@gmail.com

*Институт аналитического приборостроения РАН, 198095,
Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А*

Приложение высокого напряжения к жидкости, протекающей через капилляр, вызывает формирование жидкостного мениска на торце капилляра и образование мелкодисперсного распыла заряженных капель. По мере испарения растворителя полярные молекулы, находящиеся в жидкости, подвергаются ионизации и переходят в газовую фазу. Этот процесс, известный как электрораспылительная ионизация (ESI), является одним из ведущих методов ионизации в масс-спектрометрии, позволяющим исследовать широкий спектр соединений — от низкомолекулярных веществ до макромолекул и наночастиц. При этом метод ESI не останавливается в своем развитии, и по сей день публикуется множество работ по развитию и оптимизации данного метода мягкой ионизации [1, 2]. Однако одним из основных недостатков традиционного метода является формирование крупных капель при выходе на стабильный режим распыления или в процессе его настройки, что приводит к осаждению нелетучих

компонентов из неиспарившихся капель и требует периодической очистки элементов транспортной системы.

В течение последних десяти лет в ИАП РАН были проведены исследования [3, 4], в результате которых была разработана установка [5] для микродисперсного электрораспыления (МЭР) твердых частиц на ЛДИ-мишень (ЛДИ — лазерная десорбция/ионизация) в бескапельном режиме с динамическим делением потока жидкости при атмосферном давлении. Данная установка позволяет эффективно модифицировать поверхность ЛДИ-мишени для металл-аффинной хроматографии благодаря равномерному и стабильному напылению частиц на поверхность. Позднее для этих же целей установка была модернизирована [6], став более компактной и удобной в применении, а также модифицированная установка позволила реализовать микродисперсное электрораспыление в отрицательной моде [7].

Разница между МЭР и стандартными режимами электрораспыления заключается в способе формирования жидкостного мениска, за счет чего в режиме МЭР не образуются крупные капли растворителя. Также важным достоинством МЭР является возможность получения стабильного потока ионов для высококонцентрированных солевых растворов и сильнопроводящих растворов (до 2 % трифторуксусной кислоты) при нормальных условиях. Однако на сегодняшний день микродисперсное электрораспыление применялось преимущественно в рамках задач ПАЛДИ/МАЛДИ масс-спектрометрии.

В рамках данной работы проводилось тестирование узла микродисперсного электрораспыления с использованием времяпролетного масс-спектрометра MX5310 для анализа низкомолекулярных соединений на примере морфина. Источник ионов МЭР был ориентирован вертикально и перпендикулярно оси газодинамического времяпролетного масс-спектрометра. Для проведения данного исследования использовали раствор 50 %-го водного метанола с добавлением 0,1 % муравьиной кислоты и концентрацией морфина 10^{-6} М. Для создания устойчивого мениска распыления были заданы следующие параметры: напряжение капилляра 4,7 кВ, расстояние от торца капилляра до входа в масс-спектрометр 16 мм, игла выступала на 0,7 мм из корпуса, скорость потока раствора составляла 25 мкл/мин,

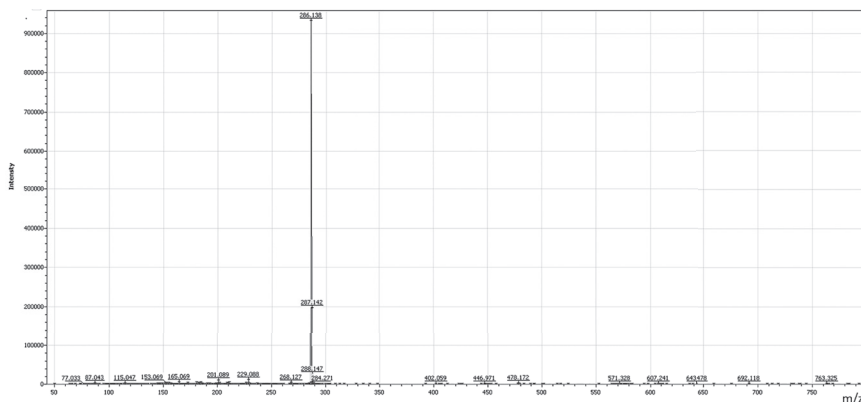


Рис. 1. Масс-спектр морфина, 10^{-6} М, скорость потока 50 мкл/мин
 скорость откачки парогазовой смеси регулировалась при помощи источника постоянного тока в диапазоне 0–12 В. В ходе микродисперсного электрораспыления раствора было установлено, что при указанных параметрах удалось добиться стабильного и высокоинтенсивного сигнала морфина m/z 286.14 (рис. 1).

По результатам данной работы была продемонстрирована возможность применения установки микродисперсного электрораспыления (МЭР) в качестве источника ионизации для анализа низкомолекулярных соединений на примере морфина. Результаты исследования позволяют говорить о перспективности источника ионов микродисперсного электрораспыления для задач масс-спектрометрии и возможности его использования для дальнейшего изучения различных низкомолекулярных соединений, что открывает перспективы для применения микродисперсного распыления в задачах аналитической химии.

Литература

1. Gan Y., Jiang Z., Li H., Luo Y., Chen X., Sh, Y., Yan Y. A comparative study on droplet characteristics and specific charge of ethanol in two small-scale electrospray systems // Scientific reports. 2019. Т. 9. № 1. P. 18791.

2. Morad M. R., Rajabi A., Razavi M., Sereshkeh S.P. A very stable high throughput Taylor cone-jet in electrohydrodynamics //Scientific reports. 2016. Т. 6. № 1. С. 38509.
3. Krasnov N. V., Muradymov M. Z., Samokish V. A. Electrospray ion source with a dynamic liquid flow splitter. Rapid Commun. in Mass Spectrometry, 2013. vol. 27, no. 8. P. 904–908. Doi: <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.6524>
4. Аль-Тавил Е. А., Мурадымов М. З., Краснов Н. В., Краснов М. Н. Электрораспыление проводящего раствора при нормальных условиях в широком диапазоне объемных скоростей // Научное приборостроение. 2017. Т. 27. № 2. С. 3–12.
5. Ильюшонок С. К., Гладчук А. С., Арсеньев А. Н., Томилин Н. В., Краснов М. Н., Подольская Е. П., Краснов Н. В. Простейший комплект оборудования для нанесения наночастиц оксидов металлов на МАЛДИ-мишень при бескапельном электрораспылении в нормальных условиях // Научное приборостроение. 2023. Т. 33. № 3. С. 27–36.
6. Ильюшонок С. К., Арсеньев А. Н., Мурадымов М. З., Зорин И. М., Селютин А. А., Хасин Ю. И., Краснов Н. В., Подольская Е. П. Модернизированная лабораторная установка для нанесения наночастиц оксидов металлов на металлическую подложку при бескапельном режиме электрораспыления с динамическим делением потока жидкости при атмосферном давлении // Письма в ЖТФ. 2024. Т. 50. № 19. С. 51–54.
7. Ильюшонок С. К., Мурадымов М. З., Жуков М. В., Столоногова С. И., Розе К. А., Арсеньев А. Н., Подольская Е. П. Микродисперсный режим электрораспыления в отрицательной моде как способ нанесения образца на ЛДИ-мишень // Научное приборостроение. 2024. Т. 34. № 4. С. 16–22.

МИНИ ЭЛЕКТРОННО-ОПТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА НА ОСНОВЕ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОЙ ЛИНЗЫ

С. О. Вересов^{1,*}, О. М. Горбенко², А. О. Голубок^{1,2}

* ferdinand0007@yandex.ru

¹ СПбАУ РАН им. Ж. И. Алферова, 194021, Санкт-Петербург, ул. Хлопина, 8/3, лит. А

² Институт аналитического приборостроения РАН, 198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А

В докладе представлены результаты расчета фокусирующей системы на основе электростатической микроколонны (МК) и обсуждаются возможные технологии ее изготовления. Электростатические низковольтные МК — отдельная ветвь в семействе электронных микроскопов (ЭМ), начавшая развиваться с 80-х гг. XX ст. [1–3]. Эти устройства обладают целым рядом преимуществ в сравнении с традиционными ЭМ: миниатюрность, простота и относительно небольшая стоимость изготовления, а также высокий контраст изображения. МК можно разделить на 2 группы — с использованием объективных линз [4] и без них [5–7]. Второй вариант имеет преимущество в том, что облегчается технология изготовления, юстировки и управления пучком в отклоняющей системе. Источником электронов в электростатических МК обычно является холодный полевой эмиттер или термополевой эмиттер Шоттки, обладающие малым размером виртуального источника (4–8 нм) и высокой яркостью. Структура МК (рис. 1, а) минимизирована в целях упрощения технологии изготовления и состоит из эмиттера и двух электростатических линз — экстрактора и фокусирующей линзы. Моделирование предложенной МК проводилось в пакетах COMSOL и SIMION. Моделирование в COMSOL выполнялось в 3D и проводилось в два этапа. На первом этапе выполнялось построение электрического поля с учетом физической формы зонда в виде параболоида с радиусом закругления 100 нм (рис. 1, б), что позволило оценить ток эмиссии при помощи формулы Фаулера — Нордгейма (табл. 1). На втором

этапе моделирования COMSOL и в модели SIMION выполняется трассировка электронов (рис. 1, в, г) с использованием виртуального Гауссова источника электронов, параметры которого соответствуют параметрам автоэмиссионного источника [8]. Моделирование в обоих пакетах выполнялись с одинаковыми параметрами геометрии и напряжений на электродах (табл. 1). В результате получено, что при расстоянии от зонда до экстрактора 200 нм и напряжении на зонде 300–700 В рабочее расстояние составляет 220–340 мкм, а размер сфокусированного пучка 120–150 нм (табл. 1).

Для изготовления МК применяются различные технологии: оптическая и электронная литография, групповая кремниевая технология микроэлектроники, технология фокусированного электронного пучка и др. Например, в [9] использована технология фрезерования ионным пучком, а в [10] для изготовления многоколоночной мини электронно-оптической системы для инспекции больших пластин предлагается использовать групповую технологию микроэлектроники. Представленная выше мини электронно-оптическая система

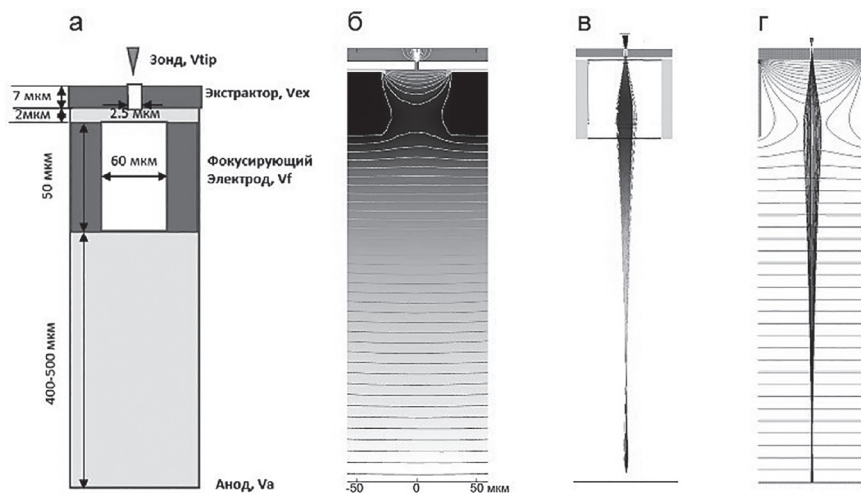


Рис. 1. а — схема модели; б — электрическое поле, построенное в COMSOL; в, г — сравнение трассировки электронов в COMSOL и SIMION

Таблица 1

Vtip, В	Vex, В	Vf, В	Va, В	Ток эмиссии, нА	Ширина сфокусированного пучка, нм	
					COMSOL	SIMION
–300	–170	–305	0	0.017	175	409
–500	–400	–506	0	15	115	310
–700	–550	–708	0	330	97	246

может быть изготовлена, например, с помощью фрезеровки тонкой металлической фольги с помощью ионного и лазерного пучков. При этом с помощью фрезеровки сфокусированным ионным пучком может быть создана апертура с минимальным микронным и субмикронным диаметром для экстрактора электронов, а с помощью лазерной фрезеровки — широкоапертурная часть МК с диаметром отверстия в десятки микрон. Поскольку лазерная технология в принципе позволяет получать отверстия с микронными диаметрами, то в перспективе можно будет использовать единую лазерную технологию для изготовления апертур МК. В качестве основных материалов для создания заданной структуры МК предполагается использовать тонкие фольги алюминия, титана и вольфрама толщиной 10–20 мкм. В качестве эмиттера можно использовать вольфрамовое острие, изготовленное методом электрохимического травления.

Благодарности

Работа выполнена при техническом содействии ООО «Петроаналитика Инструментс» (к. ф.-м. н. О. В. Хаит).

Литература

1. Muray, L. P. Developments in low-voltage microscopy instrumentation // Scanning. 2011. Vol. 33. P. 155–161. DOI:10.1002/sca.20245
2. Park J.-Y., Lera J.-D., Yakshin M. A., Choi S. S., Lee Y., Chun K. J., Lee J. D., Jeon D., Kuk Y. Fabrication of multiple microcolumn array combined with field emission array// Journal of Vacuum Science & Technology B. 1997. Vol. 15. P. 2749. DOI: 10.1116/1.589720

3. Roberts R. H., Gomati M. M., Kudjoe J., Barkshire I. R., Bean S. J., Prutton M. A Miniature, all-electrostatic, field emission electron column for surface analytical microscopy// *Measurement Science and Technology*. 1997. Vol. 8, No. 5. DOI: 10.1088/0957-0233/8/5/012
4. Chang T. H. P., Thomson M. G. R., Yu M. L., Kratschmer E., Kim H. S., Lee K. Y., Rishton S. A., S. Zolgharnain. Electron beam technology — SEM to microcolumn // *Microelectronic Engineering*. 1996. Vol. 32 P. 113–130. DOI: 10.1016/0167-9317(95)00366-5
5. Zlatkin A., Garcia N. Functional scanning electron microscope of low energy with integrated electron optical system for nanolithography// *Microelectronic Engineering*. 1999. Vol.46. P. 213–217. DOI: 10.1016/S0167- 9317(99)00065-9
6. Minh P. N., Ono T., Sato N., Mimura H., Esashi M.; Microelectron field emitter array with focus lenses for multielectron beam lithography based on silicon on insulator wafer // *J. Vac. Sci. Technol. B* 1 May 2004; 22 (3): 1273–1276. DOI: 10.1116/1.1738118
7. Kim Y. C., Ahn S. J., Oh T. S., Kim D. W., Kim H. S., Jang W. K. Low energy microcolumn for large field view inspection // *Ultramicroscopy*. 2011. Vol.111, No. 12. P. 1645–1649. DOI: 10.1016/j.ultramic.2011.09.016
8. Tuggle D. W., Li J. Z., Swanson L. W. Point cathodes for use in virtual source electron optics // *Journal of Microscopy*. 1985. Vol. 140, No 3. P. 293–301. DOI: 10.1111/j.1365-2818.1985.tb02683.x
9. Wicki F., Longchamp J.-N., Escher C., Fink H.-W., Design and implementation of a micron-sized electron column fabricated by focused ion beam milling // *Ultramicroscopy*. 2016. Vol. 160. P. 74–79. DOI: 10.1016/j.ultramic.2015.09.013
10. Kazmiruk V., Savitskaja T. Electron Optic Design of Arrayed E-Beam Microcolumns Based Systems for Wafer Defects Inspection// *arXiv:0805.0495v1 [physics.optics]*. 2008. DOI: 10.48550/arXiv.0805.0495

О КРИЗИСЕ В ОТЕЧЕСТВЕННОМ НАУЧНОМ ПРИБОРОСТРОЕНИИ И ПУТЯХ ВЫХОДА ИЗ НЕГО НА ПРИМЕРЕ СЕКВЕНАТОРОВ ДНК

Я. И. Алексеев^{1,2}, А. Я. Алексеева¹, А. В. Веретенников³
jalex@syntol.ru

¹ НПФ Синтол, 127434, Москва, ул. Тимирязевская, 42, корп. Б

² Институт аналитического приборостроения РАН, 198095,
Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А

³ АО «ЭЗАН», 142432, г. Черноголовка, проспект академика Семенова, 9

По данным анализа закупок классических секвенаторов ДНК из открытых источников, в 2025 г. доля закупленных в России китайских приборов превысила 50 %, при этом приходится констатировать более чем двукратное падение производства и продаж отечественных секвенаторов (см. рис. 1).

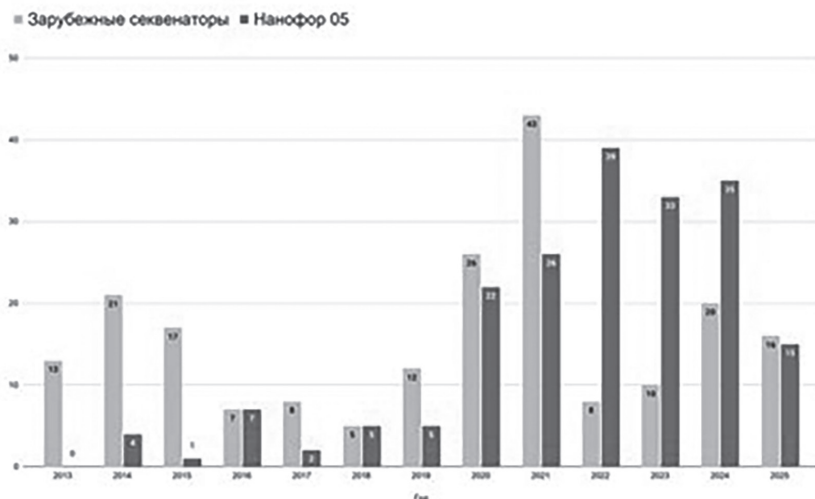


Рис. 1. Динамика закупок приборов для секвенирования ДНК в Российской Федерации по данным открытых источников

Рассмотрим причины, которые, на наш взгляд, привели к данной ситуации. Успешно продолжается поддерживаемая правительством Китая экспансия научного оборудования и, в частности, секвенаторов ДНК на рынок России. Некоторые из приборов китайского производства, например HONOR 1616 (Superyears, Китай), были «перекрашены» в российские цвета и стали «отечественными» секвенаторами Locus Seqtor 1616 (ООО «Хеликон», Россия). Одновременно обсуждается локализация в России производства линейки китайских секвенаторов ДНК (Генные технологии здоровья, Китай). Все это происходит на фоне попыток организовать системные меры поддержки разработки и производства отечественных научных приборов со стороны профильных ФОИВов. Однако некоторые из таких мер либо сложны, либо не дают желаемого масштабного эффекта. Успешная и формировавшая рынок для российских производителей программа Минобрнауки России по обновлению приборной базы научных и образовательных организаций была переориентирована на поддержку небольшого числа центров коллективного пользования и инжиниринговых центров, тем самым критически сузив появившийся рынок. Минпромторг России применяет сертификат происхождения по форме СТ-1, что, с одной стороны, дает отечественным производителям реальные преференции при торгах, а с другой стороны, процедура его получения крайне забюрократизирована и нередко занимает до 3 лет.

Проведенный анализ уже поставленных десятков китайских приборов демонстрирует их низкую загрузку у пользователей. Причин тому несколько. Во-первых, эти приборы довольно «сырые», а их сервисное обслуживание совершенно неразвито. Во-вторых, стоимость расходных материалов и наборов китайского производства высока и не все организации справляются с выпавшей на них после приобретения китайских приборов финансовой нагрузкой. Кроме того, многие приборы закупаются без предварительной проработки пользователями наличия на рынке готовых (а для медицинских организаций еще и имеющих регистрационное удостоверение) наборов реагентов под задачи, для решения которых покупалось данное дорогостоящее оборудование.

Итогом сложившейся ситуации являются разрывы в работе предприятий-изготовителей критически важной наукоемкой продукции, что ведет к потере темпа и их неминуемой технологической деградации. Попытки самостоятельного выхода отечественных предприятий на зарубежные рынки являются возможным выходом из сложившейся ситуации, но эта работа требует дополнительных инвестиций и времени.

В такой сложной для отечественных разработчиков и производителей научного оборудования ситуации необходимо наращивать меры их системной поддержки со стороны государства. Следует кратко увеличить затраты на разработки и одновременно вернуть практику финансирования большого числа научных и образовательных организаций по программе обновления приборной базы, а не только ограниченного числа центров коллективного пользования и инженеринговых центров. Следует также упростить процедуру получения сертификатов происхождения продукции для научных приборов, учитывая факт их разработки и производства в стране. Важно уделять внимание не только разработчикам приборов, но и производителям, так как производство научных приборов требует развитой и зачастую избыточной производственной инфраструктуры, которую сложно окупить при мелкосерийном производстве. Поддержка экспорта отечественных приборов в свою очередь позволит увеличить серийность, повысив тем самым экономический эффект. Следует также рассмотреть применение налоговых льгот для компенсации затрат на НИОКР, проводимых предприятиями в инициативном порядке за счет собственных средств. В рамках реализации программы развития научного приборостроения гражданского назначения необходимо поддержать разработку тех типов и моделей приборов, рыночный потенциал которых высок, а срок выхода на серию не превышает трех лет, — такой подход позволит сравнительно быстро нарастить научный, инженерный и производственный потенциал отечественной отрасли приборостроения, сформировать внутренний рынок и приступить к решению дальнейших задач по оснащению российской науки и промышленности научными приборами и оборудованием.

ЖЕСТКИЙ СОФТ: НАШ УВЛЕКАТЕЛЬНЫЙ ОПЫТ РАЗРАБОТКИ ПО ДЛЯ НАУЧНОГО И МЕДИЦИНСКОГО ОБОРУДОВАНИЯ

С. А. Долгушин*, Д. В. Шалаев, П. А. Монахова, Я. Н. Горев
* dolgushin.sergey@aivok.com

ООО «Айвок», 124498, Москва, г. Зеленоград, проезд 4922-й, 4, стр. 5

Компания «Айвок» разрабатывает и производит высокотехнологичное медицинское и аналитическое оборудование для генетики, иммунологии, ПЦР-анализа: QuattroPlex® Lab — система

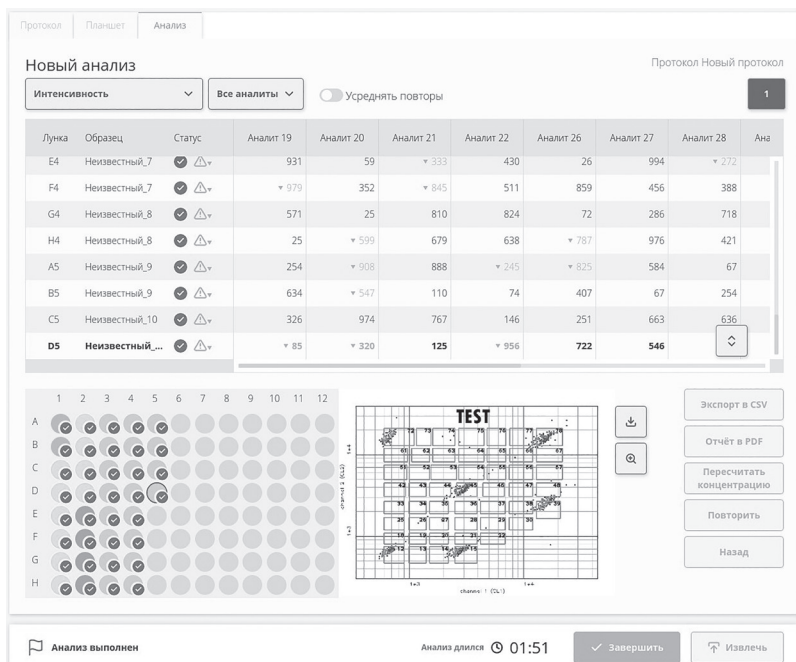


Рис. 1. Внешний вид основного рабочего экрана ПО QuattroPlex® Lab Software аналитической системы мультиплексного анализа биомаркеров QuattroPlex® Lab

мультиплексного анализа биомаркеров, GeneMack® Strela — станция выделения ДНК, TERMIX® — персональный термоцикер, QUBIX® — компактный флуориметр. Приборы и программное обеспечение разрабатываются нами полностью с нуля: от идеи до серийного выпуска.

В докладе будет показана эволюция процесса разработки программного обеспечения (ПО) для аналитического и медицинского оборудования от «классического» подхода начала 2000-х гг. (C++ и Windows/Linux) до современного подхода на базе web-технологий и Linux. В качестве примера рассмотрен процесс разработки ПО для мультиплексного анализатора QuattroPlex® Lab: приведены этапы разработки и использованный стек, преимущества выбранной архитектуры, показаны особенности тестирования. Рассмотрены возникавшие на различных этапах трудности и показаны пути их решения (рис. 1).

Также уделено внимание специализированным задачам, которые возникают при создании сложного аналитического ПО: повышение скорости и точности вычислений, контроль размерности значений, генерация многостраничных отчетов, аппроксимация результатов.

(ПРЕД)ОБРАБОТКА ДАННЫХ В БИМЕДИЦИНЕ — СИГНАЛЫ, ИЗОБРАЖЕНИЯ, ТЕКСТЫ И ЧЕМ ТУТ ПОЛЕЗЕН ИСКУССТВЕННЫЙ ИНТЕЛЛЕКТ

Е. И. Пчицкая^{1,2,*}, Д. С. Смирнова¹, А. Р. Устинова¹, Е. И. Волкова¹,
Г. О. Раев¹, Д. А. Баев¹, Е. И. Герасимов^{1,2}, А. С. Сачук¹, А. В. Раковская^{1,2},
И. М. Золин¹, В. С. Скворцов¹, В. С. Чуканов^{1,3}, И. Б. Безпрозванный²
* pchitskaya_ei@spbstu.ru

¹ Лаборатория анализа биомедицинских изображений и данных,
Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29

² Лаборатория молекулярной нейродегенерации, Санкт-Петербургский
политехнический университет Петра Великого, 195251, Санкт-Петербург,
ул. Политехническая, 29

³ Высшая школа прикладной математики и вычислительной физики,
Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29

Развитие научного приборостроения открывает новые возможности для получения сложных биомедицинских данных, таких как сигналы активности нейронов, изображения высокого разрешения и текстовые массивы. Важным аспектом является не только разработка современного оборудования, но и создание эффективных методов предобработки и постобработки данных, которые должны разрабатываться параллельно с аппаратурой для обеспечения ее максимальной эффективности. Современные микроскопы и другие устройства генерируют огромные объемы информации, требующей специализированной обработки.

В нашей работе представлены методы и алгоритмы, в том числе на базе искусственного интеллекта (ИИ), адаптированные для обработки данных, получаемых с помощью флуоресцентных микроскопов, в том числе миниатюрных (минископов). Эти устройства позволяют регистрировать данные с высокой детализацией, но их полноценное использование невозможно без применения современных методов обработки.

В современной биомедицинской визуализации денойзинг удаляет шум, а деконволюция восстанавливает искаженные детали изображений, что критично для анализа данных, получаемых на микроскопах. Эти методы позволяют выявлять тонкие структуры клеток и слабые сигналы, которые иначе остались бы скрытыми, обеспечивая высокую точность последующего количественного анализа. Разработка таких алгоритмов — неотъемлемая часть создания и эффективного использования современного аналитического оборудования. Мы разработали метод денойзинга TriDeFusion [1], который сочетает аналитический денойзинг (Non-Local Means) и нейросетевой подход (Modified Noise2Noise). Это позволяет эффективно устранять шум и артефакты, сохраняя детализацию изображений, что особенно важно для анализа данных, полученных с использованием прижизненной и экспансионной микроскопии. В свою очередь нейросетевой метод деконволюции NeuroDecon [2] обеспечивает высококачественную трехмерную деконволюцию, в разы превосходящую по скорости и качеству традиционные аналитические методы, что критично для обработки изображений объемных объектов.

Следующим этапом обработки изображений является сегментация и извлечение численных характеристик исследуемых объектов. Изучение морфологии дендритных шипиков нейронов — ключевых элементов синаптической передачи — позволяет выявлять изменения, связанные с обучением, памятью и нейродегенеративными заболеваниями, такими как болезнь Альцгеймера. Для анализа морфологии дендритных шипиков нейронов было создано программное обеспечение SpineTool [3, 4], которое автоматизирует сегментацию, классификацию и кластеризацию нейронных структур, открывая возможности для глубокого понимания нейронных сетей и их патологий. Это особенно актуально для данных, получаемых с помощью высокоразрешающих микроскопов, где точность анализа напрямую зависит от качества постобработки.

Исследование активности нейронов с помощью миниатюрных флуоресцентных микроскопов (таких как Inscopix или UCLA Miniscope) позволяет регистрировать динамику нейронных сетей в естественных условиях, что критически важно для понимания

механизмов обучения, памяти и развития нейродегенеративных заболеваний [5]. Для обработки таких временных рядов, содержащих скрытые зависимости и сложные паттерны, нами разработана модель NeuroBERT, основанная на архитектуре нейронной сети BERT (Bidirectional Encoder Representations from Transformers). Она обеспечивает восстановление сигналов и классификацию состояний нейронов, раскрывая новые возможности для анализа нейробиологических данных.

Кроме того, нами разработана мультиагентная система NeuroRAG, основанная на технологии Retrieval-Augmented Generation (RAG), для работы с научными текстами в области нейробиологии. Она интегрирует специализированные базы данных и интернет-источники, обеспечивая высокую точность и релевантность ответов на биомедицинские запросы, что важно для анализа текстовых данных и метаинформации, сопутствующей экспериментам.

Таким образом, комплексный подход, сочетающий разработку оборудования и алгоритмов обработки данных, позволяет значительно расширить возможности нейробиологических исследований и повысить эффективность использования аналитической аппаратуры.

Благодарности

Работа поддержана грантом в рамках государственного задания FSEG-2024-0025 и Фондом научно-технологического развития СПбПУ.

Литература

1. Zolin I., Chukanov V., Pchitskaya E. TriDeFusion: Enhanced denoising algorithm for 3D fluorescence microscopy images integrating modified Noise-2Noise and Non-local means // 2024 IEEE International Multi-Conference on Engineering, Computer and Information Sciences (SIBIRCON). 2024. P. 211–216.
2. Sachuk A. et al. NeuroDecon: a neural network-based method for three-dimensional deconvolution of fluorescent microscopic images // International Journal of molecular sciences. 2025. T. 26, № 18. P. 8770.

3. Pchitskaya E. et al. SpineTool is an open-source software for analysis of morphology of dendritic spines // Scientific Reports. 2023 г., Т. 13, № 1, С. 10561.
4. Ustinova A. et al. Generate and Analyze Three-Dimensional Dendritic Spine Morphology Datasets With SpineTool Software // Current Protocols. 2024. Т. 4, № 12. Р. e700.
5. Gerasimov E. et al. NeuroActivityToolkit—Toolbox for Quantitative Analysis of Miniature Fluorescent Microscopy Data // Journal of Imaging. 2023. Т. 9, № 3. Р. 243.

АКУСТООПТИЧЕСКИЕ ПРИБОРЫ БИМЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ: ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ

А. С. Мачихин, В. Э. Пожар*

* vitold@ntcup.ru

*Научно-технологический центр уникального приборостроения РАН, 117342,
Москва, ул. Бултерова, 15*

Оптические методы анализа обеспечивают оперативное бесконтактное определение состояния объекта и потому широко используются для наблюдения в биологических исследованиях и в медицине. НТЦ УП РАН разрабатывает оптические приборы и системы, которые основаны на следующих принципах: мультиспектральные, гиперспектральные на основе акустооптических фильтров, фурье-спектрометрия. Они имеют различную конструкцию и габариты: лабораторные, компактные, портативные, мобильные, в том числе способные размещаться на дронах, модули расширения для современной аппаратуры (рис. 1).

По принципу действия их можно разделить на:

— спектральные приборы, позволяющие зарегистрировать спектральные или цветовые характеристики объектов;

- приборы с частотной селекцией, выделяющие, например, вариации на частоте сердечных сокращений;
- интерферометрические спектральные системы, выявляющие структурные элементы;
- комбинированные, сочетающие оптический анализ, например, с акустическим, который позволяет определить структуру тканей, форму органов или включений эхо-импульсными методами на основе высокочастотного ультразвука.

В качестве биомедицинских объектов выступают поверхность тела, внутренние полости, подповерхностные слои, образцы тканей и малые живые организмы (например, икра и мальки рыб). Форма получаемых объективных данных: оптические изображения, спектры, спектральные изображения, интерферограммы, акустические сигналы.

Среди основных разработанных приборов, устройств и систем можно отметить: аналитические системы и модули (гиперспектрометры, мультиспектральные видеокамеры, видеокапилляроскопы, измерительные оптические эндоскопы, гиперспектральные модули для микроскопов и эндоскопов), вспомогательное оборудование и специализированные системы (анализатор функционирования сердечно-сосудистой системы рыб, система для цветовоспроизведения, акустооптические фильтры и дефлекторы, беговые дорожки для мелких лабораторных животных).

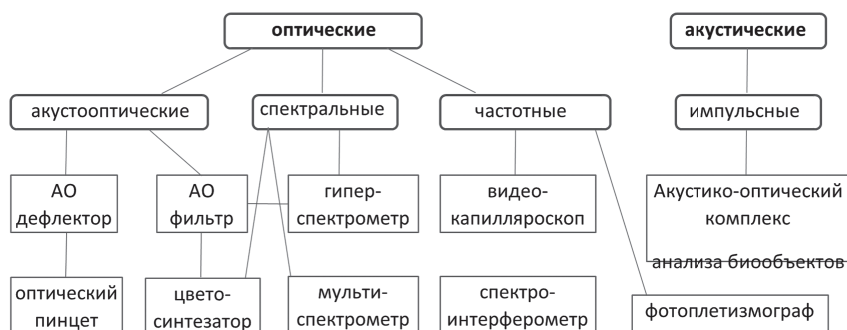


Рис. 1. Основные используемые методы и разрабатываемые приборы

Существующая совокупность устройств, методов и технологий позволяет создавать новые исследовательские и аналитические комплексы для решения разнообразных биомедицинских и других задач.

Благодарности

Доклад подготовлен в рамках государственного задания НТЦ УП РАН (проект FFNS-2025-0006), утвержденного Минобрнауки РФ. Результаты получены с использованием оборудования Центра коллективного пользования НТЦ УП РАН.

ВЛИЯНИЕ ОТРАЖЕНИЯ СВЕТА В ЛИНЕЙКЕ КАПИЛЛЯРОВ НА АНАЛИТИЧЕСКУЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗАТОРА

Ф. Л. Владимиров*, В. Е. Курочкин, А. С. Альдекеева, Н. А. Корнева

* fedor.vlv3008@gmail.com

*Институт аналитического приборостроения РАН, 198095,
Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А*

К основным характеристикам генетических анализаторов [1, 2] относятся длина прочтения, максимальная анализируемая длина, время стандартного фрагментного анализа, количество каналов детекции флуоресценции, аналитическая чувствительность, динамический диапазон измерения сигнала в каждом спектральном диапазоне. Аналитическая чувствительность определяет минимальную концентрацию анализируемых реагентов, таких как флуоресцентно меченые фрагменты ДНК, или красителей в модельных экспериментах. Высокая чувствительность имеет большое значение, когда исследуются образцы с малым количеством ДНК, которое даже после амплификации с помощью полимеразной цепной реакции позволяет получить интенсивности флуоресценции, близкие к сигналу шумов или фонового излучения. Поэтому исследования, направленные на повышение аналитической чувствительности генетического анализатора и определение ее фактического значения, являются актуальной задачей.

В работе рассмотрено влияние паразитного отражения и рассеяния излучения флуоресценции в линейке капилляров на аналитическую чувствительность генетического анализатора. Отраженное и рассеянное излучение создает дополнительную фоновую засветку, которое в ряде случаев может превышать информативный сигнал флуоресценции. Теоретически показано, что основной вклад в фоновую засветку линейки капилляров вносит отражение излучения от капилляров с высокой концентрацией флуорофоров и, соответственно, высокой интенсивностью флуоресценции. Для рассеяния

света в линейке капилляров большую роль играют технологические аспекты очистки капилляров [3].

Экспериментальная проверка предложенной модели формирования фоновой засветки была проведена на стандартной линейке капилляров с 8 капиллярами, в которой один из капилляров был заполнен коллоидным раствором на основе квантовых точек и фотополимера. Изображение линейки капилляров, в которой один капилляр заполнен квантовыми точками (справа), показано на рис. 1. Остальные семь капилляров заполнены водой и не люминесцируют. Соседние капилляры отражают заметную часть излучения от люминесцирующего капилляра, что создает дополнительную фоновую засветку и приводит к снижению аналитической чувствительности.

Теоретически показано, что если интенсивности люминесценции в различных капиллярах линейки, отличаются незначительно

$$p = \frac{I_{\max}}{I_{\min}} \sim 1 \quad (I_{\max} — \text{максимальная интенсивность люминесценции}$$

в одном из капилляров, I_{\min} — интенсивность люминесценции в капилляре, для которого определяется аналитическая чувствительность), то капилляры не оказывают существенного влияния друг

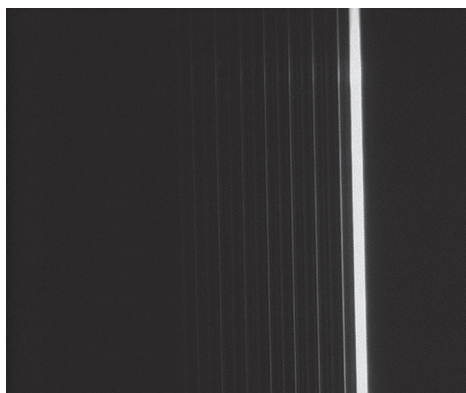


Рис. 1. Линейка капилляров. Один капилляр заполнен квантовыми точками (справа). Остальные капилляры отражают заметную часть излучения люминесценции от первого капилляра

на друга. При $p = 10$ эффективная аналитическая чувствительность уменьшается примерно в 2 раза в соседнем капилляре. При $p = 100$ эффективная аналитическая чувствительность уменьшается в 3–11 раз в пределах линейки капилляров. При $p = 1000$ эффективная аналитическая чувствительность падает примерно в 30–110 раз и составляет $3 \times 10^{-9} \dots 1,1 \times 10^{-8}$ М/л. При $p = 10\,000$, эффективная аналитическая чувствительность падает более чем в 1000 раз (10^{-7} М/л).

Проверка влияния интенсивного излучения флуоресценции одного из капилляров на соседние капилляры линейки проводилась также в приборе «Нанофор 05». Линейка капилляров, в которой один из капилляров был заполнен квантовыми точками, помещалась вместо стандартной линейки капилляров. Засветка и считывание производились в стандартном режиме. Высокоинтенсивная флуоресценция в одном из капилляров создает заметную фоновую засветку практически во всех капиллярах линейки и делает невозможным проведение корректных измерений.

Рассматривается целесообразность использования линеек капилляров с большим количеством капилляров и меры по уменьшению паразитного отражения в линейке капилляров генетического анализатора. Из полученных результатов следует, что для получения высокой аналитической чувствительности концентрация анализируемых реагентов должна быть примерно одинаковой во всех капиллярах линейки. При использовании линеек капилляров с большим количеством капилляров следует учитывать их взаимное влияние — отражение излучения флуоресценции с различной интенсивностью и различным спектральным составом.

Литература

1. Курочкин В. Е., Алексеев Я. И., Петров Д. Г., Евстрапов А. А. Отечественные приборы для молекулярно-генетического анализа: разработки ИАП РАН и ООО «Синтол» // Известия Российской Военно-медицинской академии. 2021. Т. 40. № 3. С. 69–74. DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar76918>
2. Волков А. А., Волков И. А., Плугов А. Г., Кулябина Е. В., Мелкова О. Н., Лавров Г. С., Бочарова Д. В., Алексеев Я. И. Генетический

анализатор Нанофор 05 в качестве средства измерений при секвенировании ДНК // Измерительная техника. 2021. № 1. С. 60–65.

3. Курочкин В. Е., Владимиров Ф. Л., Альдекеева А. С., Корнева Н. А., Волков М. В., Шляхтин М. С., Журба Д. В. Лазерная технология удаления полиимидного покрытия с кварцевых капилляров // Научное приборостроение. 2025. Т. 35, № 2. С. 3–19.

КОРРЕКЦИЯ АДДИТИВНОЙ И МУЛЬТИПЛИКАТИВНОЙ СОСТАВЛЯЮЩИХ НЕРАВНОМЕРНОСТИ ОСВЕЩЕНИЯ В ИЗОБРАЖЕНИЯХ СЕКВЕНАТОРА ДНК «НАНОФОР СПС»

В. В. Манойлов*, А. Г. Бородинов, А. И. Петров, И. В. Заруцкий,
А. С. Сараев

* manoilov_vv@mail.ru

*Институт аналитического приборостроения РАН, 198095,
Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А*

Неравномерное освещение поля зрения реакционной ячейки приводит к ошибкам в оценках параметров объектов флуоресценции в экспериментах по анализу нуклеиновых кислот в системе параллельного секвенирования [1, 2].

На рис. 1 показано изображение поля зрения из эксперимента, проведенного на секвенаторе «Нанофор СПС». Центральная область изображения более яркая, а края более темные. Исходный размер изображения имел 1950 строк и 2000 столбцов. На рис. 2 показан результат обработки изображения, представленного на рис. 1, которое было обработано с помощью морфологической операции эрозии со структурным элементом *disk* с радиусом 20 пикселей, а затем сглажено с помощью гауссового фильтра нижних частот. Эти процедуры позволили выделить из исходного изображения фоновую составля-

ющую, которая является результатом неравномерности освещения реакционной ячейки.

Существует линейная модель формирования изображения [1, 3], описывающая связь между истинным изображением $U(x; y)$ и полученным изображением $N(x; y)$, которая выглядит следующим образом:

$$N(x; y) = U(x; y)S_M(x; y) + S_A(x; y) \quad (1)$$

$N(x; y)$ — полученное изображение, искаженное неравномерностью освещения. $U(x; y)$ — истинное изображение, $S_M(x; y)$ — мультипликативный компонент неравномерности освещения, $S_A(x; y)$ — аддитивный компонент неравномерности освещения.

Для оценки $\hat{S}_A(x, y)$ аддитивного компонента $S_A(x; y)$ исходное изображение обрабатывалось скользящим окном в виде квадрата размером 15×15 и локальный фон был определен как среднее значение самых тусклых 5 % пикселей этого пиксельного окна. Затем

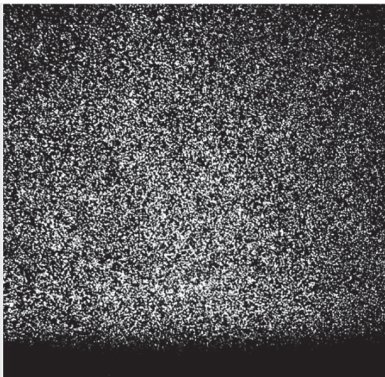


Рис. 1. Типичное изображение поля зрения, демонстрирующее неравномерное освещение

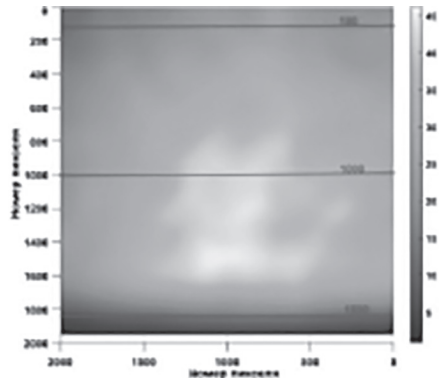


Рис. 2. Результат обработки изображения с помощью морфологической операции эрозии и сглаживанием гауссовым фильтром обработки

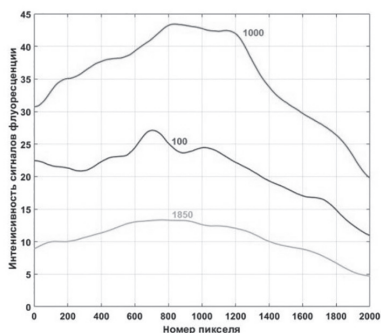


Рис. 3. Профили 100, 1000 и 1850 строк изображения, показанного на рисунке 2 до проведения коррекции неравномерности освещения

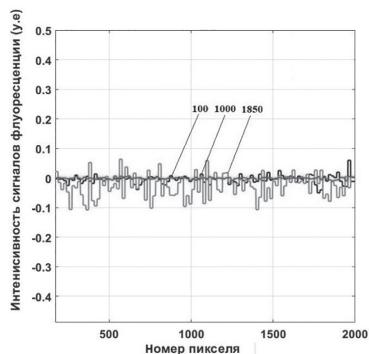


Рис. 4. Результат коррекции аддитивной и мультипликативной составляющих неравномерности освещения

полученное среднее значение присваивалось всем пикселям окна. В результате для каждого поля зрения формировалось изображение фона, которое вычиталось из исходного изображения.

Для оценки $\hat{S}_M(x, y)$ мультипликативного компонента $S_M(x; y)$ использовались три метода фильтрации нижних частот, основанных на предположении, что неравномерное освещение является сигналом низкой частоты.

На рис. 3 показаны профили строк с номерами: 100, 1000 и 1850, указанными на рис. 2. Как видно из рис. 3, профили строк изображения имеют разную форму и амплитуду, что является результатом неравномерного освещения. Профили самой яркой средней и самой тусклой линий соответствуют строкам 1000, 100 и 1850. На рис. 4 показаны профили этих строк для откорректированного изображения. Профили строк откорректированного изображения близки к прямым линиям и находятся вблизи нуля.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию № 075-00444-25-00 (от 26.12.2024).

Литература

1. Wolowski V. R. High-quality, high-throughput measurement of protein-DNA binding using HiTS-FLIP. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München; 2016. 251. 10.5282/edoc.19445
2. Waters J. C. Accuracy and precision in quantitative fluorescence microscopy // The Journal of cell of biology. 2009. 185(7). P. 1135–1148.
3. Likar B., Pernu F. Retrospective shading correction of microscopical images. Retrospective shading correction of microscopical images. In Proc. Czech Pattern Recognition Workshop, Eds. Svoboda, PT. 2000: 15–20.

РАСПОЗНАВАНИЕ КЛАСТЕРОВ ДНК В ДАННЫХ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ МЕТОДАМИ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ

А. С. Сараев*, А. Г. Бородинов, В. В. Манойлов, А. И. Петров,
И. В. Заруцкий, В. Е. Курочкин

* alex.niispb@yandex.ru

*Институт аналитического приборостроения РАН, 198095,
Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А*

В приборах «Нанофор СПС» и Miseq (Illumina), использующих метод массового параллельного секвенирования, реализована методология секвенирования путем синтеза, при которой каждый цикл сопровождается регистрацией четырех флуоресцентных изображений в различных спектральных диапазонах, соответствующих нуклеотидам А, С, G и Т. На получаемых изображениях иммобилизованные на подложке кластеры ДНК визуализируются в виде дискретных областей повышенной интенсивности флуоресценции на гетерогенном фоне.

Процедура base-calling заключается в определении последовательности нуклеотидов на основе анализа пространственно-временной динамики флуоресцентных сигналов. Традиционные алгоритмы, основанные на анализе спектральных характеристик интенсивности, демонстрируют ограниченную эффективность в условиях значительной вариабельности сигнала, спектрального перекрытия флуорофоров и наличия систематических артефактов [1]. Предлагаемый метод реализует альтернативный подход, основанный на применении машинного обучения для пространственно-статистического анализа кластеров.

Начальный этап алгоритма включает детектирование потенциальных кластеров на каждом канале с использованием метода локальных максимумов. Для каждого идентифицированного объекта производится экстракция региона интереса размером 10×10 пикселей с центром в точке детекции. Фундаментальным аспектом методологии является формирование мультиспектральных образцов, где

каждый экземпляр представляет собой ансамбль из четырех пространственно-коррелированных регионов интереса. Датасет конструируется с соблюдением баланса между позитивными примерами (регионы, содержащие валидные кластеры с аннотацией соответствующего нуклеотида) и негативными примерами (регионы фона). Вектор признаков формируется посредством конкатенации пиксельных значений всех спектральных каналов, создавая входные данные размерностью 400 признаков.

Для решения задачи классификации кластеров использовались четыре алгоритма машинного обучения, оптимально адаптированных для обработки многомерных данных: метод опорных векторов (SVM), алгоритм *k*-ближайших соседей (KNN), дерево решений (Decision Tree), логистическая регрессия.

Разработанный алгоритм на основе классических методов машинного обучения демонстрирует сопоставимую с нейросетевыми подходами точность при существенно меньших вычислительных затратах. Ключевые преимущества методов включают высокую скорость обработки, интерпретируемость результатов, устойчивость к переобучению и детерминированность работы [2]. Данные характеристики делают классические методы предпочтительными для применения в production-системах обработки геномных данных, где критически важны скорость анализа и воспроизводимость результатов.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию № 075-00444-25-00 (от 26.12.2024).

Литература

1. Christian Ledergerber, Christophe Dessimoz, Base-calling for next-generation sequencing platforms. Briefings in Bioinformatics. 2011. 12(5). P. 489–497.
2. Mittal H., Pandey A., Saraswat M., Kumar S., Pal R., Modwel G. A comprehensive survey of image segmentation: clustering methods, performance parameters, and benchmark datasets. Multimed Tools Appl. 2022. 81(24):35001–35026.

КАЛИБРОВОЧНОЕ УСТРОЙСТВО ДЛЯ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА РЕАКЦИОННЫХ ЯЧЕЕК ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗАТОРА «НАНОФОР СПС»

А. Н. Зубик*, Ф. Л. Владимиров, Д. А. Белов, В. Е. Курочкин

* tunix@yandex.ru

*Институт аналитического приборостроения РАН, 198095,
Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А*

Метод массового параллельного секвенирования ДНК заключается в одновременном анализе множества колоний одноцепочечных фрагментов ДНК посредством синтеза комплементарных цепей модифицированными нуклеотидами с оптической регистрацией, соответствующих каждому виду нуклеотида флуоресцентных меток. Синтез выполняется на одной или двух поверхностях проточной реакционной ячейке, помещенной внутрь генетического анализатора для массового параллельного секвенирования ДНК (далее — секвенатор). Изображения флуоресцентных меток регистрируются с высоким разрешением с помощью детектирующей системы секвенатора. Для синтеза олигонуклеотидов на поверхности проточной ячейки предварительно наносится слой коротких олигонуклеотидов, от плотности и равномерности нанесенных структур напрямую зависит результат секвенирования. Один из способов оценки качества подготовки поверхности ячеек заключается в прикреплении флуоресцентных меток к коротким олигонуклеотидам и оценки интенсивности и равномерности сигналов флуоресценции по одной или двум поверхностям ячейки. Для корректной оценки интенсивности флуоресценции необходимо использовать устройство с известным и стабильным уровнем флуоресценции с заданными спектральным составом.

Для определения плотности якорных нуклеотидов на поверхности ячейки в работе [1] было предложено использовать раствор олигонуклеотидов, меченных флуоресцентным красителем (Cy5), которые обратимо связываются с якорями. Интенсивность формируемого светящегося слоя позволяет оценить плотность и равномерность

нанесения якорных нуклеотидов на поверхности ячейки. Однако нерешенной задачей является создание калибровочного устройства с эталонным уровнем флуоресценции, относительно которого изготовленные рабочие ячейки можно разделять по качеству и характеризовать годными либо негодными для дальнейшего использования. Применение для калибровки таких же ячеек для секвенирования с высоким качеством поверхности осложняется наблюдаемым уменьшением интенсивности сигнала флуоресценции со временем как за счет выцветания красителя Су5 при многократном сканировании на флуоресцентном сканере, так и за счет возможной деградации поверхностного слоя. Поэтому разработка и создание калибровочного устройства с известным и стабильным уровнем флуоресценции является актуальной задачей.

В качестве калибровочного устройства в настоящей работе предложено использовать стандартные реакционные ячейки для секвенирования, заполненные люминофором на основе квантовых точек с фотополимером. После заполнения микрофлюидного канала композиция полимеризовалась под действием УФ-излучения.

Люминофоры на основе квантовых точек обладают высокой яркостью флуоресценции, что определяется высокими значениями коэффициента экстинкции и квантового выхода люминесценции, имеют широкую полосу возбуждения, что позволяет использовать один источник возбуждающего излучения, например, в диапазоне 400–500 нм, для возбуждения люминесценции квантовых точек с различными спектрами люминесценции. Квантовые точки являются неорганическими материалами и обладают высокой фотостабильностью, что позволяет использовать мощное лазерное излучение для возбуждения люминесценции без риска деградации и выгорания люминофора. Спектры люминесценции этих материалов имеют весьма узкий и симметричный пик, без всяких длинноволновых хвостов и других особенностей. Положение максимума флуоресценции определяется размером квантовых точек. В устройстве может использоваться несколько типов квантовых точек с отличающимися спектрами люминесценции, идентичными спектрам основных органических красителей, используемых для геномного секвенирования.

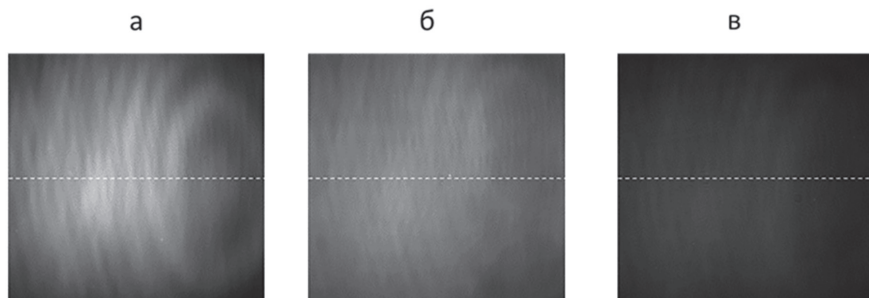


Рис. 1. Пример использования калибровочного устройства

Особенностью органических красителей является, то, что использование интенсивного лазерного излучения приводит к их быстрой деградации и выгоранию, при этом яркость флуоресценции быстро падает. Это делает применение органических красителей в калибровочных устройствах малопривлекательным.

Было реализовано калибровочное устройство, в котором каналы были заполнены композицией с квантовыми точками на основе CdS/ZnS (КТ-620) и фотополимером. После заполнения каналов композицией, фотополимер с квантовыми точками полимеризовался при помощи УФ-осветителя с длиной волны излучения $\lambda = 365$ нм и мощностью 3,0 Вт. Спектр люминесценции имеет максимум в районе 620 нм, полуширина спектра — примерно 30 нм. Используемая композиция может использоваться для тестирования и настройки каналов с максимумами излучения 600 и 661 нм.

Пример использования разработанного калибровочного устройства для проверки качества подготовки поверхности реакционных ячеек в приборе для массового параллельного секвенирования «Нанофор СПС» показан на рис. 1, где представлены участки калибровочного устройства (а), хорошей реакционной ячейки (б) и плохой ячейки (в). Размеры поля зрения составляют 500×500 мкм. Усредненный уровень сигнала флуоресценции калибровочного устройства составляет (950 ± 50) о. е., сигнал флуоресценции хорошей ячейки составляет (1010 ± 50) о. е., сигнал флуоресценции плохой реакционной ячейки составляет (480 ± 25) о. е. Отбраковка ячеек проводится по уровню

сигнала флюоресценции. Ячейки, у которых сигнал флюоресценции ниже порогового значения, заданного уровнем люминесценции калибровочного устройства, имеют недостаточную плотность олигонуклеотидов на поверхности ячейки и не используются для геномного секвенирования ДНК. Изготовленные калибровочные ячейки показали долговременную стабильность и устойчивость к выгоранию.

Литература

1. Малахова М. А., Гусев В. С., Седов Я. Д., Смирнов А. Д., Тугушев М. Ш., Резник В. С., Кобелев А. Н., Пушкин А. А., Петров А. И., Курочкин В. Е., Алексеев Я. И. Изучение динамики изотермической амплификации колоний ДНК в приборах массового параллельного секвенирования // Тезисы докладов Третьей ежегодной всероссийской молодежной конференции по методам и приборам для анализа биологических объектов. — Санкт-Петербург, 2024. С. 77–80.

УЧЕТ БАЗОВОЙ ЛИНИИ И КОМПЕНСАЦИЯ ПЕРЕКРЕСТНЫХ ПОМЕХ СИГНАЛОВ ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ ПРИ ОБРАБОТКЕ ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ПО СЭНГЕРУ НА ПРИБОРЕ «НАНОФОР 05»

А. Н. Гордеев^{1, *}, А. Г. Бородинов²

* gordeevaleksey37@gmail.com

¹ СПбАУ РАН им. Ж. И. Алферова, 194021, Санкт-Петербург, ул. Хлопина, 8/3, лит. А

² Институт аналитического приборостроения РАН, 198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А

Определение последовательности ДНК позволяет выявлять генетическую информацию организма, что помогает диагностировать заболевания, изучать наследственность и проводить научные

исследования. В настоящий момент одним из самых надежных методов определения последовательности нуклеотидов ДНК является секвенирование по Сэнгеру. Данный метод отличается высокой точностью (до 99,99 %), стабильностью результатов, относительной простотой интерпретации полученных данных и хорошей воспроизводимостью.

При этом, качество полученной хроматограммы сильно ухудшается из-за дрейфа базовой линии и перекрестных помех между каналами флуоресценции. Дрейф базовой линии обусловлен неравномерностью фонового сигнала, нестабильностью интенсивности лазерного возбуждения и колебаниями чувствительности оптической системы. Перекрестные помехи возникают из-за частичного спектрального перекрытия эмиссионных спектров флуоресцентных красителей и «просачивания» сигнала между каналами детектирования. Эти артефакты приводят к ухудшению соотношения сигнал/шум, появлению ложных пиков, усложнению автоматического определения пиков и сокращению длины достоверного прочтения. Для повы-

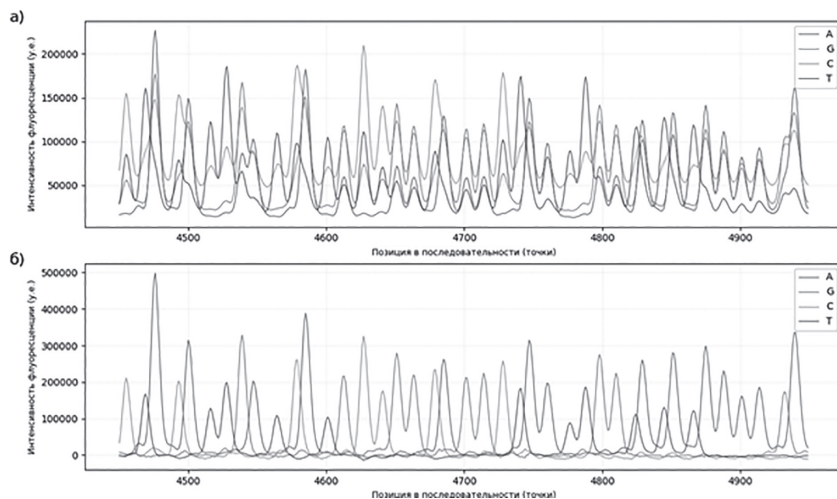


Рис. 1. Результат работы программы: а — исходные данные; б — очищенные данные

шения точности дешифровки требуется предварительная цифровая очистка сигналов.

Цель работы: разработка программного решения для автоматической коррекции базовой линии и компенсации перекрестных помех в данных секвенирования по Сэнгеру с последующей нормализацией очищенных сигналов.

Используемые методы:

Коррекция базовой линии. С целью коррекции базовой линии использован итеративный алгоритм, основанный на МНК (метод наименьших квадратов). На каждом шаге аппроксимируется текущая базовая линия, после чего точки сигнала, расположенные выше нее, исключаются из последующих вычислений. В результате последовательных итераций оценка базовой линии сходится к ее истинному значению. Метод не требует предварительной сегментации сигнала или определения пиков.

Компенсация перекрестных помех. Для компенсации перекрестных помех применяется алгоритм Li-Speed [1], представляющий собой оценку обратного отображения между интенсивностями флуоресценции и истинными концентрациями красителей посредством репараметризации. Попарное столкновение каналов осуществляется итеративно до достижения устойчивой структуры интенсивностей. Для оценки эффективности коррекции может использоваться метрика, основанная на распределении откорректированных данных.

Результаты. Разработанная компьютерная программа принимает на вход сырой сигнал (четыре канала A, G, C, T) и автоматически выполняет очистку. На рис. 1 (а) представлены результаты секвенирования по Сэнгеру, полученные в ходе эксперимента. Данные после обработки показаны на рис. 1 (б). Можно наблюдать следующие улучшения:

- Снижение перекрытия соседних пиков.
- Увеличение отношения сигнал/шум.
- Подавление ложных пиков.
- Устранение дрейфа базовой линии.

Таким образом, можно заключить, что предложенное программное решение значительно повышает качество данных секвенирования

по Сэнгеру. Предлагается использовать его в качестве обязательного этапа предобработки полученного в ходе эксперимента сигнала перед его дальнейшим использованием. Практическим результатом применения разработанного программного продукта является повышение точности идентификации нуклеотидов и увеличение длины корректно считываемой последовательности.

Литература

1. Li L., Speed T. P. An estimate of the cross-talk matrix in four-dye fluorescence-based DNA sequencing // Electrophoresis. 2000. Т. 21. № 7. С. 127–135.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОБРАТНЫХ ФУНКЦИЙ ДЛЯ ОБРАБОТКИ СИГНАЛОВ В ЗАДАЧЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДНК

А. Я. Логинов*, Б. В. Бардин, В. В. Манойлов, А. И. Петров

*aleksan1der-logp2014@yandex.ru

*Институт аналитического приборостроения РАН, 198095,
Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А*

В спектрометрии основная, «полезная» часть сигнала, как правило, представляет последовательность во времени неотрицательных спектральных пиков. Остальные составляющие сигнала, например, фоновая составляющая, шумы, помехи обычно удаляются на начальных этапах обработки. При этом на последующих этапах часто возникает необходимость анализа нестационарных процессов. Это такие процессы, в которых некоторые параметры сигналов меняются во времени. Причем время здесь может пониматься условно. В общем случае это та физическая характеристика, в которой калибруется шкала спектра — ось абсцисс графика. Так, в фотоспектрометрии это длина волны фотона, в масс-спектрометрии — молекулярная

масса, в фотоэлектронной спектроскопии — энергия связи электронов в атоме и т. п.

Наиболее характерным примером нестационарного процесса является совокупность сигналов сиквенс-анализа фрагмента ДНК по Сэнгеру методом капиллярного электрофореза. Фореграмма — зарегистрированные в результате электрофореза данные, состоит из 4 спектров или 4 цветовых каналов, именуемых «А», «С», «G» и «Т», в единой шкале времени. Один из основных параметров фореграммы — ширина одиночных спектральных пиков на полувысоте. С точки зрения информации, одиночный спектральный пик в сигнале канала «А», «С», «G» или «Т» означает тип молекулы ДНК, находящейся на конце фрагмента с порядковым номером, которому соответствует число молекул в составе фрагмента. При анализе длинных фрагментов ДНК — порядка 1000 и более нуклеотидов, значения данного параметра существенно меняются во времени. На рис. 1 показан один из четырех спектров фореграммы, состоящей из порядка 750 нуклеотидов, в котором путем многократного дифференцирования четного порядка предварительно обнаружены «полезные» пики. В остальных спектрах (каналах) пики находятся аналогичным образом. Из обнаруженных во всех спектрах пиков формируется общая статистика, состоящая из номера пика, времени его выхода и ширины на полувысоте. Номер пика в статистике определяется временем выхода (увеличивается в порядке его возрастания). На рис. 2 показана зависимость ширины спектральных пиков на полувысоте от времени их выхода.

Как видно из рис. 2, ширина пика на полувысоте в течение всей регистрации спектра не постоянна. На кривой по сканированным данным ближе к концу времени регистрации наблюдается достаточно большое количество выбросов. Это обусловлено наложением пиков друг на друга (образованием «пачек»), и при сканировании принимается в расчет ширина всей пачки. Поскольку одной из главных задач обработки спектров фореграммы является обнаружение одиночных пиков, в частности, выделение их из «пачек», непостоянство ширины спектральных пиков образует задачу выбора математических средств обработки.

Преобразование нестационарного спектра в стационарный при некоторых условиях может быть выполнено переносом точек



Рис. 1. Предварительный поиск пиков в канале «А» фореграммы



Рис. 2. Зависимость ширины спектральных пиков на полувысоте от времени выхода

(отсчетов) исходного нестационарного спектра на шкалу выходного стационарного спектра со сдвигом по времени, пропорциональным отличию интервала параметра нестационарности от некоторого значения, заданного как соответствующий постоянный интервал выходного спектра. Этот последний интервал в частном случае может быть равным среднему значению интервала в исходном спектре.

В докладе рассматриваются алгоритмы преобразования нестационарных сигналов в стационарные и результаты тестирования этих алгоритмов. Алгоритмы протестированы на математических моделях и на реальных фореграммах. По результатам разработки и тестирования сделаны следующие выводы.

Использование обратной функции шкалы времени позволяет скорректировать нелинейную шкалу времени, которая является одним из элементов нестационарности нестационарных случайных процессов в задачах спектрометрии.

Для построения обратной функции шкалы времени необходимо произвести обнаружение спектральных пиков, проинтегрировать зависимость расстояний между пиками от времени, а затем в полученной функции заменить зависимость переменной по вертикальной оси от переменной по горизонтальной оси зависимостью переменной по горизонтальной оси от переменной по вертикальной оси.

После построения обратной функции отсчеты спектра в новой шкале необходимо вычислять при помощи интерполяции между соответствующими соседними отсчетами шкалы времени.

Интерполяция между соответствующими соседними отсчетами шкалы времени может осуществляться методом наименьших квадратов при помощи полинома, степень которого выбирается путем минимизации суммы квадратов отклонений между экспериментальными отсчетами времени и аппроксимирующего полинома.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию № 075-00444-25-00 (от 26.12.2024).

ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИИ ВНУТРЕННЕЙ ПОВЕРХНОСТИ КАПИЛЛЯРОВ НА КАЧЕСТВО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ПО СЕНГЕРУ

К. Д. Ващенко^{1,2,*}, Я. И. Алексеев^{1,2}, А. С. Альдекеева¹, В. Е. Курочкин¹
* KrisstinaVash@yandex.ru

¹ Институт аналитического приборостроения РАН, г. Санкт-Петербург, 198095, ул. Ивана Черных, 31-33, лит. А.

² НПФ Синтол, 127434, Москва, ул. Тимирязевская, 42, корп. Б

Капиллярный электрофорез, являясь ключевым этапом секвенирования ДНК по Сенгеру, критически зависит от состояния поверхности капилляра. Наличие свободных гидроксильных групп связи Si-OH на поверхности капилляров и захват протонов этих групп молекулами воды при включении электрического поля порождает электроосмотический поток (ЭОП), который направлен в сторону, противоположную движению ДНК-фрагментов, что снижает разрешение и качество расшифровки нуклеотидной последовательности [1]. В работе проведена оценка влияния модификации внутренней поверхности капилляров на качество данных секвенирования ДНК. В качестве модифицирующих агентов были выбраны триалкоксисиланы, содержащие 4 функциональные группы различной природы: 3-Глицидоксипропилтриметоксисилан (**1**), 3-(Триметоксисилил)пропил-метакрилат (**2**), 3-Аминопропилтриэтоксисилан (**3**), 3-(Триэтоксисилил)пропилсукциновый ангидрид (**4**). Для контроля использовали капилляры до модификации.

Внутренняя поверхность предварительно обработанных водным раствором соляной кислоты 0,5 М (промывка на насосе 30 минут) капилляров модифицировалась путем инкубации в течение 40 минут при температуре 23 °С реакционной смесью, содержащей 830 мкл этилового спирта, 150 мкл воды лабораторного качества, 16 мкл уксусной кислоты (катализатор гидролиза) и 4 мкл силанизирующего агента. После инкубации линейка последовательно промывалась этиловым спиртом и водой для удаления непрореагировавших реагентов.

Для оценки качества до и после модификации капилляров проводили секвенирование контрольного образца плазмиды pGEM-3Z из набора Генсек (ООО «НПФ Синтол», Россия) на приборе «Нанофор 05» (ИАП РАН, Россия) в соответствии со стандартным протоколом. Капилляры заполняли полимером ПДМА-6 (ООО «НПФ Синтол», Россия).

Влияние модификации поверхности капилляров оценивали путем сравнения результатов расшифровки, полученных на одной и той же линейке капилляров ЛК-50 (ИАП РАН, Россия) до и после силанизации с помощью программы Mutation Surveyor V5.1 (Soft Genetics, США) (табл. 1).

Таблица 1. Сравнение длины расшифровки плазмиды pGEM-3Z до и после силанизации

Параметр	Контроль	1	2	3	4
Средняя длина прочтения (п. н.)	720±5	715±5	690±8	721±5	690±4

Анализ данных не выявил статистически значимого изменения длины прочтения после силанизации ни одним из протестированных модифицирующих агентов по сравнению с контролем. Полученные результаты показывают, что гель на основе полидиметилакриламида (ПДМА), используемый в качестве разделяющей фрагменты ДНК среды в капиллярной линейке, обеспечивает высокое качество разделения в немодифицированных капиллярах.

Литература

1. Хроматографические методы анализа. Часть 3. Капиллярный газо-жидкостный хроматографический анализ [Электронный ресурс] // Химический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова. URL: <https://www.chem.msu.ru/rus/teaching/analyt/chrom/part3.pdf>

СРАВНЕНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ШАБЛОНОВ ДЛЯ ДАННЫХ МАССОВОГО ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

А. Ю. Ямановская*, А. Г. Бородинов, В. В. Манойлов, А. И. Петров,
В. Е. Курочкин

* iamanovskaia.ai@iapran.ru

*Институт аналитического приборостроения РАН, 198095,
Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А*

Массовое параллельное секвенирование (МПС) — это технология, обеспечивающая считывание миллионов коротких фрагментов ДНК (ридов) [1]. Риды формируются на основе регистрации флуоресцентных сигналов, излучаемых множественными кластерами ДНК, закрепленными на поверхности реакционной ячейки.

В Институте аналитического приборостроения РАН технология МПС реализована в секвенаторе «Нанофор СПС», который обеспечивает полный цикл обработки данных — от регистрации изображений до восстановления нуклеотидных последовательностей [2]. Одним из ключевых этапов первичной обработки данных МПС является построение шаблона — совокупности координат, каждая из которых соответствует отдельному кластеру, являющемуся источником рида [3].

В данной работе представлен альтернативный метод генерации шаблонов с добавлением этапа адаптивного подавления фона. За контрольные методы генерации шаблона взяты ПО «Нанофор СПС» и ПО компании Illumina «Real-Time Analysis (RTA) software». Представленный метод реализован на языке Python в модуле **template generator**. Описание входных и выходных данных для генерации шаблона приведено на рис. 1.

Сравнение методов проводилось по принципу пространственной схожести наборов точек в двухмерном пространстве с помощью ранее разработанного модуля **Mapped points distribution (MPD)**. Следует отметить, что для каждого тайла можно составить таблицу координат его кластеров, однако такая таблица не является шаблоном, так как

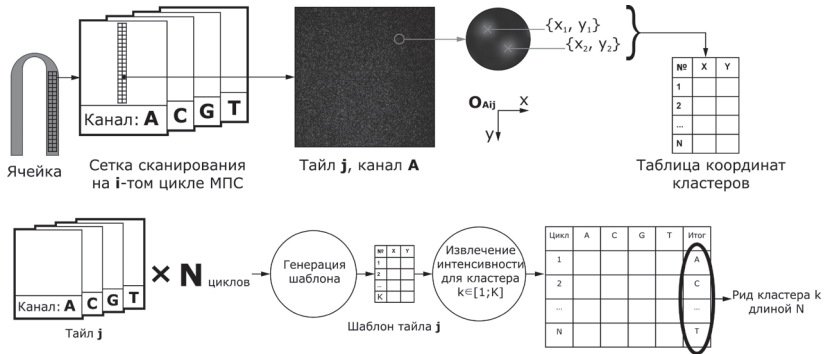


Рис. 1. Описание источника данных для генерации шаблона и формата выходных данных

каждое изображение имеет свою систему координат $O_{\text{Тайла}}$ на каждом цикле и канале в силу физических ограничений оптической системы прибора и все кластеры не будут излучать сигнал в течение одного цикла только в одном канале.

В результате сравнительного анализа были представлены результаты построения шаблонов от трех различных алгоритмов и сгенерирован отчет о пространственных характеристиках полученных шаблонов. Наибольшее совпадение с контрольными методами показал шаблон, построенный по принципу подавления базовой линии фона и сравнения локальных областей изображения с ядром Гаусса. Было достигнуто покрытие 63 % координат контрольных кластеров RTA при допустимой ошибке в 10 пикселей.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию № 075-00444-25-00 от 26.12.2024.

Литература

1. Манойлов В. В. и др. Алгоритмы обработки изображений в секвенаторе ДНК «Нанофор СПС» // Журнал технической физики. 2022. Т. 92. № 7. С. 985–992.

2. Kurochkin V. E. et al. Domestic devices for molecular genetic analysis: developments of the IAP RAS and SINTOL LLC //Russian Military Medical Academy Reports. 2021. Т. 40. № 3. Р. 69–74.

3. Манойлов В. В. и др. Алгоритмы обработки сигналов флуоресценции массового параллельного секвенирования нуклеиновых кислот //Информатика и автоматизация. 2019. Т. 18. № 4. С. 1010–1036.

4. Abnizova I. et al. Statistical comparison of methods to estimate the error probability in short-read Illumina se-quencing //Journal of Bioinformatics and Computational Biology. 2010. Т. 8. № 03. Р. 579–591.

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗАТОРА «НАНОФОР 05» ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НА ПРИМЕРЕ НАБОРОВ ДЛЯ АНАЛИЗА ГЕНОВ HTT, AR И UGT1A1

**Д. А. Исаев^{1,*}, Я. И. Алексеев^{1,2}, Н. В. Коновалова¹, Н. Ю. Абрамычева³,
В. Д. Назаров⁴**

** isaevde92@yandex.ru*

¹ *НПФ Синтол, 127434, Москва, ул. Тимирязевская, 42, корп. Б*

² *Институт аналитического приборостроения РАН, 198095,
Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А*

³ *Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Российский
центр неврологии и нейронаук», 125367, Москва, Волоколамское шоссе, 80*

⁴ *Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И. П. Павлова — ПСПбГМУ, 197022, Санкт-Петербург,
ул. Льва Толстого, 6/8*

Современная молекулярная диагностика наследственных заболеваний предъявляет высокие требования к оборудованию: оно должно быть не только точным, но и универсальным, эффективным и интегрируемым в рутинную работу клинической лаборатории. Генетический анализатор «Нанофор 05» зарекомендовал себя

как надежная платформа для решения широкого спектра задач [1, 2]. Первым и ключевым преимуществом «Нанофора 05» является его способность служить единой платформой для разнородных типов мутаций. Принцип капиллярного электрофореза с флуоресцентной детекцией, лежащий в его основе, обеспечивает высочайшее разрешение и точность определения длины фрагментов ДНК. На примере трех различных диагностических направлений: анализ генов НТТ (хорея Хантингтона), AR (спинально-бульбарная мышечная атрофия) и UGT1A1 (синдром Жильбера) мы наглядно оценили возможности анализатора.

Ген НТТ (хорея Хантингтона). Основная задача здесь — точное определение числа CAG-повторов, где от разницы в несколько повторов зависит диагноз. «Нанофор 05» блестяще справляется с этим благодаря высокому разрешению. На электрофореграммах (рис. 1-1) мы получаем четкие, узкие пики, что позволяет однозначно дифференцировать нормальные аллели от патологических. Опыт показал, что прибор исключает ошибки визуальной оценки, присущие результатам, полученным при анализе продуктов амплификации в агарозном геле, и обеспечивает получение точных данных, критически важных для постановки диагноза.

Ген AR (болезнь Кеннеди). Мутация в гене AR также представляет собой экспансию CAG-повторов. Работа с набором для AR также подтвердила высокую точность получаемых результатов, позволяющих однозначно отличать число повторов, соответствующее норме и патологии (рис. 1-2).

Ген UGT1A1 (синдром Жильбера). Здесь задача принципиально иная: не требуется измерять большие экспансии, а необходимо надежно различать аллели с минимальной разницей в 2 нуклеотида (например, генотипы (ТА)6/6, 6/7 и 7/7). Именно для такого рода исследований особенно важным является возможность однонуклеотидного разрешения, которую обеспечивает «Нанофор 05». Опыт валидации метода показал 100 % совпадение результатов с данными эталонного метода (рис. 1-3).

С практической точки зрения, использование «Нанофора 05» оказалось экономически оправданным. Объединение нескольких

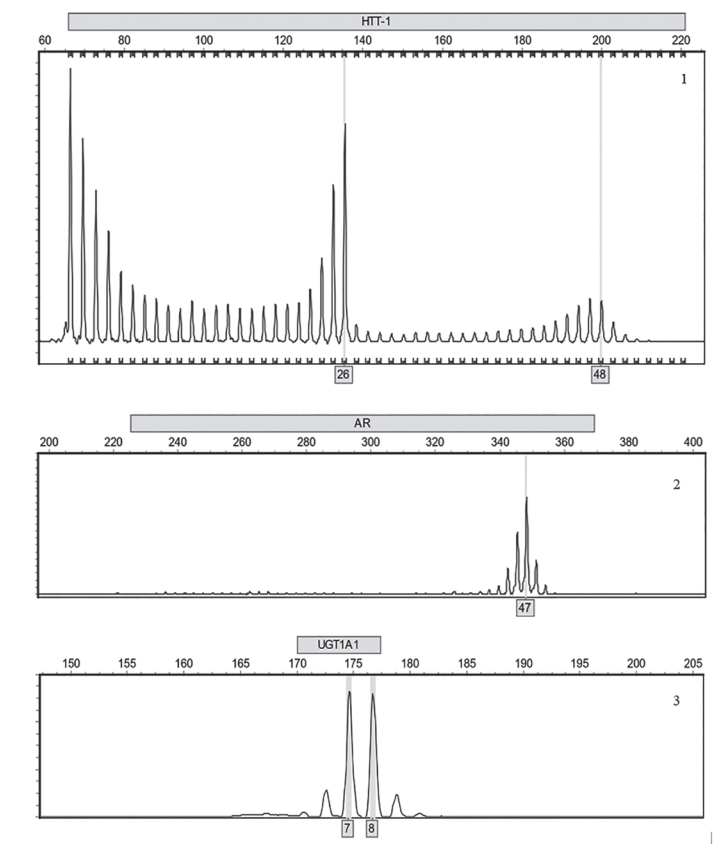


Рис. 1. Электрофореграммы фрагментного анализа трех разных наборов на генетическом анализаторе «Нанофор 05»: 1 — образец с генотипом (CAG)26/(CAG)48 в маркере HTT, 2 — образец с генотипом (CAG)47/(CAG)47 в маркере AR, 3 — образец с генотипом (TA)7/(TA)8 в маркере UGT1A1

диагностических услуг на одной платформе снижает удельную стоимость одного анализа. Скорость проведения исследования и простота обслуживания прибора позволяют оперативно выдавать результаты врачам-клиницистам, что ускоряет постановку диагноза для пациентов.

Таким образом, генетический анализатор «Нанофор 05» подтвердил свою эффективность как для анализа динамических мутаций (НТТ. AR), так и для точного определения коротких tandemных повторов (UGT1A1).

Литература

1. Генетический анализатор Нанофор 05 в качестве средства измерений при секвенировании ДНК / Волков А. А., Волков И. А., Плугов А. Г., Кулябина Е. В., Мелкова О. Н., Лавров Г. С., Бочарова Д. В., Алексеев Я. И. // Измерительная техника. 2021. № 1. С. 60–65. <https://doi.org/10.32446/0368-1025it.2021-1-60-65>
2. Сайнакова А. Б., Романова М. С., Красников С. Н., Литвинчук О. В., Алексеев Я. И., Никулин А. В., Терентьева Е. В. Исследование коллекционных образцов картофеля на наличие генетических маркеров устойчивости к фитопатогенам. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):18-24. DOI 10.18699/VJ18.326

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ХИМИЧЕСКОЙ ЛИНЕАРИЗАЦИИ ДНК ДЛЯ РЕАЛИЗАЦИИ ПАРНОКОНЦЕВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ В ПРИБОРАХ МАССОВОГО ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

М. А. Малахова¹, **Я. И. Алексеев**^{1,2,*}, А. А. Першин¹, М. В. Калашников¹,
А. А. Пушкин^{1,2}, В. Е. Курочкин²
* jalex@syntol.ru

¹ ННПФ Синтол, 127434, Москва, ул. Тимирязевская, 42, корп. Б

² Институт аналитического приборостроения РАН, 198095,
Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А

В настоящее время в современных секвенаторах для реализации метода массового параллельного секвенирования ДНК используют сложные реакционные смеси, содержащие различные ферменты

нуклеинового обмена. Так, для направленного расщепления одной из цепей в колониях ДНК, сгенерированных в ходе мостиковой амплификации, используют ферменты Урацил-ДНК-гликозилазу из *E.coli*, выщепляющую из дуплекса нуклеозид dU, что приводит к удалению одной из цепей ДНК (линеаризация первой цепи) и Fpg-ДНК-гликозилазу из *E.coli*, расщепляющую вторую цепь по модифицированному аналогу гуанозина 8-охо-dG (линеаризация второй цепи) [1]. Основной проблемой является ограниченный срок годности таких ферментов в активном состоянии даже при соблюдении рекомендуемых условий хранения (не более 1 года при -20°C). Вторым ограничением является высокая стоимость фермента Fpg-ДНК-гликозилазы.

Для решения указанных проблем нами был разработан подход, использующий не ферментативное, а направленное химическое расщепление цепи ДНК. В качестве такой реакции нами была выбрана хорошо изученная реакция периодатного расщепления цис-диольных групп [2]. Для введения диольной группы в состав синтетического олигонуклеотида был разработан четырехстадийный синтез (2R,3R)-1-((6-(бис(4-метоксифенил)(фенил)метокси)гексил)амино)-4-(((6-(((2-цианозтокси)(диизопропиламино)фосфинил)окси)гексил)амино)-1,4-диоксобутан-2,3-диил диацетат (синтез будет опубликован отдельно). Затем был синтезирован якорный олигонуклеотид P7-диол, содержащий внутри вставку диольной группы. Были подобраны условия селективного расщепления диольной группы в олигонуклеотиде периодатом натрия и показано, что раствор периодата натрия является стабильным в течение года при хранении на -20°C (рис. 1).

Методом радикальной сополимеризации [3] поверхность ячеек была покрыта «газоном» из олигонуклеотидов P5 (содержащим dU) и P7-диол. Полученная ячейка была использована для генерации молекулярных колоний и последующего парноконцевого секвенирования контрольной ДНК Phix на секвенаторах «Нанофор СПС» (ООО «НПФ Синтол») и Miseq (Illumina, США). Полученные результаты показали, что эффективность линеаризации второй цепи и качество обратного прочтения сопоставимы с результатами ана-

логичного запуска на стандартных ячейках производства компании «Иллюмина» с ферментативной линеаризацией.

В табл. 1 представлены результаты выравнивания чтений, полученных с использованием олигонуклеотидов P5 (содержащим dU) и P7-диол. Для выравнивания использовался алгоритм BWA-MEM и парноконцевые чтения в 75 циклов.

Таким образом, нами разработан подход, позволяющий проводить селективное химическое расщепление цепи ДНК в ходе

Таблица 1. Показатели выравнивания чтений на референсный геном

Качество	Прямое чтение, %	Обратное чтение, %
MAPQ > 30	93	71,6
MAPQ < 30	0,3	0,2
MAPQ < 10	0	0
Невыровненные	6,7	28,2

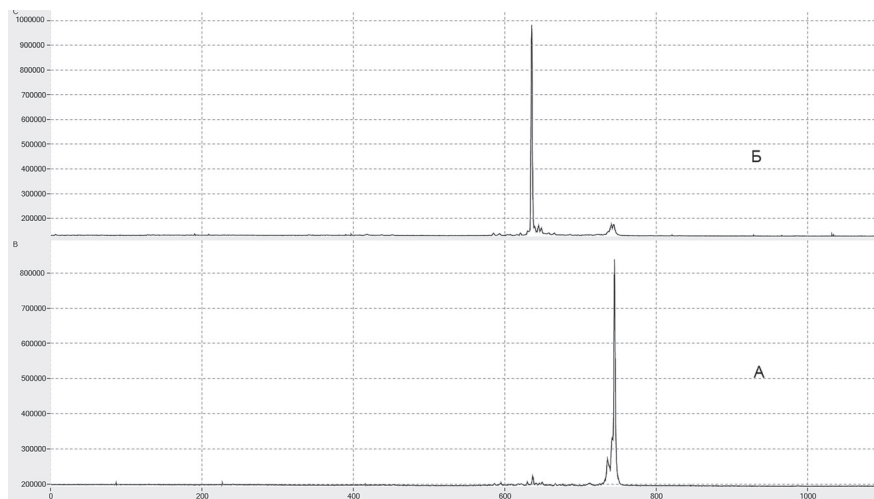


Рис. 1. Результат расщепления олигонуклеотида 6-FAM-P7-T10-диол раствором периодата натрия: А — исходный олигонуклеотид, Б — расщепленный по диольной группе олигонуклеотид. Данные получены на приборе «Нанофор 05» (ИАП РАН, Россия)

реализации методики массового параллельного секвенирования на приборах «Нанофор СПС» и Miseq. Данный подход обеспечивает высокое качество парноконцевого секвенирования ДНК, а используемый химический реагент является более стабильным и дешевым по сравнению со стандартно применяемым ферментом Frg-ДНК-гликозилазой из *E.coli*.

Литература

1. Алексеев Я. И., Петров А. И., Чубинский-Надеждин И. В., Резник В. С., Никаноров В. В., Пушкин А. А., Ващенко К. Д., Герасимов К. Е., Квон Д. А., Веретенников А. В., Воробьев А. А., Кудряшов В. А., Евстапов А. А., Курочкин В. Е. Первый отечественный прибор для массового параллельного секвенирования ДНК Нанофор СПС. Биомика. 2025. 17(2). 121–132. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-9
2. Органическая химия. В 4 частях. Ч. 2: Учеб. для студентов вузов, обучающихся по направлению и специальности «Химия» / Реутов О. А., Курц А. Л., Бутин К. П. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2004. 894 с.
3. Khrapko K. R., Lysov Yu. P., Khorlin A. A., Ivanov I. B., Yershov G. M., Vasilenko S. K., Florentiev V. L., Mirzabekov A. D. A method for DNA sequencing by hybridization with oligonucleotide matrix. // DNA Seq. 1991. Т. 1, № 6. Р. 375–388.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПЕРВИЧНЫХ ДАННЫХ ПРИ ОДНОМОЛЕКУЛЯРНОМ СЕКВЕНИРОВАНИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

**Е. К. Васильева^{1,*}, И. В. Чубинский-Надеждин¹, А. С. Букатин^{1,2},
В. В. Манойлов¹
* virtkat@mail.ru**

¹ *Институт аналитического приборостроения РАН, 198095,
Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А*

² *СПбАУ РАН им. Ж. И. Алферова, 194021, Санкт-Петербург, ул. Хлопина, 8/3,
лит. А*

Секвенирование одиночных, не объединенных в кластеры молекул ДНК в реальном времени интересный и перспективный метод третьего поколения, нацеленный на получение ридов, длительность которых составляет тысячи пар нуклеотидов. Получение длинных ридов может обеспечить расшифровку фрагментов генома, включающих в себя длинные повторяющиеся и гомологичные участки. На сегодняшний день существует две основных технологии одно-молекулярного секвенирования, предложенные компаниями Pacific Biosciences [1] и Oxford Nanopore Technologies [2].

Высокая стоимость и сложность проведения такого секвенирования, а также отсутствие достаточного количества первичных данных в свободном доступе диктует необходимость имитационного моделирования систем детектирования для таких приборов. Наличие модельных первичных данных открывает возможности для разработок алгоритмов определения последовательности и алгоритмов биоинформатической обработки без необходимости постоянной работы с секвенатором.

Существует несколько программных симуляторов длинных последовательностей, таких как SimLoRD, NPBSS и некоторых других [3], позволяющих получать длинные риды с моделированием различных ошибок чтения. Известен симулятор первичных данных для нанопорового секвенирования [4]. Однако не существует симуляторов

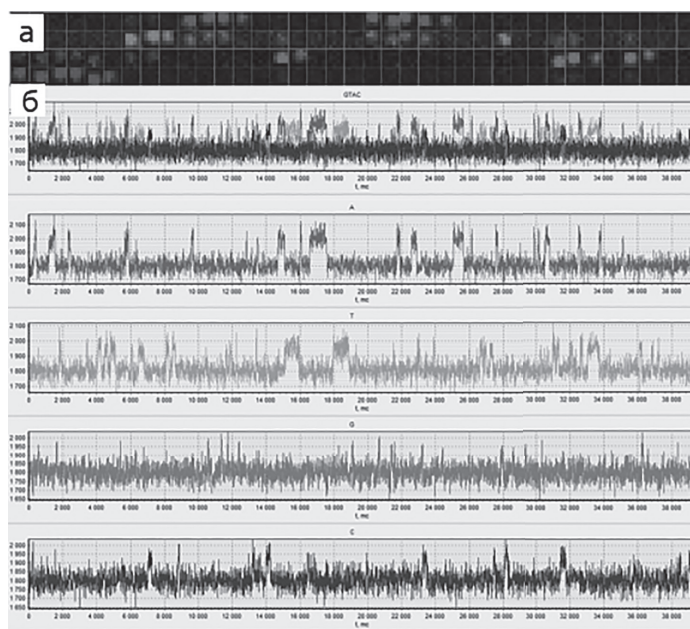


Рис. 1. Симуляция данных одномолекулярного секвенатора для одного наноколодца с заданной модельной последовательностью из 100 нуклеотидов: CCAGCAGTTATTTTGAATTCTTCAGGCGTGTTGACCT ACCATACCAGTGTCTGGCTGAATTGCTGAAATTTTCAGCGGAATGAT TCTTATTAAGTGTCCC в форматах: а) movie, б) trace

первичных данных для метода секвенирования одиночных молекул внутри наноколодцев — наноструктур, называемых волноводами нулевой моды, или ZMW (zero mode waveguide).

Предлагаемая работа описывает стохастическую имитационную модель формирования первичных данных для одномолекулярного секвенатора с многофакторной имитацией сигналов его детектора, учитывающую вероятностный характер процесса встраивания меченых нуклеотидов в цепь ДНК. Разработанная на базе предложенной модели программа-симулятор первичных цифровых данных обеспечивает на выходе полную имитацию результатов секвенирования в стандартных форматах fasta, trace и movie — рис. 1. На вход симуля-

тора может быть подана сформированная модельная последовательность или реальная последовательность нуклеотидов, полученная из геномной базы.

Симулятор не имеет аналогов и был использован для распознавания флуоресцирующих нуклеотидов в сериях изображений первичных данных, для обнаружения сигналов в алгоритмах base-calling и в задачах биоинформатической обработки.

Литература

1. J. Eid et al. Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules // Science. 2009 Jan 2;323(5910):133–8. doi: 10.1126/science.1162986. Epub 2008 Nov 20.
2. Xu, Y., Luo, H., Wang, Z., Lam, H.-M. & Huang, C. Oxford nanopore technology: revolutionizing genomics research in plants // Trends Plant Sci. 27, 510–511 (2022).
3. Bianca K Stöcker et al. SimLoRD: Simulation of Long Read Data, Bioinformatics 2016 Sep 1;32(17):2704–6. doi: 10.1093/bioinformatics/btw286. Epub 2016 May 10.
4. Christian Rohrandt, Nadine Kraft, Pay Gießelmann, Björn Brändl, Bernhard M. Schuldt, Ulrich Jetzek, Franz-Josef Müller. Nanopore SimulatION — a raw data simulator for Nanopore Sequencing. 2018 IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine (BIBM).

РАЗРАБОТКА ГИРОТРОНА С ХОЛОДНЫМ ПОЛЕВЫМ ЭМИТТЕРОМ ДЛЯ СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИХ ПРИЛОЖЕНИЙ

С. П. Тарадаев*, Е. П. Тарадаев, Г. Г. Соминский

* Sergio.tardv@gmail.com

*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29*

Субмиллиметровые источники излучения, в первую очередь гиротроны, стали важным компонентом в спектроскопии ядерного магнитного резонанса с динамической поляризацией ядер (DNP-NMR). Преимущество метода — значительное повышение чувствительности по сравнению с традиционной ЯМР-спектроскопией, достигаемое за счет переноса высокой спиновой поляризации от неспаренных электронов на ядра. На практике это позволяет усилить ЯМР-сигнал в десятки-сотни раз, сократить время сбора данных на несколько порядков и исследовать образцы, ранее недоступные для ЯМР-анализа, — например, разбавленные растворы, твердые биологические материалы или поверхности катализаторов [1]. Эффективность DNP-NMR делает его незаменимым инструментом для изучения сложных биологических объектов, таких как крупные белковые комплексы, мембранные белки, амилоидные фибриллы и нуклеиновые кислоты. Эти молекулы часто характеризуются низкой концентрацией, медленной молекулярной динамикой или низким естественным содержанием ЯМР-активных ядер (например, ^{13}C , ^{15}N), что делает их анализ классическими методами ЯМР крайне затруднительным.

В современных установках DNP-NMR для генерации когерентного субмиллиметрового излучения требуемой мощности применяются гиротроны [2]. Эти вакуумные приборы обеспечивают выходную мощность в десятки ватт на частотах электронного спинового резонанса (140, 263, 394, 460 ГГц и выше) [3], что соответствует рабочим частотам ЯМР-спектрометров (200, 400, 600 МГц) для ядер ^1H . Как и большинство СВЧ-устройств, гиротроны для формирования

электронного потока традиционно используют термокатоды. Однако в компактных приборах малой мощности нагрев катода приводит к паразитному тепловыделению, что усложняет конструкцию и может вызывать нестабильность выходных параметров.

Перспективной альтернативой для этого класса устройств являются полевые эмиттеры. Их основные преимущества — отсутствие необходимости нагрева и практически безынерционность, что позволяет устранить нагрев и инерционность накала. В лаборатории сильноточной и СВЧ-электроники СПбПУ ведутся работы по разработке и исследованию полевых эмиттеров, а также электронно-оптических систем (ЭОС) [4–5] для различных электровакуумных приборов. Разработанные многоострийные полевые эмиттеры с двухслойным защитным покрытием способны обеспечить токи эмиссии свыше 100 мА и стабильно работают в условиях технического вакуума. Совместно с коллегами из ИПФ РАН (Нижний Новгород) проводится работа над созданием диагностического гиротрона, работающего на частоте в 140 ГГц с ЭОС с многоострийным катодом [6–7].

Ранее были исследованы электронные потоки, формируемые ЭОС с многоострийным полевым катодом [5]. На данном этапе основной задачей являлось выведение гиротрона на режим генерации и измерение параметров излучения. В ходе экспериментов оценивалось влияние на амплитуду выходного сигнала следующих факторов: полного тока пучка, энергии электронов и напряженности магнитного поля в центре резонатора.

Мощность излучения измерялась с помощью калиброванного диодного детектора, установленного на расстоянии 15 см от выходного окна гиротрона. Детектор можно было поворачивать относительно нормали к оси прибора для оценки диаграммы направленности. Измерения проводились в режиме одиночных импульсов с интервалом между ними 5–7 минут.

Основным результатом работы стала демонстрация работоспособности гиротрона с многоострийным полевым эмиттером. При токе пучка ~100 мА была достигнута пиковая выходная мощность около 13 Вт, что достаточно для ряда спектроскопических приложений, включая DNP-NMR.

Благодарности

Работа выполнена в соответствии с государственным заданием Российской Федерации по теме FSEG-2023-0016. Часть работ выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-29-00224).

Литература

1. Barnes A. B. et al. High-field dynamic nuclear polarization for solid and solution biological NMR // Applied magnetic resonance. 2008. Т. 34. № 3. P. 237–263.
2. Sabchevski S., Glyavin M. Development and application of THz gyrotrons for advanced spectroscopic methods // Photonics. MDPI, 2023. Т. 10. № 2. P. 189.
3. Глявин М. Ю. и др. Источники мощного терагерцевого излучения для спектроскопии и диагностики различных сред // Успехи физических наук. 2016. Т. 186. № 6. P. 667–677.
4. Taradaev E., Sominskii G. Characteristics of an Annular Electron Flow Formed by an Electron Gun with a Field Emitter // IEEE Transactions on Electron Devices. 2022. Vol. 69, № 5. P. 2675–2679.
5. Sominskii G. et al. Formation of an Annular Electron Beam for Subterahertz Gyrotrons Using an Electron-Optical System With a Multitip Field Emitter // IEEE Transactions on Electron Devices. 2024.

РАДИОЧАСТОТНЫЕ КАНАЛЫ ДЛЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ ИОНОВ, ИСПОЛЬЗУЮЩИЕ МУЛЬТИПОЛЬНОЕ СЕГМЕНТИРОВАНИЕ ЭЛЕКТРОДОВ

С. В. Масюкевич^{1,*}, Л. А. Лисицын^{1,2}, А. С. Бердников¹
* serg_08@mail.ru

¹ Институт аналитического приборостроения РАН, 198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А

² ООО Люмэкс, г. Санкт-Петербург, 195220, ул. Обручевых, 1, лит. «Б»

При моделировании радиочастотных ионных ловушек, транспортирующих устройств и фокусирующих воронок с геометрией электродов типа SRIG (Stacked Ring Ion Guides), называемых также «этажерка» (см. рис. 1 и ссылку [1]), полезным инструментом являются аналитические решения для электрических потенциалов соответствующих электрических полей. Несмотря на то, что эти аналитические выражения используют специальные функции математической физики, выигрыш в скорости моделирования оказывается колоссальным.

В докладе исследуются элементарные формулы для цилиндрических и конических каналов типа «этажерка», где формирующие канал плоские диафрагмы могут иметь некруговую форму или даже использовать мультипольное сегментирование. Применение линейных комбинаций рассматриваемых аналитических выражений позволяет значительно разнообразить список вариантов потенциалов электрического поля и, соответственно, список конструкций транспортирующих устройств, предназначенных для исследования.

На примере транспортирующего устройства с квадрупольным сегментированием круговых диафрагм, которое рассматривается в [2], с помощью элементарных вычислений псевдопотенциала высокочастотного электрического поля (см. [1, 3]) показано, что это устройство неработоспособно. Действительно, в стенках профиля радиочастотного псевдопотенциального барьера, ограничивающего ионы от разбега в разные стороны, в определенных точках

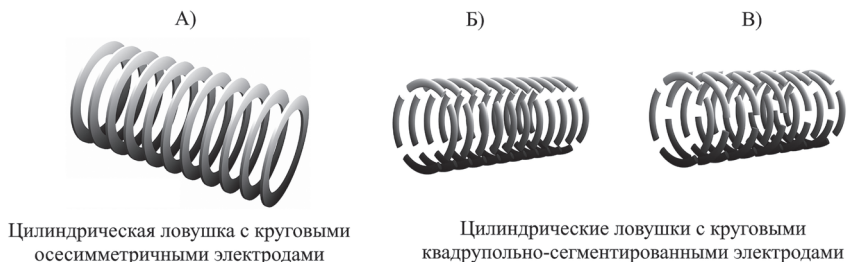


Рис. 1. Конфигурация кольцевых электродов радиочастотных цилиндрических ловушек типа «этажерка»: А) ловушка с цилиндрическим профилем канала и круговыми электродами, Б) ловушка с цилиндрическим профилем канала и идентичными квадрупольно-сегментированными электродами, В) ловушка с цилиндрическим профилем канала и развернутыми относительно друг друга квадрупольно-сегментированными электродами

имеются существенные «дырки» в диагональном направлении, через которые возможна утечка ионов. В силу этого в макете устройства [2] авторам разработки приходится использовать неоправданно широкие диафрагмы, чтобы избежать утечек ионов в моменты пересечения ионами критических сечений канала, где псевдопотенциальный барьер будет разомкнутым. Показано, что работоспособность этого устройства можно восстановить, если использовать развернутые на половину мультипольного угла соседние мультипольно-сегментированные электроды или же использовать для идентичных мультипольно-сегментированных электродов устройства четырехфазные электрические напряжения.

Также рассматривается функционирование конических ионных воронок с меняющимися по линейному или квадратичному закону радиусами плоских диафрагм (в том числе некруговых и мультипольно-сегментированных), расположенных с постоянным шагом сдвига вдоль прямолинейного канала транспортировки. Рассматриваемые радиочастотные цилиндрические каналы транспортировки и ионные воронки могут использовать двухфазные высокочастотные электрические напряжения [1], или четырехфазные высокочастотные электрические напряжения [4], или амплитудно-модулирован-

ные высокочастотные электрические напряжения, обеспечивающие эффект транспортировки ионов по методу А-волны [5]. Для моделирования соответствующих высокочастотных электрических полей используются аналитические формулы, частным случаем которых являются формулы, опубликованные в [6].

Более полный список работ авторов доклада, в которых исследуются аналитические модели электрических полей радиочастотных воронок со сложным профилем транспортирующего канала и сложной формой ограничивающих канал электродов, был удален по требованию рецензента из-за подозрения в избыточном самоцитировании. К сожалению, работы других авторов, посвященные исследованию радиочастотных воронок и анализу особенностей их работы, используют исключительно численно рассчитываемые электрические поля без привлечения аналитических моделей (в силу сложности нахождения аналитических решений уравнения Лапласа), что делает получаемые этими авторами результаты существенно менее прозрачными и менее общими. Примером является, в частности, транспортирующее устройство с квадрупольным сегментированием круговых диафрагм, которое рассматривается в [2], неустранимые дефекты функционирования которого так и остались не замеченными авторами предлагаемой конструкции.

Благодарности

Исследование выполнено в рамках темы FFZM-2025-0006 Государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-00444-25-00 от 26.12.2024 для ИАП РАН.

Литература

1. Gerlich D. Inhomogeneous RF fields: a versatile tool for the study of processes with slow ions. // in: Ng Cheuk-Yiu, Baer M. (Eds.), State-selected and state-to-state ion—molecule reaction dynamics. Part 1: Experiment, advances in chemical physics series, vol. LXXXII, John Wiley & Sons Inc., New York, 1992. P. 1—176.
2. Bao X., Zhang Q., Liang Q., Sun Q., Xu W., Lu Y., Xia L., Liu Y., Zou X., Huang C., Shen C., Yannan Chu Y. Increased Sensitivity in Proton Transfer

Reaction Mass Spectrometry by Using a Novel Focusing Quadrupole Ion Funnel // Anal. Chem., 2022, Vol. 94, P. 13368–13376.

3. Заславский Г. М., Сагдеев Р. З. Введение в нелинейную физику. От маятника до турбулентности и хаоса. М.: Наука, 1988. 368 с.

4. Бердников А. С., Галль Н. Р. Радиочастотные транспортирующие ловушки с периодическими электродами без паразитных областей захвата // Масс-спектрометрия. 2013. Т. 10, № 4. С. 224–229.

5. Андреева А. Д., Бердников А. С. Масс-спектрометрические устройства на основе радиочастотных электрических полей с архимедовыми свойствами // Масс-спектрометрия. 2011. Т. 8, № 4. С. 293–296.

6. Сысоев А. А., Бердников А. С., Масюкевич С. В., Соловьев К. В., Краснова Н. К. Аналитическое исследование режимов работы радиочастотных воронок в газодинамических интерфейсах тандемных квадрупольных масс-спектрометров // Научно-технические ведомости Санкт-Петербургского государственного политехнического университета. Физико-математические науки. 2023. Т. 16, № 4. С. 134–145.

ТРАНСПОРТИРУЮЩАЯ РАДИОЧАСТОТНАЯ ВОРОНКА СЛОЖНОЙ ФОРМЫ КАК ИНТЕРФЕЙСНЫЙ ЭЛЕМЕНТ ДЛЯ СОГЛАСОВАНИЯ АКСЕПТАНСА МАСС-АНАЛИЗАТОРА И ЭМИТТАНСОВ ВАРЬИРУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ ИОНОВ

Л. А. Лисицын^{1,2,*}, А. С. Бердников², М. И. Явор²

*** leolitsyn@gmail.com**

¹ ООО Люмэкс, г. Санкт-Петербург, 195220, ул. Обручевых, 1, лит. «Б»

² Институт аналитического приборостроения РАН, 198095,
Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А

Вопрос эффективного согласования эмиттанса источника ионов (области фазового пространства, соответствующего ионам на выходе источника) и аксептанса масс-анализатора (области фазового про-

странства, соответствующего ионам, проходящих без помех сквозь масс-анализатор от входа и вплоть до детектора) является важным при оптимизации такой важной характеристики масс-спектрометрического прибора, как чувствительность. Специфический характер приобретает эта проблема при использовании одной и той же схемы масс-анализатора в разных прикладных задачах с разными требованиями для входной пробы и, соответственно, с разными способами ионизации пробы (либо с одним и тем же способом ионизации пробы, но работающим в различных режимах ионизации). В таких случаях представляется более эффективным вместо подстройки в каждом отдельном случае параметров акцептанса масс-анализатора под тот или иной эмиттанс ионного источника использовать относительно простое переходное устройство (возможно, с настраиваемыми параметрами), которое обеспечит согласование фиксированного акцептанса масс-анализатора и переменного эмиттанса источника или источников ионов.

В работе исследуются возможности использования для этой цели газонаполненной радиочастотной воронки с высокочастотными электрическими напряжениями, обеспечивающими транспортирующий эффект А-волны [1, 2]. Профиль последовательности круговых диафрагм и периодически повторяющиеся высокочастотные напряжения, прикладываемые к сгруппированным в четверки круговым диафрагмам, показаны на рис. 1.

$$\begin{aligned} U_{4k+1}(t) &= U_a(t) = +U_R \cos(\Omega t) \cos(\omega t + \varphi), & U_{4k+2}(t) &= U_b(t) = +U_R \sin(\Omega t) \cos(\omega t + \varphi), \\ U_{4k+3}(t) &= U_c(t) = -U_R \cos(\Omega t) \cos(\omega t + \varphi), & U_{4k+4}(t) &= U_d(t) = -U_R \sin(\Omega t) \cos(\omega t + \varphi). \end{aligned} \quad (1)$$

Здесь $k = 0, 1, 2, \dots$ это номер группы из четырех последовательных электродов с электрическими напряжениями $U_a(t)$, $U_b(t)$, $U_c(t)$ и $U_d(t)$ соответственно; U_R это амплитуда высокочастотных электрических напряжений, изменяющихся во времени t в соответствии с (1); Ω это «медленная» круговая частота 100 %-й амплитудной синусоидальной и косинусоидальной модуляции несущего высокочастотного синусоидального электрического напряжения; ω это

«быстрая» круговая частота несущего высокочастотного синусоидального электрического напряжения; φ это начальная фаза несущего высокочастотного синусоидального электрического напряжения. При необходимости вместо синусоидальных напряжений могут использоваться импульсные.

Транспортирующий эффект основан на использовании высокочастотных электрических полей с бегущей синусоидальной волной псевдопотенциала вдоль оси устройства [1, 2]. Метод псевдопотенциала для анализа движения заряженных частиц в высокочастотных электрических полях подробно излагается в монографиях [3, 4].

Профиль радиочастотной воронки, показанный на рис. 1, обеспечивает захват ионов в широком диапазоне координат, углов, кинетических энергий и масс с последующим охлаждением ионов за счет столкновений ионов с молекулами нейтрального газа и фокусировкой пучка ионов в узкий «шнур» с практически одинаковым гоменизированным фазовым объемом на выходе. Высокочастотные напряжения вида (1) обеспечивают на оси системы бегущую волну псевдопотенциала, то есть эффект А-волны [1, 2], когда ионы группируются в компактные сгустки и транспортируются от входа к выходу с единой групповой скоростью, зависящей лишь от параметров приложенных высокочастотных напряжений. А-волна обеспечивает отсутствие высокочастотного электрического поля на оси системы в точках минимума псевдопотенциала, где концентрируются сгустки

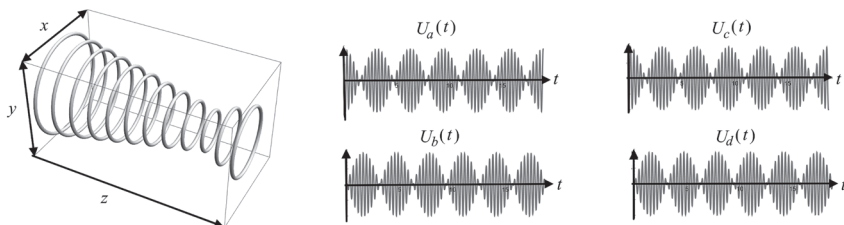


Рис. 1. Конфигурация кольцевых электродов радиочастотной конической воронки с расширяющимся выходом и периодически повторяющиеся высокочастотные напряжения $U_a(t)$, $U_b(t)$, $U_c(t)$ и $U_d(t)$, прикладываемые к последовательно расположенным электродам

ки ионов, что препятствует их паразитной фрагментации. Также транспортировка с помощью А-волны позволяет делать выходную диафрагму существенно меньше при сохранении прежней эффективности вывода ионов в высоковакуумную область, что значительно облегчает работу вакуумных насосов системы дифференциальной откачки. Обратная воронка на выходе устраняет резкий скачок высокочастотного электрического поля и соответствующий ему концентрированный радиочастотный барьер, рассеивающий ранее сфокусированные ионы.

При моделировании работы рассматриваемых устройств использовались псевдопотенциальная модель движения заряженных частиц в высокочастотных электрических полях [3, 4] и аналитические электрические потенциалы радиочастотных воронок, предложенные, в частности, в [5]. Более полный список работ авторов, посвященных исследованию аналитических моделей электрических полей радиочастотных воронок со сложным профилем транспортирующего канала и его электродов, был удален по требованию рецензента из-за подозрения в избыточном самоцитировании.

Благодарности

Исследование выполнено в рамках темы FFZM-2025-0006 Государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-00444-25-00 от 26.12.2024 для ИАП РАН.

Литература

1. Андреева А. Д., Бердников А. С. Масс-спектрометрические устройства на основе радиочастотных электрических полей с архимедовыми свойствами // Масс-спектрометрия. 2011. Т. 8, № 4. С. 293–296.
2. Бердников А. С., Андреева А. Д. Патент на изобретение RU 2465679 от 27.10.2012 (заявка от 05.05.2011).
3. Заславский Г. М., Сагдеев Р. З. Введение в нелинейную физику. От маятника до турбулентности и хаоса. М.: Наука, 1988. 368 с.
4. Gerlich D. Inhomogeneous RF fields: A versatile tool for the study of processes with slow ions // Ng Ch.-Y., Baer M. (Eds.). State-selected and state-to-state ion–molecule reaction dynamics. Part 1: Experiment (Book Series:

Advances in Chemical Physics. Vol. LXXXII). New York: John Wiley & Sons Inc., 1992.

5. Сысоев А. А., Бердников А. С., Масюкевич С. В., Соловьев К. В., Краснова Н. К. Аналитическое исследование режимов работы радиочастотных воронок в газодинамических интерфейсах тандемных квадрупольных масс-спектрометров // Научно-технические ведомости Санкт-Петербургского государственного политехнического университета. Физико-математические науки, 2023, Т. 16, № 4, с. 134–145.

ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ МИШЕНИ ДЛЯ МАЛДИ-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ МЕТАЛЛ-АФФИННЫМИ СОРБЕНТАМИ НА ОСНОВЕ СТЕАРАТОВ ЛАНТАНОИДОВ

А. Е. Хомяк^{1, *}, Я. К. Калниня¹, Е. А. Северова¹, Е. П. Подольская²

* khomyak.ae@mail.ru

¹ ФГБУ НКЦТ им. С. Н. Голикова ФМБА России, 192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 1

² Институт аналитического приборостроения РАН, 198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А

Метод масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ-МС) является распространенным инструментом для анализа органических молекул. К главным преимуществам метода относятся быстрота анализа, высокое разрешение и чувствительность, а также способность детектировать обширный круг соединений. Однако сложная и многостадийная пробоподготовка, предшествующая анализу, часто сводит на нет эти достоинства, требуя больших временных затрат и приводя к потерям анализируемого вещества. В последние годы для повышения эффективности анализа разрабатываются подходы по совмещению различных процедур пробоподготовки с МАЛДИ-МС.

Это привело к созданию протоколов, объединенных концепцией «лаборатория-на-мишени» [1]. В рамках этой концепции, например, был предложен метод интеграции металл-аффинной хроматографии, разделения белков, основанного на их избирательном связывании с ионами металлов, в алгоритм с последующим МАЛДИ-МС анализом [2].

В данной работе исследуются новые сорбционные материалы на основе стеаратов лантаноидов, представляющих интерес ввиду большого ионного радиуса, переменных валентностей и больших координационных возможностей, что должно способствовать усилению взаимодействия с целевыми молекулами, повышая чувствительность анализа. В основе исследования лежит успешный опыт работы [3], где сорбционный материал на основе тонкой пленки стеарата лантана использовался в качестве металл-аффинного сорбента для обогащения аддукта триптического пептида LLGNVLVC₁₁₂VLANNFQK β-субъединицы глобина человека (Hb) с хлорсодержащими ксенобиотиками, а также продуктами окисления диклофенака. Таким образом, актуальна цель работы: получить на поверхности МАЛДИ-мишени и исследовать новые сорбенты, содержащие атомы металлов, принадлежащих к ряду лантаноидов.

Сорбенты формировали путем нанесения небольшой капли водного раствора нитратов лантаноидов, затем последовательно трижды наслаивали раствор насыщенной стеариновой кислоты в н-гексане. После чего убирали каплю и повторяли процедуру еще раз. После формирования 6 монослоев стеарата металла (FMe, где Me — La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu) удаляли избытки соли путем промывания сорбента деионизованной водой и высушивали сорбенты на воздухе.

Эффективность сорбента в значительной степени зависит от площади его поверхности, доступной для взаимодействия с аналитом. Исследование при помощи световой микроскопии показало, что нанесение первого монослоя стеариновой кислоты уже приводило к образованию структуры из множества концентрических колец. Увеличение числа монослоев до двух и четырех сопровождалось значительным увеличением количества материала. Наибольшая

удельная яркость пятна в пределах ячейки была достигнута при формировании шести монослоев.

Структурное звено было установлено методом МАЛДИ-МС. Исследование морфологии сорбентов, проведенное с помощью атомно-силовой микроскопии, подтвердило наличие развитой поверхности с волнообразным рельефом. Данные сканирующей электронной микроскопии показали, что FMe формируется в виде концентрических окружностей с рыхлыми неровными краями, расходящихся от центра нанесения капли водного раствора соли металла. Быстрое испарение стеариновой кислоты в гексане по краям пятна вызывает наплыв и деформацию новых участков слоя на предыдущие, что приводит к их разворачиванию в плоскости. Таким образом, процесс коллапсирования FMe начинается по периметру водной капли и далее распространяется по зоне растекания гексана.

Для оценки сорбционных свойств FMe в качестве модельного объекта исследования был выбран ННб, модифицированный ксенобиотиком N1-(4-хлорфенил)-2-хлорацетамид (CCAn). Выбор ННб обусловлен его мажорной ролью в составе крови; наличием в его α - (C-104) и β -субъединице (C-112 и C-93) цистеина, являющегося мишенью для алкилирующих агентов. Кроме того, длительное время жизни белка в организме позволяет детектировать накопленные аддукты при ретроспективном анализе. Два триптических пептида β -субъединицы с подходящими для МАЛДИ-МС массами обладают разными значениями pI (m/z 1719,97 для пептида LLGNVLVC₁₁₂VLANHFGK и $pI= 8,84$, смещенное в щелочную область, и m/z 2529,22 для пептида GTFATLSELHC₉₃DKLHVDPENFR и $pI= 5,17$, смещенное в щелочную область), что позволяет оценить эффективность экстракции в разных условиях.

Анализ полученных после проведения металл-аффинной экстракции МАЛДИ-масс-спектров подтвердил, что все исследуемые структуры обладают сорбционными свойствами. Проведение металл-аффинной экстракции позволяет значительно увеличить интенсивность целевых сигналов аддуктов белка с хлорсодержащим ксенобиотиком, при этом общее количество примесных сигналов в масс-спектре снижается. То есть все исследуемые структуры про-

являют специфичность по отношению к хлорсодержащим пептидам.

В ходе работы получено 13 новых металл-аффинных сорбентов на основе стеаратов лантаноидов. Все структуры, сформированные непосредственно на МАЛДИ-мишени шестикратным нанесением стеариновой кислоты в н-гексане на каплю водной субфазы, содержащей ионы металлов, характеризуются развитым рельефом, наличием структурного звена MeSt_2^+ и достаточной площадью поверхности для эффективного связывания с аналитом. Это позволяет применять их для специфического обогащения аддуктов белков с хлорсодержащими соединениями, являющимися широко распространенными промышленными и бытовыми токсикантами. Среди изученных сорбентов структура FGd продемонстрировала наибольшую универсальность, проявив высокий уровень селективности в целом, а также специфичность как к щелочным, так и к кислым аддуктам.

Благодарности

Авторы выражают благодарность ресурсному центру Научного парка СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» за техническую помощь. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (рег. № 125030703338-7).

Литература

1. Urban P. L., Amantonico A., Zenobi R. Lab-on-a-plate: Extending the functionality of MALDI-MS and LDI-MS targets / *Mass Spectrom. Rev.* 2011. Vol. 30. P. 435–478.
2. Gladchuk A.S., Silyavka E.S., Shilovskikh V.V., et al Self-organization of stearic acid salts on the hemispherical surface of the aqueous subphase allows functionalization of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry target plates for on-plate immobilized metal affinity chromatography enrichment / *Thin Solids Films* 2022. Vol. 756. P. 139374.
3. Kalninia Y.K., Viskov M.A., Gladchuk A.S., et al MALDI target functionalization with deposited thin films of lanthanum stearate — An efficient tool for in situ enrichment of human globin adducts of chlorinated organic compounds / *Microchem. J.* 2024. Vol. 6. N 205. 111300.

**СИСТЕМА ЭКСПРЕССНОГО СКРИНИНГА
РЕАКЦИОННОСПОСОБНЫХ МЕТАБОЛИТОВ
КСЕНОБИОТИКОВ МЕТОДОМ
МАЛДИ-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

А. А. Афанасьева^{1,*}, О. А. Кельцьева¹, А. С. Гладчук¹, Е. П. Подольская²

*** afanasyeva.a.a.2000@yandex.ru**

¹ *ФГБУ НКЦТ им. С. Н. Голикова ФМБА России, 192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 1*

² *Институт аналитического приборостроения РАН, 198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А*

Поиск и идентификация реактивных метаболитов является одним из важнейших этапов исследований при оценке токсичности новых лекарственных средств и других ксенобиотиков. На сегодняшний день существует ряд подходов к *in vitro* моделированию биотрансформации ксенобиотиков, среди которых широкое распространение получили неферментативные методы с последующей инкубацией продуктов окисления с улавливающим агентом, в качестве которого часто используется низкомолекулярный трипептид глутатион (GSH). Среди методов определения метаболитов ксенобиотиков и их аддуктов эффективно применяется масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ-МС). Значительный интерес представляет разработка подходов для моделирования метаболизма непосредственно на подложке для МАЛДИ (мишени) с последующим МС-анализом как продуктов окисления, так и их конъюгатов с улавливающим агентом, что может существенно сократить общее время исследования. Соответственно, целью работы являлась разработка системы экспрессного скрининга реактивных метаболитов ксенобиотиков, позволяющей проводить все необходимые этапы эксперимента на поверхности МАЛДИ-мишени.

Была разработана схема моделирования метаболизма ксенобиотиков на основе УФ-индуцированного фотокаталитического окис-

ления в присутствии наночастиц TiO_2 (УФ/ TiO_2 -ФКО), включающая следующие этапы: 1) нанесение на ячейки мишени 2 мкл водной суспензии TiO_2 (2 мг/мл, рутил:анатаз = 4:1) и ее высушивание; 2) нанесение на функционализированные ячейки растворов GSH и ксенобиотика (общий объем 10 мкл); 3) выдерживание мишени под лампой УФ-излучения ($\lambda_{\text{max}} = 405$ нм, 30 минут); 4) перенос раствора на соседнюю ячейку и добавление матрицы (2,5-дигидроксibenзойная кислота), МАЛДИ-МС-анализ. Затем на примере ряда лекарственных средств с изученным метаболизмом (индапамид, диклофенак, амлодипин, амиодарон) продемонстрирована эффективность предложенного подхода. В случае амиодарона и амлодипина был обнаружен ряд метаболитов, которые не демонстрировали реакционной способности по отношению к GSH, что согласуется с литературными данными. Для диклофенака и индапамида были найдены также аддукты их продуктов окисления с GSH. Предложенный подход был апробирован при исследовании двух соединений с неизвестным механизмом метаболизма, а также адаптирован для анализа метаболитов пестицидов (карбендазим, имидаклоприд, хлорсульфурон). В связи с нерастворимостью пестицидов в воде их растворы были предварительно нанесены на функционализированные TiO_2 ячейки мишени и высушены, после чего на них наносился водный раствор, содержащий GSH, и далее окисление проводилось по схеме, описанной выше. По результатам МАЛДИ-МС был детектирован ряд сигналов, соответствующих метаболитам исследуемых соединений, описанным в литературе, а также потенциальным продуктам биотрансформации.

Таким образом, была разработана система экспрессного скрининга реактивных метаболитов ксенобиотиков, позволяющая проводить моделирование метаболизма ксенобиотиков с использованием УФ/ TiO_2 -ФКО непосредственно на поверхности МАЛДИ-мишени. Методика позволяет осуществлять исследование одновременно нескольких ксенобиотиков с низкими временными и ресурсными затратами.

Благодарности

Работа выполнена в рамках государственного задания рег. № НИР 123031700056-2 «Нецелевой химический анализ в доклинических исследованиях метаболома при воздействии ксенобиотиков цитотоксического действия» (шифр «Скрининг»).

Авторы выражают благодарность ресурсному центру Научного парка СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» за техническую помощь.

РАЗРАБОТКА ГИДРОГЕЛЕВЫХ БИОЧЕРНИЛ С ЖЕЛАТИНОВЫМИ МИКРОГЕЛЯМИ ДЛЯ 3D-БИОПЕЧАТИ

А. А. Тюшкевич^{1*}, П. С. Плешаков¹, Н. А. Филатов¹, А. С. Букатин²
* ternet121@gmail.com

¹ *СПбАУ РАН им. Ж. И. Алферова, 194021, Санкт-Петербург, ул. Хлопина, 8/3, лит. А*

² *Институт аналитического приборостроения РАН, 198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А*

Для клинического применения тканеинженерные конструкции должны обладать метаболической активностью и сосудистой сетью, аналогичной человеческим тканям и органам. Современные методы биопечати, использующие стандартные гомогенные биочернила, направлены на воспроизведение структурной сложности натуральных тканей [1]. Добавление в такие чернила микрогелей с живыми клетками дает возможность точно управлять структурными и функциональными параметрами конкретной ткани, создавая масштабируемую модель для изучения патологических процессов и оценки цитотоксичности лекарственных средств [2]. Цель нашей работы — создание тканеинженерных моделей для тестиро-

вания препаратов на основе композитных биочернил, состоящих из гидрогелевого раствора и микрогелей с инкапсулированными живыми клетками, полученных методом капельной микрофлюидики.

В первой серии экспериментов мы изготовили тестовые конструкции из гомогенного биочернила на основе альгината/Pluronic

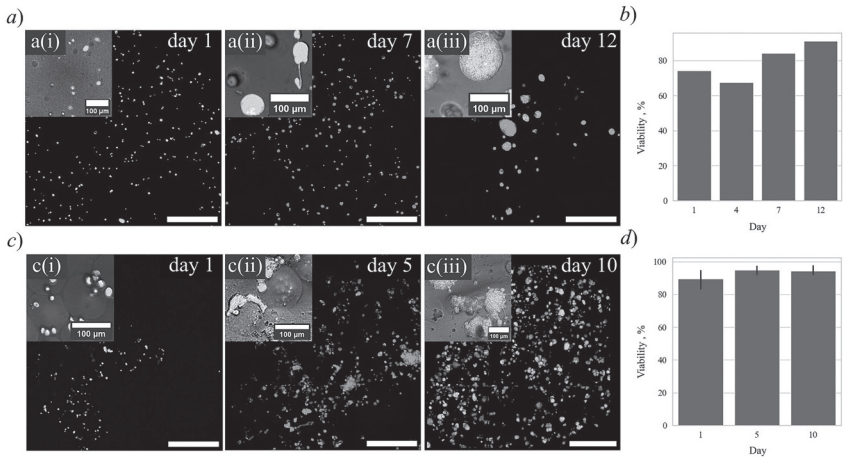


Рис. 1. 3D-био печать тканеинженерных конструкций с клетками CT26-eGFP. а) Конфокальные флуоресцентные изображения тестовой решетки, напечатанной из гомогенного раствора альгината/Pluronic F-127, с клетками CT26 eGFP во время культивирования *in vitro* (масштабная линейка составляет 500 мкм). б) График жизнеспособности клеток в напечатанной конструкции с 1-го по 12-й день. Клетки CT26 eGFP находятся в гомогенном растворе альгината/Pluronic F-127. в) Конфокальные флуоресцентные изображения тестовой решетки, напечатанные гетерогенным раствором альгината/Pluronic F-127 с желатиновыми микрогелями, содержащими клетки CT26 eGFP, во время культивирования *in vitro* (масштабная линейка составляет 500 мкм). д) График жизнеспособности клеток CT26 eGFP в тканеинженерной конструкции, изготовленной из гетерогенных биочернил с желатиновыми микрогелями (n = 3). На рис. а), в) вставками показаны увеличенные изображения тестируемых структур в светлом поле с флуоресцентными метками (масштабная линейка составляет 100 мкм)

F-127 с клетками СТ26 eGFP (рис. 1, а). В полученных структурах клетки формировали изолированные скопления, увеличивались в размерах и образовывали сфероиды в процессе культивирования. Показатель их жизнеспособности в первые 7 дней был ниже 85 %, но к 12-му дню возрос до 95 % (рис. 1, b), что свидетельствует о существенном повреждении клеток непосредственно в процессе печати.

Затем мы изготовили трехмерную решетчатую структуру, используя гетерогенные биочернила, где клетки СТ26-eGFP были предварительно инкапсулированы в желатиновые микрогели (рис. 1, с). Наличие микрогелей снижает вязкость конечного состава, что влияет на пространственное разрешение печати. Поэтому для модели решетки мы установили расстояние 1,6 мм между соседними параллельными линиями, что позволило получить толщину нити $0,6 \pm 0,1$ мм. В этом случае жизнеспособность клеток изначально превышала 90 % и достигла 95 % к 10-му дню (рис. 2, d). Более того, на 5-й день культивирования число клеток возросло, и они распространились по внутренней поверхности микрогелей (рис. 2, с(ii)). К 10-му дню клетки полностью заполнили весь объем микрогелей (рис. 2, с(iii)). Важно, что как на 5-й, так и на 10-й день клетки продолжали рост внутрь микрогелей, не мигрируя на поверхность планшета, что указывает на их высокую адгезию к альгинатной матрице.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-74-10117).

Литература

1. Fang, Y., Guo, Y., Liu, T., Xu, R., Mao, S., Mo, X., ... Sun, W. Advancements in 3D bioprinting. Chinese Journal of Mechanical Engineering // Additive Manufacturing Frontiers., 2022. Т. 1 (1). Р. 100011.
2. Daly, A. C., Riley, L., Segura, T., & Burdick, J. A. Hydrogel microparticles for biomedical applications // Nature Reviews Materials. 2020. Т. 5 (1). Р. 20–43.

СИНТЕЗ PLGA НАНОЧАСТИЦ С ОБОЛОЧКОЙ PLURONIC F127 ПРИ ПОМОЩИ НАНООСАЖДЕНИЯ В МИКРОФЛЮИДНОМ МИКСЕРЕ

Е. И. Наумов*, А. С. Букатин

* naumove2000@gmail.com

СПбАУ РАН им. Ж. И. Алферова, 194021, Санкт-Петербург, ул. Хлопина, 8/3, лит. А

Молекула PLGA представляет собой полимер с высокой биосовместимостью и биодegradируемостью, что позволяет использовать его как материал наноконтейнеров для разработки инновационных препаратов для лечения таких заболеваний, как рак и диабет, и некоторые подобные препараты уже прошли клинические испытания [1]. Во многих случаях PLGA-наночастицы формируются в результате процесса наноосаждения (от англ. nanoprecipitation), когда поток органической фазы перемешивается с потоком водной фазы. Подобные реакции проводят в том числе в микрофлюидных системах, использование которых может предоставить возможность контролировать перемешивание малых объемов фаз с высокой скоростью потока. Для подобных задач в исследованиях используют вариации так называемых микрофлюидных миксеров типа «елочка» для получения частиц размером от 100 нм с различной степенью инкапсуляции гидрофильных веществ. В данной работе производится синтез PLGA-наночастиц размером меньше 100 нм при помощи включения в их структуру прямо во время синтеза Pluronic F127 для формирования стериновой оболочки.

Для проведения синтеза были использованы растворы PLGA с молекулярной массой 25 кДа и 130 кДа в ацетоне. После растворения PLGA в ацетоне с концентрацией 2 мг/мл в раствор был добавлен этиловый спирт до объемной концентрации в 10 % для уменьшения летучести и увеличения смешиваемости с водной фазой. В качестве водной фазы использовался раствор Pluronic F127 с массовой концентрацией в 1 %. Для проведения синтеза

наночастиц методом наноосаждения использовался микрофлюидный контроллер давлений (ФЛИКСБИО, Россия), с помощью которого осуществлялся ввод жидкостей в микрофлюидный миксер типа «елочка». Размер и полидисперсность полученной суспензии наночастиц определялись при помощи лазерной корреляционной спектроскопии (DLS) на приборе Malvern Zetasizer Nano S. Перед анализом проводился 12-часовой диализ суспензии для удаления остатков ацетона, этанола и Pluronic F127. В результате были получены суспензии наночастиц из молекул PLGA с разной молекулярной массой. Анализ размера и полидисперсности показал, что использование PLGA с длиной молекул 130 кДа приводит к формированию агрегатов размерами 400 нм и 5 мкм, в то время как из молекул с молекулярной массой 25 кДа формируется суспензия наночастиц со средним гидродинамическим диаметром в 78 нм и индексом полидисперсности ~0,080.

В данной работе была разработана методика синтеза PLGA наночастиц со стериновой оболочкой из Pluronic F127 размером менее 100 нм. Подобный размер может позволить использовать наночастицы в качестве наноконтейнеров для доставки лекарственных препаратов.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке компании ФЛИКСБИО в виде предоставления прибора для проведения исследований.

Литература

1. Shao L., Shen S., Liu H. Recent advances in PLGA micro/nanoparticle delivery systems as novel therapeutic approach for drug-resistant tuberculosis // *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2022. Т. 10. Р. 941077.

СОЗДАНИЕ ТЕСТОВЫХ СТРУКТУР ДЛЯ СКАНИРУЮЩЕЙ КАПИЛЛЯРНОЙ МИКРОСКОПИИ

М. В. Жуков^{1,*}, А. А. Банков^{1,2}, С. В. Пичахчи¹, С. Ю. Лукашенко¹

* cloudjyk@yandex.ru

¹ Институт аналитического приборостроения РАН, 198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А

² Университет ИТМО, 197101, Санкт-Петербург, Кронверкский проспект, 49, лит А

Одним из перспективных методов зондовой диагностики материалов является сканирующая капиллярная микроскопия (СКМ). Преимуществом данного метода является возможность бесконтактного измерения биообъектов в жидкости с разрешением вплоть до 10 нм, что важно для изучения морфологии мембран клеток, бактерий, костной и жировой ткани [1, 2]. Однако на сегодняшний день коммерчески доступные стандартные калибровочные тестовые образцы для СКМ отсутствуют как на международном уровне, так и в рамках государственной системы обеспечения единства измерений. Отсутствие работ по созданию тестовых объектов также ограничено и особенностями подбора образцов для СКМ, в котором допускается измерение преимущественно мягких образцов.

В рамках работы освоена технология изготовления нанопипеток методом тепловой вытяжки, включая программирование установки и исследование влияния ее параметров на геометрию пипетки. Изучена форма, размеры и ионная проводимость пипеток с помощью методов сканирующей электронной микроскопии и вольтамперометрии. При размерах апертуры пипетки менее 100 нм обнаружена разница в проводимости при разных полярностях напряжения, что было учтено при использовании подобных пипеток в измерениях.

Разработана технология нанесения и закрепления латексных частиц на диэлектрические подложки. На гладкие подложки кремния наносился тонкий слой акрила. Для повышения гидрофильных свойств

и связывания наносфер до нанесения водной эмульсии проводилась активации химических связей акрила за счет воздействия на образец импульсами переменного тока высокой частоты (215 МГц) и малой силы (100–300 мА). Сферы разного диаметра (200 нм, 150 нм, 50 нм, 20 нм) и разной полярности заряда наносились тонким слоем путем центрифугирования наносимой эмульсии. Подобраны оптимальные параметры нанесения сфер, а также контроль их закрепления и геометрии при использовании методов атомно-силовой микроскопии (АСМ) и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Результаты измерений в виде конволюции геометрии наносферы и зонда позволяют оценить субмикронные апертуры пипетки в методе СКМ.

Установлено, что перспективным также является использование метода штамповки углублений и выступов в слое поликарбоната для создания калибровочных структур. Выявлено, что питы, представляющие собой набор углублений/выступов одинаковой глубины (высоты), ширины и периода дорожек компакт-диска, позволяют использовать их в качестве тестовых образцов. Такие структуры способны обеспечить калибровку сканирующих микроскопов по трем осям, что значительно повышает точность и надежность метода при измерениях. Кроме того, выявлены и устранены артефакты изображений в АСМ и СКМ, изучена их природа, заключающаяся в наличии шумов при сканировании на границе перепада высот, что, предположительно, возникает за счет многократного взаимодействия зонда со стенками структуры при его неортогональной ориентации к поверхности образца.

По результатам измерений были успешно выполнены калибровки пьезокерамики на приборе СКМ для повышения точности измерений по всем трем координатам XYZ, таким образом, разработанные образцы были успешно использованы в качестве калибровочных тестовых мер для метода СКМ.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 24-79-00169, <https://rscf.ru/project/24-79-00169/>).

Литература

1. Happel P., Dietzel I. D. Backstep scanning ion conductance microscopy as a tool for long-term investigation of single living cells // Journal of Nanobiotechnology. 2009. Vol. 7. P. 1–9.
2. Morris C. A., Chen C. C., Baker L. A. Transport of redox probes through single pores measured by scanning electrochemical scanning ion conductance microscopy (SECM-SICM) // Analyst. 2012. Vol. 137, № 13. P. 2933–2938.

ПОЛИМЕРНЫЕ МИКРОФЛЮИДНЫЕ ЧИПЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР В ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

М. А. Шубина*, Н. О. Ситков

* mashkin999@mail.ru

*Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет
«ЛЭТИ» им. В. И. Ульянова (Ленина), 197376, Санкт-Петербург,
Инструментальная, 2*

Повышенное давление интерстициальной жидкости в опухолях является барьером для транспорта лекарственных препаратов к раковым клеткам. Так, значения давления могут достигать 13,3 кПа [1]. Исследование поведения клеток в таких экстремальных условиях позволит повысить эффективность применения препаратов. Для проведения экспериментов над клеточными культурами удобно использовать микрофлюидные системы, в микроканалы которых возможна подача высокого давления.

Целью данной работы являлась разработка полимерного микрофлюидного чипа, предназначенного для клеточных исследований при повышенных давлениях. Для этого в качестве материалов микрофлюидной системы были выбраны жесткие, термопластичные, биосовместимые и прозрачные полимеры: полиметилметакрилат

(ПММА) для герметизирующего слоя, полиэтилентерефталат (ПЭТ) для подложки и слоя микроканалов толщиной 300 мкм.

Технология производства включает следующие этапы: инфракрасную лазерную резку для формирования функциональных слоев системы, релаксацию механических напряжений заготовок в горячей воде, обезжиривание поверхностей, их обработку коронным разрядом, термокомпрессионное связывание в плоском термопрессе, монтаж фитингов.

Для проверки функциональности чипа в клеточных исследованиях был проведен эксперимент по наблюдению за поведением эмбриональных мезенхимных стволовых клеток (FetMSC) при повышении давления в микроканалах. Для подготовки поверхности каналов микрофлюидного чипа были аминированы 2 % раствором

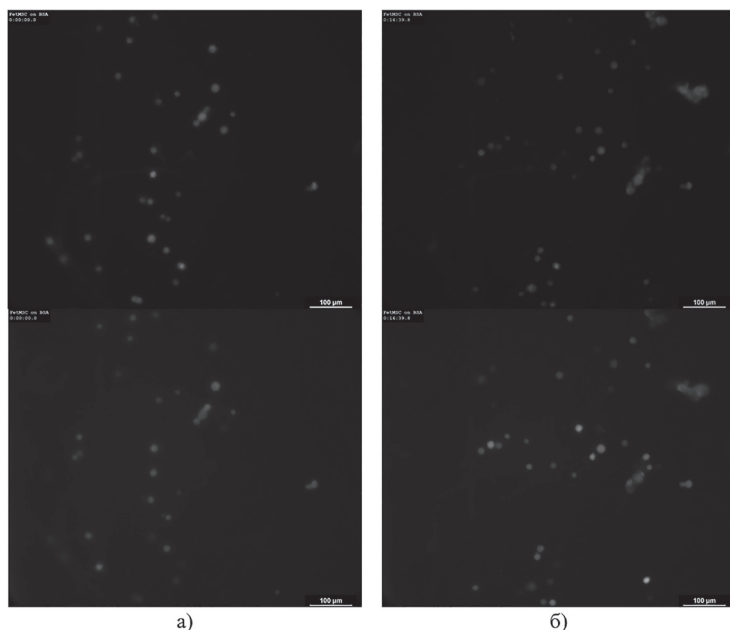


Рис. 1. Результаты эксперимента при повышении давления в микроканале на: а) 0 кПа, б) 5 кПа

APTMS (3-аминопропилтриметоксисилан) в изопропиловом спирте, после чего был иммобилизован бычий сывороточный альбумин в качестве белка для прикрепления биологических клеток.

Подача повышенного давления была осуществлена шприцом, соединенным силиконовыми трубками со входом и выходом микроканала, а также с манометром, что позволило поддерживать необходимое значение давления. Наблюдение за экспериментом произведено в системе цитометрии ExFluor^{er} LCI, позволяющей поддерживать такие параметры среды, как температура и содержание углекислого газа.

Клетки FetMSC были инкубированы с двумя флуоресцентными красителями: TMRM — красителем, накапливающимся в митохондриях в зависимости от митохондриального мембранного потенциала (ММП), и H2DCFDA — индикатором активных форм кислорода (АФК). Снижение сигнала TMRM при повышении давления говорит о падении ММП, то есть о нарушении работы митохондрий, которые начинают производить большое число АФК, в соответствии с увеличением сигнала H2DCFDA (рис. 1). Такое увеличение выделения АФК может привести к повреждению клеток и их гибели [2].

В результате была разработана технология формирования полимерных микрофлюидных чипов, применимых для проведения экспериментов над клеточными структурами при повышенных давлениях. С помощью изготовленных чипов проведено наблюдение за поведением мезенхимных стволовых клеток при увеличении давления, зафиксировано снижение митохондриального мембранного потенциала и усиление выделения активных форм кислорода. Дальнейшее развитие работы направлено на исследование различных топологий микроканалов, разработку новых экспериментов с гетерогенными биологическими клетками.

Литература

1. Böckelmann L. C., Schumacher U. Targeting tumor interstitial fluid pressure: will it yield novel successful therapies for solid tumors? // Expert opinion on therapeutic targets. 2019. Т. 23. № 12. Р. 1005–1014.
2. Murphy M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species // Biochemical journal. 2009. Т. 417. № 1. Р. 1–13.

ГИБРИДНЫЙ МИКРОФЛЮИДНЫЙ РЕАКТОР ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВЫХ СТРУКТУР

П. Д. Петрова, С. П. Новикова*, Р. Вальшина, А. В. Полидаускайте,
Ю. В. Чебуркин, Н. О. Ситков
* sn377911@gmail.com

*Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет
«ЛЭТИ» им. В. И. Ульянова (Ленина), 197376, Санкт-Петербург,
Инструментальная, 2*

Белок FGF-21, играющий важную роль в регуляции углеводного и липидного обмена, рассматривается как перспективный терапевтический агент [1]. При его получении с помощью рекомбинантной экспрессии в *E.coli* к нему добавляют His-метку, что значительно упрощает последующую очистку. Однако эта метка может негативно влиять на биологическую активность белка и провоцировать нежелательный иммунный ответ, в связи с чем ее необходимо удалять. Наиболее специфичным способом удаления является ферментативное расщепление с помощью TEV-протеазы. В данной работе для повышения эффективности этого процесса предлагается использовать микрофлюидный подход [2].

В рамках исследования разработан гибридный микрофлюидный ферментный реактор размером 75×25 мм с рабочим объемом до 60 мкл (см. рис. 1). Конструкция реактора состоит из слоев ПММА и ПЭТ, в которых микроканалы сформированы методом лазерной абляции, а затем соединены термокомпрессионным методом. Для подключения внешнего оборудования (шприцевого насоса) были изготовлены 3D-печатные входные порты. С целью закрепления TEV-протеазы внутренняя поверхность каналов модифицирована тремя разными методами: с использованием химии NHS/EDC, CDI и глутарового альдегида. Успешность иммобилизации фермента контролировали с помощью флуоресцентного красителя FITC и Rönseau S.

Эксперименты подтвердили, что изготовленный микрофлюидный реактор обладает стабильной конструкцией и устойчив к рабочим

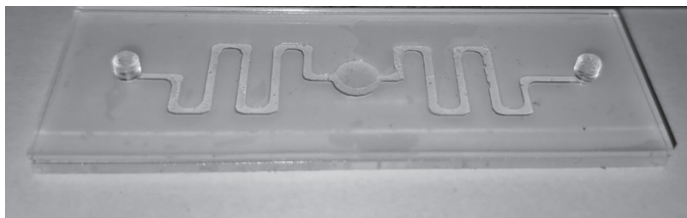


Рис. 1. Образец изготовленного микрофлюидного ферментного реактора

условиям. Все три метода модификации поверхности позволили достичь эффективной адсорбции TEV-протеазы. При этом наилучшие показатели стабильности и воспроизводимости продемонстрировал метод на основе CDI. В ходе тестирования системы успешно доказана возможность ферментативного отщепления His-метки от белка FGF-21 в условиях микрофлюидного чипа.

Таким образом, созданный лабораторный прототип микрофлюидного реактора обеспечивает эффективную иммобилизацию фермента и пригоден для очистки рекомбинантных белков, таких как FGF-21. Представленная технология открывает перспективы для миниатюризации процессов ферментативной обработки, позволяя сократить время реакции и расход реагентов, что особенно востребовано в области биомедицинских исследований и разработки биосенсоров.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 25-79-10055).

Литература

1. He J. et al. FGF-21 and GDF-15 are increased in migraine and associated with the severity of migraine-related disability // The Journal of Headache and Pain. 2023. Т. 24. № 1. P. 28.
2. Byrne M. B. et al. Design considerations for open-well microfluidic platforms for hypoxic cell studies // Biomicrofluidics. 2017. Т. 11. № 5.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА АРГИНИНДЕИМИНАЗЫ ПРИ ПОМОЩИ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО АММИАЧНОГО СЕНСОРА НА ОСНОВЕ СУЛЬФАТА МЕДИ (II) С ПОЛИМЕРНОЙ МЕМБРАНОЙ

К. А. Сычинская*, С. С. Ермаков

* st107302@student.spbu.ru

*Санкт-Петербургский государственный университет, 199034,
Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9*

Более 40 лет назад появились первые предположения о том, что различные опухолевые клетки чувствительны к недостатку аргинина. В последние годы из-за роста количества онкологических заболеваний возросла потребность в разработке новых противоопухолевых препаратов. В связи с этим стала актуальной разработка штаммов стрептококков, способных подавлять рост некоторых видов раковых опухолей путем расщепления L-аргинина [1, с. 5068; 2, с. 700]. Но для определения наиболее эффективного штамма требуется оценка активности фермента аргининдеиминазы, являющегося основой этой новой терапии. Поэтому нами была разработана методика, позволяющая в короткие сроки проводить сравнительный анализ активности данного фермента в различных штаммах.

Аргининдеиминаза (ADI) — фермент, расщепляющий аргинин до цитруллина [3, с. 355; 4, с. 136; 5, с. 20]. Недостаток питательных веществ в опухоли запускает эволюционно законсервированный эукариотический процесс, называемый макроаутофагией (аутофагией), при котором органеллы и объемные белки перерабатываются лизосомальной активностью [2, с. 700].

В основе методики определения активности аргининдеиминазы была положена реакция ферментативного деаминирования с последующим определением выделившегося аммиака с помощью вольтамперометрического аммиачного сенсора на основе сульфата меди (II), покрытого полимерной мембраной типа «Нафион» (см. рис. 1). В ка-

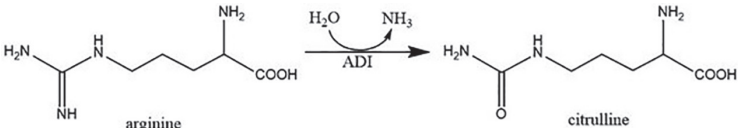


Рис. 1. Реакция деаминирования аргинина

честве субстрата выступал непосредственно L-аргинин, продуктом реакции является цитруллин (1:1). В процессе работы были определены степени влияния субстрата, бульона Тодда — Хьюита (чистым и при наличии в нем культуры) на аналитический сигнал.

За счет того, что ионы меди могут образовывать устойчивые комплексы с аммиаком ($\lg\beta_4 = 12,03$), возможно вольтамперометрическое детектирование выделяющегося аммиака с помощью реакции комплексообразования, лежащей в основе работы вольтамперометрического аммиачного сенсора на основе сульфата меди (II). Но фосфатный буфер, который обеспечивает максимальную активность бактерий при $\text{pH} = 5\text{--}6$ [5, с. 20], а соответственно и фермента аргининдеиминазы, не позволяет определять малые количества аммиака, поскольку при этих pH комплексы не образуются. В качестве решения была предложена схема, по которой производятся измерения сначала при непосредственной активности бактерий, а затем после остановки реакции посредством добавок концентрированного NaOH (поскольку при $\text{pH} > 9$ бактерии не являются жизнеспособными).

Литература

1. D. Mossmann et al., "Arginine reprograms metabolism in liver cancer via RBM39," *Cell*, vol. 186, no. 23, pp. 5068–5083.e23, Nov. 2023, doi: 10.1016/j.cell.2023.09.011.
2. R. H. Kim et al., "Arginine deiminase as a novel therapy for prostate cancer induces autophagy and caspase-independent apoptosis," *Cancer Res*, vol. 69, no. 2, pp. 700–708, Jan. 2009, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3157.
3. G. Cottenceau, M. Dherbomez, B. Lubochinsky, and F. Letellier, "Immobilization and treatment of *Streptococcus faecalis* for the continuous conversion of arginine into citrulline," 1990.

4. H. Jiang, K. Huang, W. Mu, B. Jiang, and T. Zhang, “Characterization of a recombinant arginine deiminase from *Enterococcus faecalis* SK32.001 for L-citrulline production,” *Process Biochemistry*, vol. 64, pp. 136–142, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.procbio.2017.06.006.
5. I. Chibata and T. Tosa, “Transform at ions of Organ ic Compounds by Im-mobilized Microbial Cells,” 1977.

ИНТЕГРАЦИЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТА В ИССЛЕДОВАНИИ КАПИЛЛЯРНЫХ КЛАПАНОВ: ПОДХОД К УСКОРЕННОЙ РАЗРАБОТКЕ МИКРОФЛЮИДНЫХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЧИПОВ

**А. Р. Агишева^{1,*}, Д. А. Матишова¹, А. А. Тюшкевич², Л. А. Алтынбаев²,
Д. А. Белоусова², Е. А. Мучкинова¹, А. С. Букатин^{2,3}**
* aagisheva@drdbiotech.ru

¹ ООО «РАПИД БИО», 121205, Москва, Большой Бульвар, 42, стр. 1

² СПбАУ РАН им. Ж. И. Алферова, 194021, Санкт-Петербург, ул. Хлопина, 8/3, лит. А

³ Институт аналитического приборостроения РАН, 198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А

При разработке микрофлюидных диагностических устройств используют два подхода: моделирование процессов [1] и экспериментальные методы [2]. Каждый подход имеет ограничения: модели без проверки теряют достоверность, а эксперименты без теоретической основы — предсказательность. Отсутствие их согласованного применения мешает осуществить плавный переход от разработки к производству и существенно замедляет трансляцию технологий из лабораторий в клинические или промышленные условия.

Одним из ключевых элементов микрофлюидных систем являются капиллярные клапаны, обеспечивающие управление движением

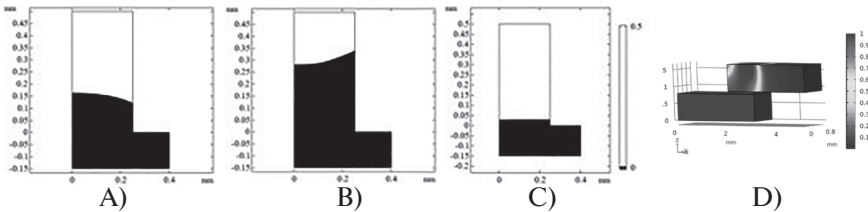


Рис. 1 Раздел фаз в 2D-сечении капилляра: воздух (белый) и вода (черный) для трех значений угла смачиваемости стенок через 0,001 с. (А) Угол смачивания $112,5^\circ$, внешнее давление 227 Па. (В) Угол смачивания $67,5^\circ$, внешнее давление на жидкость 0 Па. (С) Угол смачивания 90° , внешнее давление на жидкость 0 Па. (D) 3D-модель прорыва капиллярного клапана диаметром 0,3 мм с углом смачивания $67,5^\circ$

жидкости в системах. В работе рассмотрены капиллярные клапаны, для которых моделирование и эксперимент использовались как взаимодополняющие инструменты. На основе расчетов в COMSOL Multiphysics с использованием уравнения Лапласа [2–3] и параметров поверхностного натяжения (рис. 1) были определены зависимости давления прорыва от диаметра апертуры и угла смачивания. Экспериментальная проверка включала изготовление 3D-печатных моделей сегментов чипов и измерение давления прорыва столбиком жидкости. Контактные углы определялись методом оптической микроскопии.

Согласно теоретическим расчетам, давление прорыва клапанов для диаметров апертур капиллярного клапана 0,3–1 мм составило 432–130 Па соответственно. 2D-моделирование показало, что для корректной работы капиллярный клапан должен быть изготовлен из гидрофобного материала (рис. 1, А–В). 3D-моделирование было проведено для капиллярного клапана диаметром 0,3 мм и контактным углом $67,5^\circ$, размеры каналов до клапана и после клапана составили 3 мм; 0,8 мм; 0,8 мм (Ш×Г×В). В результате прорыв клапана в модели произошел при давлении 430 Па (рис. 1, D).

Для проверки модели были изготовлены каналы методом фотополимерной 3D-печати. Капиллярный клапан изготовлен из акрилового клеевого материала ARcare 90445 с контактным углом 117° и диаметрами апертур, рассчитанными теоретически выше. Экспериментальные значения давления прорыва клапана составили

326–176 Па соответственно размерам апертуры. Таким образом, расхождение с расчетными значениями составило в среднем 13,6 %, расхождение с 3D-моделью составило 15 %, что подтверждает достоверность модели.

Полученные результаты показывают, что расхождение между расчетами и измерениями в большинстве режимов работы оказывается умеренным и не критическим для инженерных решений. Интеграция моделирования на ранних этапах позволяет сократить число экспериментальных итераций, быстрее отбирать геометрию и материалы и снижать стоимость прототипирования. Такой подход может стать эффективным инструментом при создании микрофлюидных систем для point-of-care диагностики.

Литература

1. E. Yildirim (2017). Modeling and Analysis of a Microfluidic Capillary Valve. *Politeknik Dergisi*, 20(2), 487–494.
2. S. Wang, X. Zhang, C. Ma, S. Yan, D. Inglis, S. Feng (2021). A review of capillary pressure control valves in microfluidics. *Biosensors (Basel)*, 11, 405.
3. T. H. G. Thio, S. Soroori, F. Ibrahim, W. Al-Faqheri, N. Soin, L. Kulinsky, M. Madou (2013). Theoretical development and critical analysis of burst frequency equations for passive valves on centrifugal microfluidic platforms. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 51 (5), 525–535.

СОЗДАНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ МУТАЦИЙ ВИРУСА ГРИППА НА ОСНОВЕ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR-CAS

А. А. Горьковская*, А. А. Васильева, М. А. Ходорковский

* gorkovskaya_aa@spbstu.ru

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29

Грипп — инфекционное респираторное заболевание, циркулирующее и вызывающее сезонные эпидемии. По оценкам Всемирной организации здравоохранения, каждый год из 1 миллиарда случаев сезонного гриппа 3–5 миллионов случаев составляет тяжелая форма заболевания. Одним из способов лечения, ограничивающим продолжительность и тяжесть инфекции, являются противовирусные препараты. Среди них наиболее перспективны ингибиторы одного из гликопротеинов гриппа — нейраминидазы. Доказанной эффективностью ингибиции нейраминидазы обладает препарат осельтамивир. Однако некоторые штаммы гриппа могут стать устойчивыми к осельтамивиру благодаря мутациям в гене, кодирующем нейраминидазу. Наиболее часто встречающейся такой мутацией является H275Y.

Мутантные штаммы вируса гриппа необходимо выявлять для подбора эффективной терапии. Высокая стоимость, длительность проведения и низкая точность ограничивают применение классических молекулярных методов диагностики. Данные недостатки может решить новый диагностический подход, использующий Cas-нуклеазы систем CRISPR-Cas.

Эффекторный комплекс CRISPR-Cas системы формируется из Cas-нуклеазы и направляющих РНК. Узнавание мишени и последующее высокоспецифичное внесение разрыва осуществляется за счет комплементарного взаимодействия gРНК с целевым участком чужеродной нуклеиновой кислоты — протоспейсером. Для распознавания мишени Cas-эффекторам также необходимо наличие примыкающего к протоспейсеру специфического PAM-мотива (Protospacer Adjacent Motif). Это короткая консервативная последовательность нуклеотидов, отсутствие

которой блокирует образование двунитевого разрыва в ДНК. Способность Cas-нуклеаз быть нацеленными на заданные участки ДНК с помощью синтетических РНК и осуществлять разрезание только при наличии специфичного РАМ-мотива открывает широкие практические возможности. Это свойство является основой для создания диагностических систем, способных детектировать специфические нуклеотидные последовательности, например, вирусные гены.

Целевая мутация Н275У представляет собой замену С на Т в первом нуклеотиде кодона гистидина (САС/СAТ), что приводит к образованию кодона тирозина (ТАС/ТАТ). Принцип работы разрабатываемой платформы основан на использовании нуклеазы, РАМ-мотив которой чувствителен к однонуклеотидным заменам в целевой позиции. В данной системе замена цитозина на тимин (С/Т) в сайте РАМ нарушает распознавание мишени. Таким образом, расщепление ДНК наблюдается для последовательности дикого типа и отсутствует для мутанта. Данное различие возможно детектировать в лабораторных условиях. На основе анализа РАМ-предпочтений нуклеаз, охарактеризованных в лаборатории, была отобрана нуклеаза CcCas9 (РАМ: 5'-NNNNGNA-3').

Разрабатываемая диагностическая платформа должна быть универсальна к различным вариантам дикого и мутантного вируса гриппа. Поэтому для выявления разнообразия и распространенности вариантов был проведен биоинформатический анализ 81 185 последовательностей нейраминидазы Н1N1 из базы GISAID. В результате были выявлены наиболее частые варианты последовательности, примыкающей к позиции 275 с 3' конца. Данная последовательность была выбрана в качестве спейсера направляющей crРНК. В ходе оптимизации длины спейсера было установлено, что ее уменьшение до 18 нуклеотидов позволяет сократить количество необходимых вариантов до 10 без снижения эффективности работы CcCas9.

Для проверки широты охвата диагностики были сконструированы синтетические ДНК-мишени, воспроизводящие эти 10 вариантов целевого региона. Подобраны оптимальные концентрации компонентов для реакции *in vitro*: 1200 нМ CcCas9 и 300 нМ каждой crРНК в составе смеси. Разработанный набор crРНК демонстрирует

высокую возможность расщепления всех вариантов мишени, при-
мыкающей к нужной мутации.

Из коллекции НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева были получены
изоляты, соответствующие первому и третьему по частоте вариантам.
Для каждого штамма была получена РНК, которая затем была переведе-
на в двуцепочечную ДНК, содержащую мишень для CcCas9. После чего
с их помощью проведены реакции *in vitro* расщепления целевых фраг-
ментов ДНК нуклеазой CcCas9. Нуклеаза CcCas9 расщепила фрагмент
ДНК дикого типа, распознав гуанин в целевой позиции, в то время как
в присутствии мутации расщепления практически не наблюдалось.

В ходе работы было экспериментально подтверждено, что соз-
данная диагностическая платформа на основе CRISPR-Cas системы
позволяет эффективно расщеплять ДНК, соответствующую дикому
типу вируса гриппа, и не проявляет активности в отношении мутант-
ного варианта. Разработанную диагностическую платформу плани-
руется интегрировать в qPCR для лабораторного анализа.

Благодарности

Работа выполнена в рамках государственного задания Мини-
стерства науки и высшего образования Российской Федерации
No FSEG-2023-0014.

КЛАССИФИКАЦИЯ ЭЛЕКТРОКАРДИОСИГНАЛОВ СВЕРХВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ

Е. А. Денисова
tiranderel@yandex.ru

*Институт аналитического приборостроения РАН, 198095,
Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А*

Автоматическая классификация электрокардиосигналов (ЭКС) с помощью нейронных сетей (НС) представляет собой одну из ключевых задач в медицине и биоинженерии. В последние годы наблюдается непрерывный рост интереса к алгоритмам машинного обучения и их приложениям в диагностике заболеваний сердечно-сосудистой системы, в частности, острой ишемии миокарда (ОИМ) [1]. Основным способом выявления маркеров развития данной патологии является стандартная электрокардиография (ЭКГ С), однако его диагностическая чувствительность составляет всего 56 % [2]. В связи с этим в лаборатории № 235 «Радиоэлектронные и оптоэлектронные приборы ранней диагностики заболеваний человека» Института аналитического приборостроения Российской академии наук ведется разработка нового метода электрокардиографии сверхвысокого разрешения (ЭКГ СВР), позволяющего производить анализ тонкой структуры электрокардиосигналов сверхвысокого разрешения (ЭКС СВР) с целью выявления и фиксации патологических изменений, связанных с развитием ОИМ, не только в классических амплитудных и частотных областях обработки ЭКС, но также и в областях, которые считаются помехами [3]. Расширенные диапазоны регистрации ЭКС СВР делают большинство стандартных алгоритмов анализа полученных данных малоэффективными, в то время как сверточные НС показывают многообещающие результаты в анализе сложных биомедицинских данных, открывая новые возможности для ранней диагностики и мониторинга состояния пациентов.

Для обучения и тестирования модели в рамках исследования использовался набор данных, состоящий из 89 записей ЭКС СВР со средней длительностью 77 минут. Эти данные были получены в ходе экспериментов по моделированию ОИМ на подопытных крысах, проводимых совместно со структурным подразделением Центра Алмазова — Институтом экспериментальной медицины. Записи были разбиты на три ключевые стадии: «стабилизация», «ишемия» и «реперфузия» [4]. Этап предварительной обработки ЭКС СВР включал в себя фильтрацию помех, нормализацию амплитуды для устранения разницы в значениях ЭКС, полученных в различных условиях, и ресемплинг, чтобы привести все сигналы к одной длине (1 секунда) [5]. Далее полученный набор данных был разбит на обучающую и тестовую выборки в соотношении 80/20 для того, чтобы оценить работоспособность модели на независимых данных и избежать переобучения.

Для классификации БЭС СВР была разработана модель, состоящая из НС нескольких типов: трансформера, долгой краткосрочной памяти (Long short-term memory; LSTM) и сверточной [6–8]. Схема модели представлена на рис. 1. Энкодер сети-трансформера отвечает за сбор и обработку входных данных, преобразовывая их в сжатое представление, что позволяет выделить ключевые признаки. LSTM-сеть предназначена для предсказания последовательных данных на основе поступающего ей на вход контекста с учетом временных зависимостей. Второй компонент сети-трансформера (декодер) разворачивает сжатые данные, полученные от LSTM-сети, в окончательные выходные данные, которые могут быть использованы для классификации.

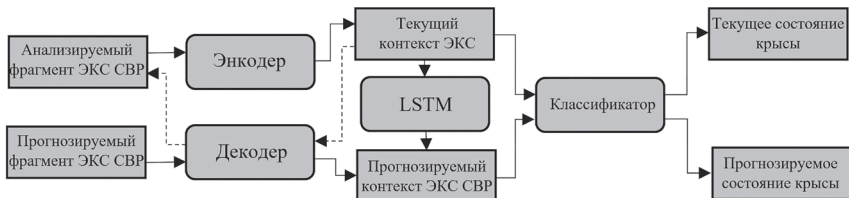


Рис. 1. Схема модели для классификации ЭКС СВР

Классификатор на основе архитектуры AlexNet, состоящий из 12 слов, оценивает вероятность принадлежности поступающего на вход модели предсказанного ЭКС СВР к одному из трех классов, соответствующих этапам эксперимента. Таким образом можно определить момент времени, когда начинают проявляться ранние маркеры острой ишемии миокарда, на основе имеющихся данных ЭКГ СВР.

В результате проведенных испытаний были получены многообещающие результаты. Разработанная модель может определить начало острой ишемии миокарда в среднем на 95,4 секунды раньше, чем явно проявляются стандартные признаки данной патологии. При этом точность прогноза для этапа «стабилизация» составляет 91,4 %, для этапа «ишемия» — 87,1 %, для этапа «реперфузия» — 93,4 %. Однако для решения таких задач, как классификация и кластеризация ЭКС, требуются значительные вычислительные ресурсы на обучение сложных моделей, что может ограничивать их использование в клинической практике. Помимо этого, высокое разрешение сигналов может привести к переобучению, особенно если количество размеченных данных ограничено. Поэтому дальнейшие исследования в области применения НС для обработки и анализа ЭКС СВР являются актуальными.

Благодарности

Финансовая поддержка работы была оказана Минобрнауки РФ, номер гос. регистрации темы 1023032800366-6.

Литература

1. Акаева Т.М., Каменский А.В., Бородин Н., Павлов В.Н., Билялов А.Р., Авзалетдинов А.М., Вильданов Т.Д. Методы цифровой обработки медицинских оптических изображений для улучшения качества диагностики заболеваний: обзор // Компьютерная оптика, 2025 г., Т. 49, №4, с. 593–623.
2. Frohlich E.D. Risk mechanisms in hypertensive heart disease // Hypertension, 1999, vol. 34, № 4, p. 782–789.
3. Gulyaev Y.V., Zaichenko K.V. Ultra-high resolution electrocardiography. Tasks. Problems. The prospects // Biomedical radioelectronics, 2013, vol. 9, p. 5–15.

4. Zaichenko K., Kordyukova A., Sonin D., Galagudza M. Ultra-High-Resolution Electrocardiography Enables Earlier Detection of Transmural and Sub-endocardial Myocardial Ischemia Compared to Conventional Electrocardiography // *Diagnostics (Basel)*, 2023, vol. 13, p. 2795.
5. Zaichenko K.V., Afanasenko A.S., Kordyukova A.A., Denisova E.A., Sevakov D.O., Development of an algorithm for preprocessing ultra-high resolution electrocardiosignals // *St. Petersburg Polytechnic University Journal. Physics and Mathematics*, 2023, vol. 16, № 3.2, p. 307–311.
6. Zaichenko K. V., Afanasenko A. S., Denisova E. A., Kordyukova A. A., Shevyakov D. O. Utilizing the convolutional neural network AlexNet to classify ultra-high resolution Electrocardiosignals // *St. Petersburg state polytechnical university journal Physics and Mathematics*, 2024, № 3.2, p. 292–296.
7. Aggarwal A., Chauhan A., Kumar D., Mittal M., Verma S. Classification of Fake News by Fine-tuning Deep Bidirectional Transformers based Language Model // *EAI Endorsed Transactions on Scalable Information Systems*, 2020, p. 163973.
8. Hochreiter S., Schmidhuber J. Long Short-Term Memory // *Neural Computation*, 1997, vol.9, p. 1735–1780.

ОБНАРУЖЕНИЕ ХАРАКТЕРНЫХ ТОЧЕК ЭЛЕКТРОКАРДИОСИГНАЛА НА ОСНОВЕ ДРОБНЫХ ПРЕОБРАЗОВАНИЙ

Е. П. Логачев

zhenya.logachev.94@mail.ru

*Институт аналитического приборостроения РАН, 198095,
Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А*

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) — основная причина смертности по данным ВОЗ, с ишемической болезнью сердца как наиболее распространенной причиной летальных исходов. Существуют различные методы регистрации электрокардиосигналов, включая ЭКГ расширенного амплитудного и частотного диапазона, которая фиксирует сигналы в расширенных диапазонах амплитуды и частоты [1–3].

Детекция характерных точек, таких как экстремумы и точки пересечения с изолинией, составляет фундаментальный этап анализа сигнала. В то время как традиционный анализ вариабельности сердечного ритма и усредненная кардиография фокусируются на выявлении поздних потенциалов, раскрытие комплексных закономерностей, зависящих от амплитуды пиков, невозможно без применения современных математических аппаратов. К ним относятся методы дробного исчисления, нечеткой логики и алгоритмов поиска скрытых маркеров, что в совокупности позволяет перейти от описательного анализа к прогностическому моделированию.

В работе реализованы и протестированы три подхода к автоматическому выявлению R-пиков в ЭКГ на основе современных методов анализа сигналов, а именно дробное исчисление и нечеткая логика. Первый метод использует дробные производные и амплитудные огибающие: он прост в реализации и чувствителен к крутым фронтам QRS, но подвержен влиянию шумов (рис. 1). Второй метод основан на дробном непрерывном вейвлет-преобразовании и дробном дифференцировании мощности (рис. 2), что обеспечивает высокую

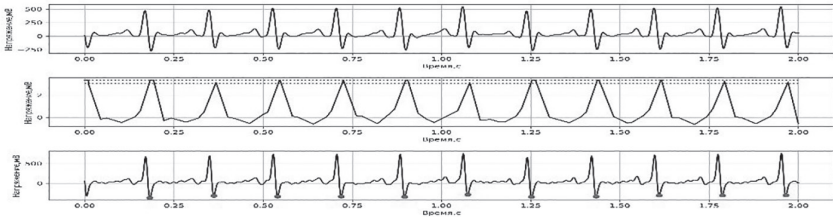


Рис. 1. Этапы поиска S-зубцов при помощи дробных производных

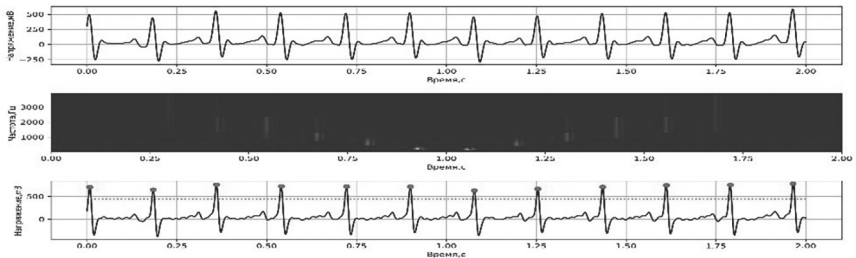


Рис. 2. Этапы работы алгоритма, основанного на дробном непрерывном вейвлет-преобразовании

устойчивость к шумам и точное выделение QRS-комплексов во временно-частотной области, хотя требует значительных вычислительных ресурсов. Третий метод применяет дробное и кратковременное преобразование Фурье, позволяя фиксировать локальные энергетические всплески, характерные для QRS, но ограничен разрешением по времени и частоте. Четвертый метод основан на применении алгоритма нечеткой кластеризации (fuzzy c-means) к спектру вейвлет-преобразования мощности, что обеспечивает гибкое и устойчивое выделение характерных гребней. Благодаря нечеткой природе кластеризации, границы между сегментами становятся плавными, что адекватно отражает физическую неопределенность локализации сигналов во времени и частоте. После кластеризации осуществляется фильтрация центров масс выделенных гребней вдоль временной

оси, что позволяет подавить шумовые компоненты и усилить релевантные временные структуры. Предложенный подход демонстрирует высокую эффективность в задачах анализа нестационарных сигналов, где требуется точное выделение динамических особенностей.

На основе проведенного качественного анализа четырех предложенных подходов к детекции R-пиков в электрокардиосигнале с использованием различных математических аппаратов (дробное исчисление, вейвлет-анализ, нечеткая логика) были получены следующие выводы.

Временной подход на основе дробных производных, несмотря на простоту реализации и высокую чувствительность к крутым фронтам QRS-комплексов, оказался неприменим для обработки зашумленных данных из-за фундаментального свойства операции дифференцирования усиливать высокочастотные шумовые компоненты.

Все временно-частотные подходы (на основе дробного непрерывного вейвлет преобразования, дробного кратковременного Фурье-преобразования и нечеткой кластеризации) продемонстрировали значительно более высокую устойчивость к артефактам и вариациям амплитуды по сравнению с временным методом.

Наилучший компромисс между точностью детекции и устойчивостью к помехам обеспечил подход на основе дробного непрерывного вейвлет-преобразования. Его ключевое преимущество заключается в способности адаптивно подавлять шумовые компоненты без существенных потерь полезной информации о морфологии QRS-комплекса.

Подход на основе нечеткой кластеризации также показал высокую эффективность, особенно в условиях нестационарных сигналов, а его вычислительная сложность может быть оптимизирована для практического применения.

Таким образом, проведенное исследование подтвердило перспективность использования временно-частотных подходов, в особенности метода на основе дробного непрерывного вейвлет-преобразования, для надежной детекции характерных точек в зашумленных электрокардиосигналах расширенного диапазона.

Литература

1. Новые методы электрокардиографии / под ред. С. В. Грачева, Г. Г. Иванова, А. Л. Сыркина. М.: Техносфера, 2007. 552 с.
2. Оппенгейм, А. Цифровая обработка сигналов. / А. Оппенгейм, Р. Шафер // М.: Техносфера, 2006. 856 с.
3. Основы цифровой обработки сигналов: учеб. пособие / В. Г. Коберниченко; М-во науки и высш. образования Рос. Федерации, Урал.федер. ун-т. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2018. 150 с.

МИНИАТЮРНЫЙ ОПТИЧЕСКИЙ ДАТЧИК ДЛЯ МОНИТОРИНГА МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ ПРИ ТЕПЛОВОЙ ПРОБЕ

Е. А. Медведева*, С. Бадретдинова, М. К. Пенченко

* emedvedeva.22@mail.ru

*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29*

Современные медицинские исследования демонстрируют растущий научный интерес к изучению микроциркуляции, что вполне оправдано, учитывая, что нарушения в капиллярной сети — ответственной за тканевый метаболизм — лежат в основе многочисленных патологических состояний [1]. Широкий спектр заболеваний может нарушать микроциркуляторную сеть кожи и инициировать местное воспаление. Патологические изменения проявляются в первую очередь в капиллярах из-за их малого размера и высокой плотности.

Функциональные провокационные тесты получили широкое распространение для выявления скрытых гемодинамических нарушений и оценки реактивности капиллярной сети [1]. К ним относятся: окклюзионные тесты, измеряющие резерв кровотока при прекращении артериального притока; дыхательные тесты, оценивающие сосудистую

реактивность через симпатически опосредованный микрососудистый спазм; постуральные тесты, оценивающие веноартериолярные реакции; и термические нагрузки. Особую ценность представляют тепловые провокационные тесты.

Данное исследование посвящено применению миниатюрного оптического датчика для мониторинга изменений микроциркуляции во время проведения тепловых проб (при нагревании и охлаждении). Экспериментальная установка миниатюрного оптического датчика для мониторинга микроциркуляции подробно описана в работе [2]. Оптический датчик содержит лазер, оптику (собирающую линзу и оптическое волокно), детектирующую часть (фотодетектор и аналого-цифровой преобразователь) и анализирующую систему. Лазерное излучение проходит через собирающую линзу (размер пятна 2 мм) и попадает на участок кожи. Излучение, рассеянное на эритроцитах, регистрируется оптическим фотодетектором с использованием оптического волокна. Далее сигнал подается на анализирующую систему. С помощью специальной программы строится автокорреляционная функция и вычисляется время корреляции, из которого находится скорость кровотока.

Измерения скорости кровотока проводились на подушечке указательного пальца как в состоянии покоя, так и при нагревании и ох-

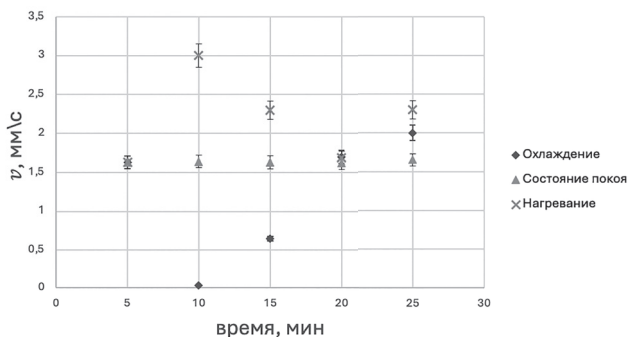


Рис. 1. Результаты измерений скорости кровотока при проведении тепловой пробы для одного добровольца в течение 30-минутного периода

лаждении. На рис. 1 представлены измерение скорости кровотока при проведении тепловой пробы для одного добровольца в течение 30-минутного периода.

Как видно на рис. 1, средняя скорость кровотока для добровольца в нормальных условиях (отметка 5 минут) согласуется с литературными данными и составляет 1,6 мм/с. После применения холодовой пробы, скорость значительно снизилась из-за сужения капилляров до 0,02 мм/с. После 15-й минуты наблюдалось постепенное восстановление до исходного уровня к 20-й минуте. После этого было зафиксировано дальнейшее увеличение скорости кровотока (2 мм/с), обусловленное расширением капилляров, вызванным термическим ответом на холодное воздействие. В то время как при нагревании (на 10 минуте) наблюдалось заметное увеличение скорости кровотока (до 3 мм/с) и также постепенное восстановление до исходного уровня к 20-й минуте.

Таким образом, количественное определение скорости кровотока с помощью оптического датчика во время локальных тепловых проб дает ключевое представление о целостности капиллярной сети. Этот метод особенно полезен для раннего выявления микрососудистых нарушений на стадии, когда изменения остаются обратимыми и функциональными. Отслеживание тонких сосудистых изменений позволяет принимать профилактические меры для избежания серьезных осложнений, таких как язвы и некроз.

Перспективы дальнейших исследований связаны с расширением клинической валидации разработанного метода, включая обследование пациентов с различными формами сосудистой патологии, а также с оценкой эффективности датчика в условиях длительного мониторинга.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (государственное задание 075-03-2025-256/7).

Литература

1. Федорович А. А. и др. Новые тренды развития направления по неинвазивному исследованию микроциркуляции в коже человека.

Описательный обзор //Кардиоваскулярная терапия и профилактика. — 2025. Т. 24. № 6. С. 95–105.

2. Савченко Е. А., Величко Е. Н. Применение спекл-корреляционного анализа для определения скорости кровотока // Оптика и спектроскопия. 2020. Т. 128— № 7. С. 991–997.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ГРАДУИРОВКИ СЕНСОРОВ НА АММИАК

Е. В. Матьяш*, С. С. Ермаков, И. В. Приходько

* e.matiash@mail.ru

*Санкт-Петербургский государственный университет, 199034,
Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9*

Современная медицина активно развивает методы диагностики по анализу метаболитов — продуктов обмена веществ в организме. Суть метода заключается в том, что при различных заболеваниях метаболический профиль человека меняется. Например, уровень аммиака может указывать на определенные проблемы со здоровьем. Удобным способом измерения таких метаболитов является анализ выдыхаемого воздуха. Этот метод полностью неинвазивен, недорог и прост, что позволяет использовать его для массовых проверок населения.

Для градуировки печатного электрода использовалась модельная газовая смесь, состав которой имитировал выдыхаемый человеком воздух, обогащенный парами воды и аммиака.

Концентрацию аммиака в модельной газовой смеси, имитирующей выдыхаемый воздух, определяли методом ионной хроматографии.

Процедура анализа состояла в следующем: 25 мл исследуемого раствора помещали в чашку Петри под герметичный пластмассовый купол с затвором. В течение 3 часов пары аммиака насыщали воз-

душное пространство под куполом (влажность и температура контролировалась гигрометром). Затем через открытое отверстие с помощью компрессора прокачивали воздух через склянку Дрекселя с 0,1 М H_2SO_4 (скорость 0,6 л/мин). Содержание аммиака в конечном растворе серной кислоты определяли при помощи ионного хроматографа.

На заключительном этапе работы было проведено непосредственное детектирование аммиака с использованием электрохимических сенсоров.

В работе использовались коммерческие трехэлектродные сенсоры производства «Poten» (Китай). Конструкция сенсора представляет собой подложку из полиэтилентерефталата (ПЭТ), на которой методом трафаретной печати наносились графитовые рабочий и вспомогательный электроды, а также серебряный электрод сравнения и токопроводящие контакты. В качестве модифицирующего раствора был выбран сульфат меди. Это решение было обусловлено способностью ионов меди, как и некоторых других d-элементов, к образованию прочных координационных соединений с аммиаком. Данная реакция комплексообразования характеризуется значительным сме-

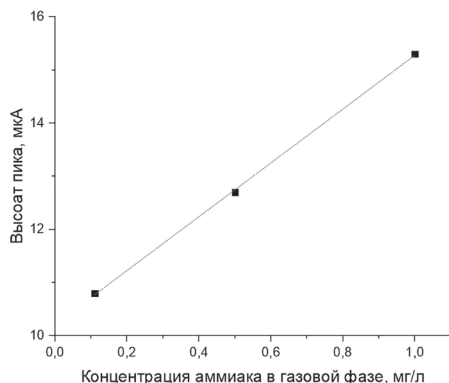


Рис. 1. Зависимость увеличения высоты пика аммиака от концентрации аммиака в газовой фазе, определенной из хроматографического эксперимента

щением равновесия в сторону образования продуктов. Ключевыми преимуществами используемых электродов являются их высокая селективность по отношению к аммиаку и отсутствие чувствительности к воде.

В герметичный купол объемом 3,7 л помещали чашку Петри с 25 мл раствора аммиака и выдерживали в течение 3 часов для достижения равновесного распределения паров в воздушной среде. Затем с помощью компрессора воздух из купола через силиконовый шланг подавали в измерительную камеру с установленным электродом. Продолжительность продувки составляла 100 секунд. После этого регистрировали электрохимический отклик, анализ которого проводили по верхнему пику на циклической вольтамперограмме (ЦВА) (см. рис. 1).

Уравнение регрессии

$$y = 10 + 5 \cdot x$$

R-Square (COD)

0,999

В результате работы была установлена зависимость между высотой пика ЦВА и концентрацией аммиака, которая позволяет количественно определять аммиак в газовой фазе. Данная методика перспективна для применения в клинической диагностике по метаболитам выдыхаемого воздуха.

Литература

1. Dmitrienko, M. A. Processes of gaseous biomarkers formation in persistent *Helicobacter pylori* infection — biotechnological model / M. A. Dmitrienko, A. I. Ginak // *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2017, Vol. 7, No 1, pp. 133–139. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2017-7-1-133-139>.
2. Graham, David Y. *Helicobacter pylori* urease for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: A mini review / David Y. Graham, Muhammad Miftahussurur // *Journal of Advanced Research*, Airlangga University, Surabaya, Jawa Timur, Indonesia. — 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.01.006>.
3. Nelson D. *Basics of Leninger biochemistry: in 3 vols*. Moscow. BINOM. Laboratory of Knowledge Publ., 2014, 636 p. (In Russ.) Нельсон Д. Основы биохимии Ленинджера: в 3 т. Т. 2/ Д. Нельсон, М. Кокс; пер. с англ. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. 636 с.

РЕГИСТРАЦИЯ БЕЛКОВ С ПОМОЩЬЮ ТВЕРДОТЕЛЬНОЙ НАНОПОРЫ

Л. М. Друян^{1,*}, Н. В. Ваулин², А. С. Букатин^{2,3}, И. С. Мухин², Д. В. Лебедев^{2,3}

* lidia.druy@gmail.com

¹ Университет ИТМО, Санкт-Петербург, 197101, Кронверкский пр., д. 49

² СПбАУ РАН им. Ж. И. Алферова, 194021, Санкт-Петербург, ул. Хлопина, 8/3, лит. А

³ Институт аналитического приборостроения РАН, 198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А

Метод твердотельной нанопоровой детекции позволяет в реальном времени наблюдать динамику белок-белковых взаимодействий. В данной работе были зарегистрированы образования функционального комплекса между 20S протеасомой, ее активатором PA28 и субстратом [1]. Было также показано, как сигналы тока отражают изменение комплекса (рис. 1).

Принцип работы используемого метода основан на использовании экспериментальной ячейки, разделенной мембраной с единичной нанопорой на два отдельных отсека — цис и транс. Оба отсека наполняются буферным раствором 0,1 М KCl в PBS. После погружения AgCl электродов при приложении разности потенциалов, которая варьировалась в диапазоне от –300 до +300 мВ, возникает ионный ток. Состав буфера и величина приложенного напряжения являются одними из ключевых параметров, так как они напрямую влияют на величину ионного потока через пору.

Когда молекула входит в пору или приближается к ее входу, она частично блокирует поток ионов, что вызывает характерные изменения тока [2]. Характер этих изменений зависит от размера, заряда и поведения молекулы. Так, малые молекулы, сопоставимые с размерами поры, вызывают кратковременные спады тока небольшой амплитуды, так как практически мгновенно проходят через нанопору. В отличие от них, крупные молекулы или надмолекулярные комплексы могут фиксироваться внутри, создавая длительные, устойчивые

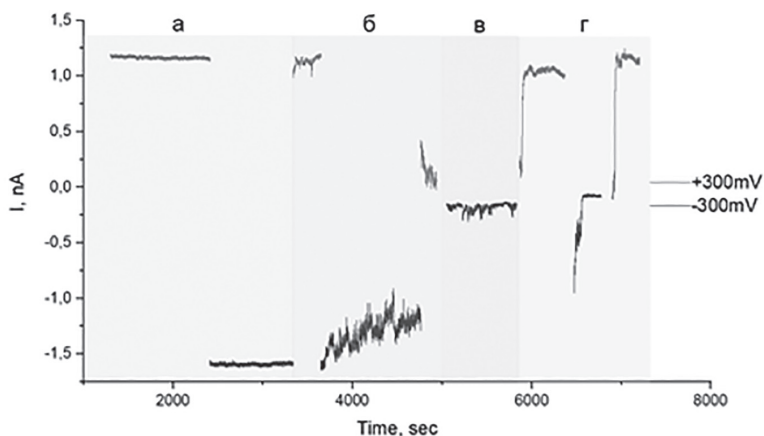


Рис. 1. Зависимость тока от времени, отражающая взаимодействие 20S протеасомы с нанопорой: (а) — буферный раствор; (б) — введение в систему протеасомы с последующим снижением уровня тока; (в) — блокировка нанопоры; (г) введение комплекса PA28+MBP

падения тока. Также наблюдаются сложные сигналы, такие как ступенчатые блокировки, которые могут указывать на поэтапную перестройку или диссоциацию молекулы прямо внутри поры. Помимо дискретных событий, может наблюдаться и постепенное снижение базового уровня тока, что, как правило, свидетельствует о засорении поры или адсорбции молекул на ее поверхности. Таким образом, анализируя форму, амплитуду и длительность этих токовых сигналов, можно делать выводы о природе и динамике изучаемых биофизических процессов.

Литература

1. Frayssinhes J.A. et al. PA28 γ -20S proteasome is a proteolytic complex committed to degrade unfolded proteins // Cell Mol Life Sci. 2021 Vol. 79(1):45.
2. Nathan Meyer et al. Solid-state and polymer nanopores for protein sensing: A review // Advances in Colloid and Interface Science. 2021 Vol. 298.

ИНТЕГРАЦИЯ ОПТИЧЕСКИХ И ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ *IN VIVO* ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ НАРУШЕНИЙ НЕЙРОННОЙ АКТИВНОСТИ ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

А. И. Ерофеев, Е. К. Винокуров, **К. Д. Кулясов***, О. Л. Власова,
И. Б. Безпрозванный
*kirkakul13@gmail.com

*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29*

Современная нейрофизиология преимущественно ориентирована на исследование активности нейронных сетей мозга с использованием электрофизиологических методик и прижизненной кальциевой визуализации. Их интеграция позволяет в одном и том же животном *in vivo* одновременно фиксировать оптические и электрические сигналы, что существенно расширяет возможности изучения механизмов нейродегенеративных заболеваний, в том числе болезни Альцгеймера.

В данной работе применялись миниатюрная однофотонная флуоресцентная микроскопия и регистрация локальных полевых потенциалов с использованием беспроводного модуля [1]. Параллельно оценивали ассоциативное обучение и память в парадигме обусловливания страха у двух групп мышей: линии 5xFAD (модель болезни Альцгеймера) и мышей дикого типа.

Анализ электрофизиологических записей во время теста показал, что у мышей дикого типа амплитуда локальных полевых потенциалов выше, чем у 5xFAD. Данные визуализации также продемонстрировали, что у животных дикого типа на базовом уровне страха возрастает максимальное число одновременно активных нейронов и количество кальциевых событий на нейрон по сравнению с модельной группой.

Полученные результаты обучения и формирования условного страха показали выраженные различия в поведенческих паттернах двух групп животных: на 3-й и 10-й дни эксперимента выявили

выраженные различия между группами, что указывает на существенный дефицит ассоциативного обучения и памяти у мышей 5xFAD.

В совокупности полученные данные демонстрируют снижение нейронной активности и нарушения пространственного кодирования в модели 5xFAD, подчеркивая важность ранней диагностики и своевременного вмешательства при данном заболевании [2]. Последующая работа по устранению имеющихся ограничений исследования, в свою очередь, может способствовать разработке новых терапевтических подходов, направленных на поддержание когнитивных функций и замедление прогрессирования болезни Альцгеймера.

Литература

1. Erofeev A. I., Vinokurov E. K., Antifeev I. E., Vlasova O. L., Bezprozvanny I. B. Integration of Single-Photon Miniature Fluorescence Microscopy and Electrophysiological Recording Methods for in vivo Studying Hippocampal Neuronal Activity // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology, 2024, Vol. 60, No. 4, pp. 1586–1606
2. Erofeev A., Vinokurov E., Bol'shakova A., Bezprozvanny I., Vlasova O. (2025) Disrupted calcium dynamics and electrophysiological activity in the stratum pyramidale and hippocampal alveus during fear conditioning in the 5xFAD model of Alzheimer's disease. Front. Aging Neurosci. 17:1550673.

ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АДРЕНАЛИНА НА ЭЛЕКТРОДЕ, МОДИФИЦИРОВАННОМ МОЛЕКУЛЯРНО ИМПРИНТИРОВАННЫМ ПОЛИМЕРОМ

Д. Ю. Хайруллина*, А. Б. Сахабутдинов, Ю. А. Лексина, И. А. Челнокова,
Л. Г. Шайдарова

* khairullinadarina@gmail.com

*Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, Казань,
ул. Кремлевская, 18*

Адреналин (АД) — это гормон, который относится к группе катехоламинов, вырабатываемых надпочечниками, и является одним из самых активных нейромедиаторов. Кратковременное повышение уровня АД тренирует сердечную мышцу, но длительное превышение может привести к перегрузке сердца и сосудов, что увеличивает риск сердечно-сосудистых заболеваний. Регулярный мониторинг уровня АД может помочь в выявлении опухолей, новообразований и других патологий, связанных с надпочечниками. Значительно повысить чувствительность вольтамперометрического метода анализа позволяют химически модифицированные электроды (ХМЭ). Особый интерес представляют ХМЭ на основе электрополимеризованных молекулярно импринтированных полимеров (МИП), которые обладают способностью к высокоспецифичному взаимодействию с шаблоном, что улучшает селективность определения.

В настоящей работе оценена возможность использования стеклоглеродного электрода (СУЭ), модифицированного МИП из никотинамида (МИП-СУЭ) для вольтамперометрического определения АД.

Формирование МИП на поверхности СУЭ проводили путем электрополимеризации из раствора никотинамида в присутствии молекулы-шаблона АД в условиях циклической вольтамперометрии. Удаление молекул-шаблона из матрицы полиникотинамида проводили путем многократного сканирования потенциала до достижения стабилизации тока. С целью разработки модифицированного

электрода, обладающего высокой чувствительностью, были проведены исследования по подбору условий электрополимеризации МИП. Рассмотрены зависимости от количества циклов формирования и переокисления полимера, скорости сканирования, концентрации молекулы-шаблона и мономера. По полученным данным были выбраны оптимальные условия формирования пленки МИП.

На немодифицированном СУЭ в кислой среде на анодной ветви регистрируется пик окисления АД при E_n 0,95 В, который сильно растянут по оси потенциалов. При переходе на электрод МИП-СУЭ, благодаря электропроводящим свойствам образующейся полимерной пленки, наблюдается смещение пика окисления АД в катодную область на 350 мВ и увеличение высоты тока окисления АД в 4 раза по сравнению с немодифицированным СУЭ. Линейная зависимость анодного тока от концентрации АД наблюдается в интервале $5 \times 10^{-7} \dots 5 \times 10^{-3}$ моль/л. По угловому коэффициенту билогарифмической зависимости тока пика окисления АД от скорости наложения потенциала установлено, что процесс контролируется химической реакцией.

Разработан способ вольтамперометрического определения АД на предлагаемом модифицированном электроде. Предложенный способ позволяет проводить селективное определение АД в присутствии соединений, проявляющих электрохимическую активность в этой же области потенциалов. Правильность методики определена методом введено-найдено. Предложенный способ вольтамперометрического определения АД апробирован при анализе некоторых лекарственных средств.

ПРОТОТИПИРОВАНИЕ ЗРИТЕЛЬНЫХ ИМПЛАНТОВ С ПОМОЩЬЮ БИОЛАБОРАТОРНОГО ОБОРУДОВАНИЯ

М. М. Гагарина*, А. А. Абелит, Н. А. Бойцова, Д. Д. Ступин

* antaryo@gmail.com

*СПбАУ РАН им. Ж. И. Алферова, 194021, Санкт-Петербург, ул. Хлопина, 8/3,
лит. А*

Одной из часто встречающихся причин слепоты и слабовидения являются дегенеративные заболевания сетчатки, в частности, пигментный ретинит и возрастная макулярная дегенерация. В процессе патогенеза данных заболеваний происходит гибель фоторецепторов, в то время как остальные слои сетчатки остаются частично функционирующими, что открывает возможность для ее искусственной стимуляции с помощью зрительных имплантов — массивов микроэлектродов, которые выполняют функции утраченных фоторецепторов. Современные хирургические методики позволяют устанавливать данные электронные устройства в глаз человека. Слепые пациенты при помощи таких зрительных «протезов» начинают ориентироваться в пространстве и даже читать крупные контрастные буквы [1]. Тем не менее, несмотря на впечатляющие результаты в области нейропротезирования сетчатки, изготовление и установка таких имплантов являются дорогостоящими и трудоемкими процессами, что снижает покупательскую способность пациентов, в результате чего производство таких приборов становится экономически невыгодным [2]. Для преодоления данного экономического барьера нами была разработана технология изготовления гибких полиимидных биоэлектронных приборов с медно-оловянными электродами, которая не использует стандартное фотолитографическое оборудование и дорогие расходные материалы. Для процесса литографии применялся биологический флуоресцентный микроскоп Zeiss Observer.Z1 (Zeiss, Германия), оснащенный моторизованным столиком, и специально написанное программное обеспечение PiPer4, позволяющее им управлять в соответствии с заданным рисунком-фотошаблоном (ср. с [3,



Рис. 1. Изготовленный прототип зрительного импланта (слева) и фотография его микроэлектродного массива (справа). Маркер соответствует 100 мкм

4)]. Данная технология позволила нам создать прототип зрительного импланта (рис. 1), который обладает оптимальными размерами для субретинальной имплантации. Прототип устройства имеет 4 электрода размером $200 \times 200 \text{ мкм}^2$ (размер аналогичен системе Argus II [5]), от которых идут токоведущие дорожки к 4 контактным площадкам размером 12 мм^2 , а общая длина устройства составляет 18 мм.

Электроды и токоведущие дорожки являются «внутриглазной» частью устройства, а контактные площадки закрепляются снаружи глаза на склере с помощью ленты из силикона 40 SilcoPlat (Shenxhen YiJiasan Silicone Co., Ltd, Китай). Через контактные площадки возможно подключение внешних устройств, позволяющих производить электрическую стимуляцию сетчатки или регистрировать ее собственную активность. Разработанный нами технологический процесс и использование доступных расходных материалов позволят существенно сократить расходы при изготовлении зрительных протезов, сделав их более доступными для пациентов и обеспечивая таким образом для них возможность снова увидеть мир.

Благодарности

Авторы выражают благодарность А. В. Нашекину, А. И. Лихачеву, К. П. Котляру и М. В. Дубине за всестороннюю помощь и поддержку. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (FSRM-2024-0001).

Литература

1. Нероев В.В., Астахов Ю.С., Лобанова М.М., Ступин Д.Д., Верлов Н.А., Рязанцев М.Н., Зайцева О.В., Богданов А.А., Васильев В.Н., Дубина М.В. Искусственное зрение: успехи, проблемы, перспективы (обзор) // Российский офтальмологический журнал, 2018. Т. 11, № 1, с. 3–27.
2. Van Stuijvenberg, Odile C., Annelien L. Bredenoord, Marike LD Broekman, and Karin R. Jongsma. Leaving users in the dark: A call to define responsibilities toward users of neural implanted devices. // AJOB neuroscience, 2022. Т. 13, № 4, pp. 233–236.
3. Leigh, Steven Y., Aashay Tattu, Joseph SB Mitchell, and Emilia Entcheva. “M3: Microscope-based maskless micropatterning with dry film photoresist.” // Biomedical microdevices, 2011. Т. 13, № 2, pp. 375–381.
4. Higgins, MacCallister, and Emil J. Geiger. Epifluorescent direct-write photolithography for microfluidic applications // Journal of Micro/Nanolithography, MEMS, and MOEMS, 2015. Т. 14, № 1.
5. Luo YH, da Cruz L. The Argus(®) II Retinal Prosthesis System // Prog Retin Eye Res, 2016. Т. 50, pp. 89–107.

PIPER4 И NELM — ОТКРЫТЫЕ ПРОГРАММНЫЕ ПАКЕТЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИОЭЛЕКТРОННЫХ ПРИБОРОВ И ОБРАБОТКИ ПОЛУЧАЕМЫХ С ИХ ПОМОЩЬЮ ДАННЫХ

Н. А. Бойцова*, А. А. Абелит, Д. Д. Ступин

* natab2002@yandex.ru

*СПбАУ РАН им. Ж. И. Алфёрова, 194021, Санкт-Петербург, ул. Хлопина, 8/3,
лит. А*

Несмотря на то, что сегодня биоэлектронные технологии достигли значительного прогресса в области биосенсорной инженерии, тераностике и нейропротезировании, их дальнейшее развитие и распространение ограничиваются как экономическими

факторами, связанными с высокой стоимостью производства и обслуживания биоэлектронных приборов, так и с фундаментальными проблемами анализа и обработки биологических данных [1–3]. В частности, сегодня для изучения биоимпедансных явлений, как правило, используется малоинформативный Cell Index подход, а для изготовления самих биоимпедансных сенсоров применяется дорогое литографическое оборудование [1]. В настоящей работе мы предлагаем два программных продукта, которые позволяют как уменьшить стоимость производства биоэлектронных приборов для биологических лабораторий, так и значительно повысить эффективность выделения полезного сигнала из биоимпедансных спектров. Первый программный продукт — PiPer4 ($\pi/4$) — представляет собой написанный на языке Delphi драйвер-САПР, который через WinAPI-интерфейс способен подключаться к биологическим флуоресцентным микроскопам, оснащенным моторизированными столиками, превращая их таким образом в безмасочные литографические машины. Второй программный продукт — многофункциональный анализатор импедансных спектров NELM [4], написанный на языке MatLab/GNU Octave, — предназначен для сопоставления биоимпедансных спектров с различными теоретическими и феноменологическими моделями (эквивалентными схемами) с помощью нелинейного комплексного метода наименьших квадратов [5]. Оба программных пакета являются открытыми продуктами, что позволяет с минимальными затратами для ученых-биологов наладить применение в их лабораторной практике биоэлектронных технологий. В частности, с помощью пакета PiPer4 возможно изготовление мультиэлектронных матриц с электродами 50–100 мкм, а применение пакета NELM позволяет одновременно изучать и различать биологические, физические и химические феномены, которые возникают на границе металл / электролит / живая материя. Мы надеемся, что разработанные нами программные решения сделают биоэлектронные технологии доступными для большинства научных и медицинских центров и тем самым позволят справиться с современными актуальными проблемами здравоохранения, биосенсорной инженерии и прикладной биологии.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (госзадание FSRM-2024-0001)

Литература

1. Stupin, Daniil D., Ekaterina A. Kuzina, Anna A. Abelit, Anton K. Emelyanov, Dmitrii M. Nikolaev, Mikhail N. Ryazantsev, Sergei V. Koniakhin, and Michael V. Dubina. "Bioimpedance spectroscopy: basics and applications." *ACS Biomaterials Science & Engineering* 7, no. 6 (2021): 1962–1986.
2. Нероев, В. В., Ю. С. Астахов, М. М. Лобанова, Д. Д. Ступин, Н. А. Верлов, М. Н. Рязанцев, О. В. Зайцева, А. А. Богданов, В. Н. Васильев, М. В. Дубина. Искусственное зрение: успехи, проблемы, перспективы // *Российский офтальмологический журнал* 11, no. 3 (2018): 3–27.
3. Van Stuijvenberg, O.C., Bredenoord, A.L., Broekman, M.L. and Jongsma, K.R., 2022. Leaving users in the dark: A call to define responsibilities toward users of neural implanted devices. *AJOB neuroscience*, 13(4), pp. 233–236.
4. Boitsova, Natalia A., Anna A. Abelit, and Daniil D. Stupin. "NELM: Modern Open-Source Software for Multipurpose Impedance Spectra Analysis." *arXiv preprint arXiv:2506.01997* (2025). <https://github.com/BioElectronicsLab/NELM-1.0-beta>
5. Macdonald, J. Ross, J. Schoonman, and A. P. Lehn. "Applicability and power of complex nonlinear least squares for the analysis of impedance and admittance data." *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* 131 (1982): 77–95.

ПРИЖИЗНЕННАЯ ФЛЮОРЕСЦЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА КЛЕТОК В БИОЭЛЕКТРОННЫХ УСТРОЙСТВАХ ПРИ ПОМОЩИ КРАСИТЕЛЯ ABDS

А. А. Абелит*, Н. А. Бойцова, Д. Д. Ступин

* anna.abelit@gmail.com

*СПбАУ РАН им. Ж. И. Алферова, 194021, Санкт-Петербург, ул. Хлопина, 8/3,
лит. А*

На сегодняшний день одной из быстроразвивающихся областей в биоэлектронике является разработка импедансных цитосенсоров [1–3], в частности мультиэлектродных матриц (МЭМ). Хотя коммерческие МЭМ уже сегодня широко применяются в биологии и медицине, задача поиска и апробации перспективных материалов для изготовления новых типов МЭМ остается по-прежнему актуальной. Например, в последнее время возрос интерес к МЭМ на основе кремния [4–6], широко применяющегося в электронной промышленности. Однако, как и большинство материалов, используемых для создания электродов МЭМ [7], кремний является непрозрачным, следовательно, возникает необходимость в оптическом контроле взаимодействия клеток с биоэлектродами на его основе. В данной работе мы предлагаем доступную с точки зрения затрат времени и денег технологию прижизненной визуализации клеток на непрозрачных поверхностях при помощи красителя ABDS [8], который изготавливается из чернил красного перманентного маркера. Для апробации предложенного метода визуализации, мы использовали клетки HeLa, рассеянные на поверхность МЭМ-подобного устройства, представляющего собой чашку Петри из кремниевой подложки и PETG-кольца, изготовленного с помощью 3D-печати. В результате мы обнаружили, что при 20×-увеличении изображения клеток в отраженном свете не позволяют делать выводы об их количестве и состоянии, в то же время клетки, окрашенные с помощью ABDS, хорошо различимы даже на краю чашки Петри, где особенно сильны вызванные образованием мениска клеточной среды оптические

искажения фотографий. Ранее аналогичный эффект мы наблюдали с помощью красителя Hoechst [9], стоимость которого значительно превышает стоимость ABDS. Таким образом, в ходе данной работы мы создали простой и экономически эффективный метод визуализации живых клеток на непрозрачных поверхностях с помощью красителя на основе чернил красного перманентного маркера и успешно апробировали его на примере кремниевой подложки. Мы надеемся, что предложенный нами метод позволит существенно упростить разработку новых цитосенсоров и подбор оптимальных материалов для их изготовления.

Благодарности

Авторы выражают благодарность М. И. Блиновой и М. В. Дубине за всестороннюю помощь и поддержку. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (FSRM-2024-0001).

Литература

1. Stupin Daniil D., Ekaterina A. Kuzina, Anna A. Abelit, et al., Bioimpedance spectroscopy: basics and applications, ACS Biomaterials Science & Engineering 7, no. 6 (2021): 1962–1986.
2. Neroev V. V., Astakhov Yu S., Lobanova M. M., Stupin D. D. et al., Artificial vision: advances, topical issues, and prospects, Russian Ophthalmological Journal 11, no. 3 (2018): 3–27.
3. Jiang, Wen G., ed., Electric cell-substrate impedance sensing and cancer metastasis. Vol. 17. Springer Science & Business Media, 2012.
4. Chi, Taiyun, Jong Seok Park, Jessica C. Butts, Tracy A. Hookway, Amy Su, Chengjie Zhu, Mark P. Styczynski, Todd C. McDevitt, and Hua Wang A multi-modality CMOS sensor array for cell-based assay and drug screening. IEEE transactions on biomedical circuits and systems 9, no. 6 (2015): 801–814.
5. Abbott, Jeffrey, Avik Mukherjee, Wenxuan Wu, Tianyang Ye, Han Sae Jung, Kevin M. Cheung, Rona S. Gertner, Markus Basan, Donhee Ham, and Hongkun Park Multi-parametric functional imaging of cell cultures and tissues with a CMOS microelectrode array. Lab on a Chip 22, no. 7(2022): 1286–1296.
6. Pui, Tze Sian, Yu Chen, Chee Chung Wong, Revanth Nadipalli, Roshan Weerasekera, Sunil K. Arya, Hao Yu, and Abdur RA Rahman High density

CMOS electrode array for high-throughput and automated cell counting. Sensors and Actuators B: Chemical 181 (2013): 842–849.

7. Tanwar A. et al. “A review on microelectrode array fabrication techniques and their applications.” Materials Today Chemistry. 2022. T. 26. P. 101153.

8. Abelit, Anna A., Natalia A. Boitsova, Liudmila E. Yakovleva, Anton A. Kornev, and Daniil D. Stupin. «A Beauty Dye Staining (ABDS)—inexpensive marker-ink based open-source alternative for commercial membrane vital dyes.» bioRxiv (2025): 2025–04.

9. Stupin, Daniil D., Natalia A. Boitsova, Phillip M. Dubina, Nikolai A. Verlov, and Anna A. Abelit. «Autostainer feature for multielectrode arrays: proof-of-concept.» St. Petersburg Polytechnic University Journal: Physics and Mathematics 75, no. 3.1 (2024): 320–324.

РАЗРАБОТКА ГИБРИДНОЙ МИКРОФЛЮИДНОЙ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ПЛЕНОЧНОГО ФОТОРЕЗИСТА ДЛЯ СИНТЕЗА МАГНИТНЫХ ЛИПОСОМ

К. Е. Брусина, **Р. Вальшина***, С. П. Новикова, А. В. Полидаускайте,
К. Г. Гареев, Н. О. Ситков

* valshinaralina@gmail.com*

*Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет
«ЛЭТИ» им. В. И. Ульянова (Ленина), 197376, Санкт-Петербург,
Инструментальная, 2*

Магнитные липосомы являются перспективным инструментом в биомедицине, в частности, для целевой доставки лекарств в онкологии. Однако их широкому применению препятствует ограниченность надежных и воспроизводимых методов синтеза. Перспективным подходом является микрокапельный синтез в микрофлюидных системах (МФС), но ключевой проблемой становится использование в синтезе агрессивных органических растворителей, которые



Рис. 1 Изготовленная МФС и сформированные в ней капли

разрушают стандартные полимерные материалы МФС, такие как полидиметилсилоксан. В качестве материала для создания микрофлюидных каналов был выбран пленочный фоторезист ORDYL FP 440. Его главное преимущество — способность приобретать высокую химическую стойкость после термической обработки. Для создания герметичной системы применено термокомпрессионное соединение слоев фоторезиста при температуре 180 °С в течение 60 минут. Этот процесс не только обеспечивает прочное и герметичное соединение, но и дополнительно повышает химическую стабильность фоторезиста за счет его задубливания.

Методом фотолитографии на стеклянной подложке создается система микроканалов шириной 100 мкм с узлами смещения (30 и 60 мкм). Верхнее стекло с отверстиями для ввода реагентов, покрытое фоторезистом, соединяется с функциональным слоем методом термокомпрессии. Проведены испытания на стойкость к хлороформу. Функциональный слой сохранил целостность после 5 часов экспозиции, что существенно превышает требуемое время синтеза. В изготовленной МФС успешно продемонстрировано образование капель аэросила (рис. 1), что подтверждает применимость системы для задач микрокапельного синтеза.

Полученные результаты подтверждают функциональность и устойчивость разработанной МФС к агрессивным средам, что открывает возможности ее применения в синтезе магнитных липосом и других функциональных наноматериалов.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 25-79-10055).

Литература

1. Gareev K. G. et al. Biomimetic nanomaterials: diversity, technology, and biomedical applications //Nanomaterials. 2022. Т. 12 № 14. P. 2485.
2. Sitkov N. et al. Study of the fabrication Technology of hybrid microfluidic biochips for label-free detection of proteins //Micromachines. 2021. Т. 13. № 1. P. 20.
3. Nayak N. C. et al. Thermal bonding of PMMA: Effect of polymer molecular weight //Microsystem technologies. 2010. Т. 16. P. 487–491.

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ, ОПЫТ РАЗРАБОТКИ И ПРОИЗВОДСТВА ТВЕРДОТЕЛЬНЫХ УСТРОЙСТВ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В БИОМЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЯХ

М. Ш. Тугушев*, Я. Д. Седов, В. С. Гусев, А. Д. Смирнов

* tugushev@svetlana-ep.ru; tg.marat@yandex.ru

АО Светлана-Электронприбор, 194156, Санкт-Петербург, пр. Энгельса, 27, лит. С, пом. 2-Н

У многих ученых, связанных с разработкой новых устройств, возникают вопросы о необходимости изготовления макетных образцов. В своем докладе мы бы хотели рассказать о технологических возможностях изготовления прецизионных устройств, используя методы и процессы микроэлектронного производства. А также привести примеры изготовленных устройств различного назначения.

В рамках доклада рассказывается о технологических возможностях, приводятся выполняемые операции, с указанием достижимого разрешения, рассказывается о методах контроля заданных параметров.

Преимуществами применения возможностей микроэлектронного производства являются: получение прецизионной топологии, соответствующей исходным чертежам, использование особо чистых материалов, производство в чистых помещениях. Последние два пункта обеспечивают высокую воспроизводимость (повторяемость) получаемых образцов и минимальное загрязнение рабочих поверхностей образцов посторонними примесями, что особенно важно для дальнейшего проведения анализов биологических сред.

Среди наиболее важных применяемых операций хотелось бы выделить следующие: фотолитография с получаемым минимальным рисунком 3–5 мкм; химическое травление металлов, диэлектриков, глубокое изотропное и анизотропное травление кремния, практический опыт травления стекол с сохранением оптической прозрачности поверхности; получение биологически нейтрального слоя SiO_2 термически и плазмохимически; напыление тонких пленок металлов, различными методами вакуумного напыления: электроннолучевым, магнетронным и термическим. Из недавно освоенных операций наше предприятие стало применять: анодную сварку кремниевых и стеклянных пластин и электроэрозионную прошивку отверстий в боросиликатном стекле толщиной 200–2000 мм.

В части доклада, связанной с изготовлением макетов, приведены примеры реально изготовленных устройств, таких как, например:

1. Биочипы – ячейки для проведения анализов биологических сред на наличие широкого спектра веществ.

2. Мастер-формы – модули, представляющие собой инверсное изображение в кремниевой подложке. Используются в дальнейшем в качестве мастер-формы для получения отпечатка в силиконе.

3. Микрофлюидные чипы (МФЧ) – модули, используемые для смешивания реактивов и проведения анализов на патогены или секвенирования ДНК.

Это наиболее широко представленная группа устройств.

4. Капиллярный чип – модуль, состоящий из кремниевой пластины с V-образными канавками, в которые затем будут уложены микрокапилляры, а также пластмассовой оправки. В кремниевой пластине лазерной резкой сформировано сквозное отверстие.

5. Свободноподвешенная твердотельная мембрана — ячейка, представляющая собой кремниевую пластину, в которой анизотропным травлением получены отверстия, внутри которых остается мембрана из нитрида кремния. Может применяться в качестве подложки в просвечивающих электронных микроскопах или в качестве одно-молекулярного сита при формировании в мембране отверстия.

РЕГИСТРАЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ОДИНОЧНЫХ БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛ С ПОМОЩЬЮ ТВЕРДОТЕЛЬНОГО НАНОПОРОВОГО БИОСЕНСОРА

Н. В. Ваулин^{1,*}, Л. М. Друян², Д. В. Лебедев^{1,3}, А. С. Букатин^{1,3}, И. С. Мухин¹

*** nikitavaylin@mail.ru**

¹ *СПбАУ РАН им. Ж. И. Алферова, 194021, Санкт-Петербург, ул. Хлопина, 8/3, лит. А*

² *Университет ИТМО, Санкт-Петербург, 197101, Кронверкский пр., д. 49*

³ *Институт аналитического приборостроения РАН, 198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А*

В настоящее время одиночные твердотельные нанопоры находят широкое применение в областях детектирования органических и неорганических молекул аналита, моделирования трансмембранного транспорта, изучения механизмов связывания белковых молекул, преобразования энергии, а также в качестве селективных сенсоров сверхмалых концентраций аналита [1]. Работы по улучшению сенсорных свойств нанопор и развитию методов управления нанопоровым ионным и молекулярным транспортом направлены на улучшение пространственного разрешения детектирования и анализ проходящих через пору молекул [2]. Крайне перспективным подходом к применению твердотельных нанопор является поиск и апробация новых методов анализа биологических соединений, в особен-

ности широкого класса белковых молекул. Реализуя возможность проводить безметочное детектирование и анализ молекул аналита, находящихся в близких к естественным условиям, твердотельные нанопоры могут стать продвинутой инструментами для исследования динамики функциональной и конформационной активности белковых соединений в реальном времени.

Данная работа посвящена развитию метода фиксации одиночных белковых молекул в области поры под действием приложенного электрического поля. Фиксация белка в поре в течение длительного времени открывает возможности по исследованию динамики изменений его свойств при взаимодействии с другими молекулами в реальном времени.

Твердотельный нанопоровый сенсор представляет собой одиночное отверстие диаметром 8–10 нм, сформированное в свободноподвешенной SiN_x мембране толщиной ~30 нм. Стоит отметить, что SiN_x мембрана, а значит и стенки нанопоры, обладает отрицательным поверхностным зарядом, что приводит к образованию двойных электрических слоев (ДЭС) в растворе электролита. Электрохимические измерения проводились с использованием измерительной ячейки, представляющей собой *cis*- и *trans*-объемы электролита, разделенные SiN_x мембраной. Объемы ячейки включают в себя измерительные Ag/AgCl электроды и капилляры для ввода и отвода электролита. В качестве электролита использовалась смесь (1:1) водных растворов 0,1M KCl и 0,01M PBS (pH ~7,4). В качестве аналита были выбраны молекулы 20S протеасомы, представляющие собой крупные белковые соединения с молекулярной массой ~700 кДа, длиной 15 нм и диаметром 11,5 нм, а также обладающие отрицательным электрическим зарядом. В клетках живых организмов протеасомы выполняют функции протеолиза малых белковых соединений. 20S протеасомы были предварительно смешаны с гептамерными регуляторными частицами PA28, связывающимися с α -кольцом протеасомы и способствующими эффективному протеолизу малых белковых молекул за счет открытия прохода в протеолитическую полость. В качестве малых белков использовались молекулы основного белка миелина (MBP) с массой ~18,5 кДа и положительным электрическим зарядом.

На первом этапе эксперимента были проведены потенциостатические измерения нанопорового ионного тока в чистом растворе электролита. Примеры потенциостатических кривых при прямой (+300 мВ) и обратной (–300 мВ) полярностях напряжения показаны на участке № 1 рис. 1. В условиях чистого электролита уровень нанопорового тока демонстрирует хорошую стабильность на уровне 1,18 нА и –1,58 нА для прямой и обратной полярности соответственно. При добавлении в *cis*-объем электролита комплексных соединений, состоящих из 20S протеасом и PA28 регуляторных частиц, потенциостатические кривые демонстрируют существенное снижение уровня тока при обеих полярностях напряжения, см. участок № 2 рис. 1. Снижение уровня тока сигнализирует о фиксации комплексной молекулы в области поры посредством как электроосмотического потока (обратная полярность) так и сил электрофореза (прямая полярность). При добавлении в *cis*-объем ячейки молекул MBP, см. участок № 3 рис. 1, при прямой полярности напряжения уровень тока начинает возвращаться к уровню чистого буферного раствора,

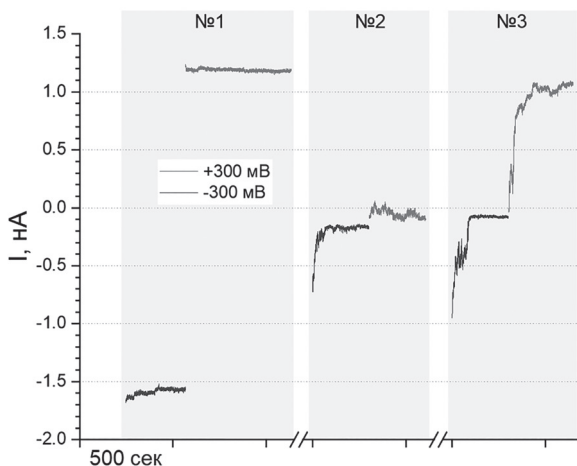


Рис. 1. Примеры потенциостатических кривых, демонстрирующих динамику ионного тока в случаях чистого раствора электролита — участок № 1; после добавления комплексных молекул 20S+PA28 — участок № 2; после добавления молекул MBP — участок № 3

что может говорить об удалении комплексной молекулы из области поры. При обратной полярности напряжения события фиксации продолжают наблюдаться. Разблокировка поры при прямой полярности может объясняться связыванием молекул МВР с гептамером PA28 комплексной молекулы. Связывание положительно заряженных МВР с отрицательно заряженным комплексом будет смещать суммарный заряд образованной молекулы в нейтральную область, тем самым ослабляя силу электрофореза. При ослаблении сил электрофореза, комплексная молекула (20S+PA28+МВР) будет выталкиваться из поры электроосмотическим потоком.

Таким образом, реализованный в работе подход позволяет в реальном времени регистрировать динамику комплексообразования одиночных молекул, зафиксированных в области твердотельной нанопоры.

Литература

1. Yuan, Zhishan, et al. Solid-state nanopore // Nanoscale research letters, 2018. Vol 13, № 1. P. 56.
2. Luo Y. et al. Application of solid-state nanopore in protein detection // International journal of molecular sciences, 2020. Vol. 21, № 8. P. 2808.

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗАТОРА «НАНОФОР 05» ДЛЯ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ГЕНОМНЫХ БИБЛИОТЕК НА ПРИМЕРЕ ОБРАЗЦОВ, ПРИГОТОВЛЕННЫХ НАБОРАМИ SYNTERA 2 ДНК И NEB

**Ю. А. Монахова^{1,3,*}, Я. И. Алексеев^{1,2}, А. И. Петров², Э. В. Адельшина²,
Д. А. Квон¹, М. В. Михайлычева¹**

*** ymonaxova@mail.ru**

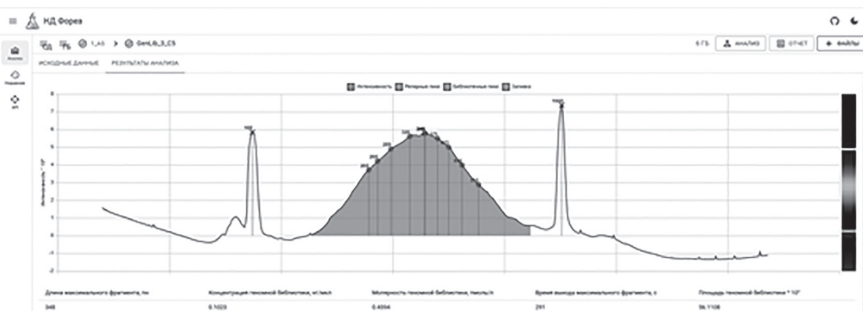
¹ НПФ Синтол, 127434, Москва, ул. Тимирязевская, 42, корп. Б

² Институт аналитического приборостроения РАН, 198095,
Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А

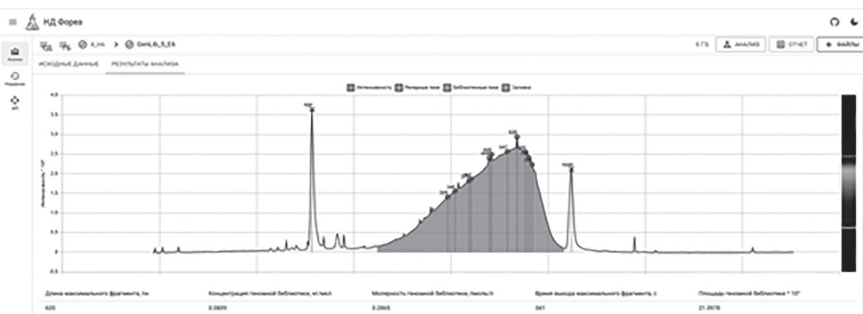
³ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
биотехнологии, 127550, Москва, ул. Тимирязевская, 42

Современная биология немыслима без высокопроизводительного секвенирования ДНК, прочно вошедшего в практику персонализированной медицины, эволюционных исследований и микробиологии. Однако путь от молекулы ДНК к расшифрованному геному представляет собой сложный процесс, где каждый этап критически важен для получения корректного результата исследования. Работа генетического анализатора для МПС была бы невозможна без тщательной подготовки образца, которая включает в себя: расщепление геномной ДНК для получения фрагментов заданного размера, тагментацию для мультиплексирования и последующей идентификации прочтений, а также обязательный контроль качества библиотек перед запуском в секвенатор.

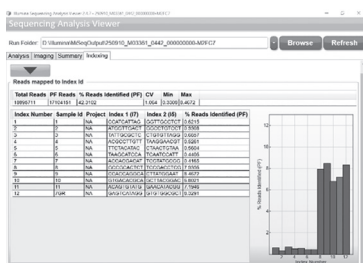
Геномная библиотека из образца ДНК *E.coli* — вида грамотрицательных палочковидных бактерий была подготовлена набором «SyntEra 2 ДНК» (ООО «НПФ Синтол», Россия) методом тагментации (рис. 1-1 «С5»). Геномная библиотека из образца ДНК *Saccharomyces cerevisiae* — одноклеточного гриба из класса сахаромикетов была подготовлена набором «NebNext Ultra 2» (NEB, Великобритания) с предварительной ультразвуковой фрагментацией геномной ДНК (рис. 1-2 «Е6»).



1



2



3

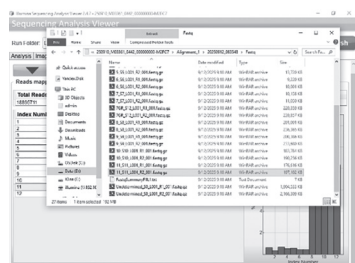


Рис. 1. Электрофореграммы двух геномных библиотек и параметры загрузки пула библиотек в секвенатор (3), 1 — геномная библиотека «С5» приготовлена набором «SyntEra 2 ДНК» максимум распределения 348 п. н., 2 — геномная библиотека «Е6» приготовлена набором «NebNext Ultra2» максимум распределения 620 п. н. Анализ в неденатурирующих условиях на генетическом анализаторе «Нанофор 05»

Оценка качества библиотек проведена с помощью капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе «Нанофор 05» [1, 2] в неденатурирующих условиях на линейке капилляров длиной 25 см до оптического окна и в полимере ПДМА 1.5.

Анализ проведен при помощи программного обеспечения «ДНК НД» (ИАП РАН, Россия), позволяющего с высокой точностью оценить распределение длин фрагментов ДНК и их концентрацию по калибровочной кривой стандарта длин.

Проведение последующего секвенирования геномных библиотек осуществлено на платформе MiSeq (Illumina, США). Использован набор реагентов MiSeq Reagent kit v2 500 cycles с концентрацией пула библиотек 12 пМ. Показана эффективность ПО «ДНК НД» для оценки длин фрагментов библиотек. Пулирование произведено корректно, что видно по равномерности загрузки в секвенатор библиотек из разных групп образцов (рис. 1-3).

Суммарный выход по образцам S11 и D1 после полногеномного секвенирования составил 1,2 и 1,7 млн парных прочтений в режиме PE250 и PE300, что соответствует расчетному покрытию 130X и 84X в случае геномов бактерии кишечной палочки *Escherichia coli* 4,6 млн п. н. (NCBI RefSeq GCF_000005845.2) и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* 12,1 млн п. н. (NCBI RefSeq GCF_000146045.2). Среднее качество первых 200 позиций в прямом и обратном прочтениях обоих образцов составляет выше Q30. Контроль качества данных секвенирования проводился с помощью FastQC (v0.12.1) и MultiQC (v1.30). Сборка проведена с помощью конвейера Unicycler (v0.5.1). Выравнивание исходных прочтений обоих образцов было выполнено через bwa mem (v0.7.18), сбор статистик — samtools stats и samtools coverage (v1.21).

Литература

1. Генетический анализатор Нанофор 05 в качестве средства измерений при секвенировании ДНК / Волков А. А., Волков И. А., Плугов А. Г., Кулябина Е. В., Мелкова О. Н., Лавров Г. С., Бочарова Д. В., Алексеев Я. И. Измерительная техника. 2021. № 1. С. 60–65. <https://doi.org/10.32446/0368-1025it.2021-1-60-65>.

2. Проблемы, возникающие при контроле качества геномных библиотек с использованием метода капиллярного электрофореза на приборе Нанофор 05. Вашенко К. Д., Адельшина Э.В. Биология — наука XXI века. Сборник тезисов 27-й Пушкинской школы-конференции молодых ученых с международным участием. Пушкино, 2024

РАЗРАБОТКА ОПТИЧЕСКИ ПРОЗРАЧНОГО ТЕРМОЦИКЛЕРА ДЛЯ МИКРОФЛЮИДНЫХ ЧИПОВ

Н. П. Жуков, Р. Р. Морозов, В. А. Круглов, Д.А. Белов*

* belov.da@list.ru

*Институт аналитического приборостроения РАН, 198095,
Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А*

Использование микрофлюидных чипов (МФЧ) в современных методах генетического анализа позволяет уменьшить расход используемых материалов и реактивов, размер оборудования, а также ускорить процесс анализа [1]. Одним из факторов, определяющих качество проводимого исследования с использованием МФЧ, является точный контроль температуры во время проведения исследования. Высокая погрешность измерения температуры и неравномерность температурного поля могут привести к снижению эффективности проводимых реакций и некорректным результатам [2]. В литературе [3–5] описан ряд методов обеспечения температурных режимов в планарном МФЧ, но они в разной степени не обладают необходимыми параметрами, такими как оптическая прозрачность, возможность нагрева до температур выше 70 °С, а также возможность длительного нагрева. Одним из подходов к созданию необходимого метода является использование оптически прозрачных элементов с нанесением на них покрытия из оксида индия-олова (ИТО).

При подаче тока на поверхность пластины с покрытием ИТО выполняется ее нагрев с одной стороны, при этом обеспечивается оптический доступ к МФЧ и возможность длительного нагрева до температур свыше 70 °С.

Для проведения генетических исследований, таких как полимеразная цепная реакция или плавление ДНК, требуется обеспечить возможность изменения температуры реактивов внутри МФЧ в диапазоне от 40 до 95 °С, с точностью поддержания температуры не менее 1 °С.

Экспериментальное исследование предложенного термоциклера на основе ИТО-покрытия проводилось с использованием стеклянной пластины размером 50×50 мм и толщиной 1 мм, с нанесенным покрытием ИТО. К пластине крепился МФЧ из полидиметилсилоксана 50×33 мм и толщиной 4 мм. В качестве контрольно-измерительного прибора использовались тепловизионная камера и два датчика температуры ТМР117. Использование нескольких датчиков температуры позволяет усреднять полученные данные, а также контролировать распределение теплового поля на поверхности нагревателя. Для обеспечения контакта между управляющей платой и стеклянной пластиной с нанесенным покрытием из ИТО были прикреплены медные контактные площадки. Сопротивление между контактными площадками составило 8 Ом.

Для контроля силы тока, проходящего через нагреватель, использовался ПИД-регулятор. Значения задаваемого тока зависели от усредненных данных с двух датчиков температуры. Ток задавался посредством управления затворами транзисторов в полумостовой схеме, а значения тока контролировались с использованием датчиков тока.

На рис. 1, а, представлен график изменения температуры поверхности нагревательного элемента и МФЧ при нагреве его до 50 °С. Видно, что нагрев МФЧ от 32 до 50 °С занимает от 140 до 150 секунд. На рис. 1, б, изображены максимальные и минимальные значения температур, зафиксированные при перемещении датчиков по площади соприкосновения нагревателя и МФЧ.

При работе ПИД-регулятора температура меняется с определенным отклонением, зависящим от коэффициентов регулирования.

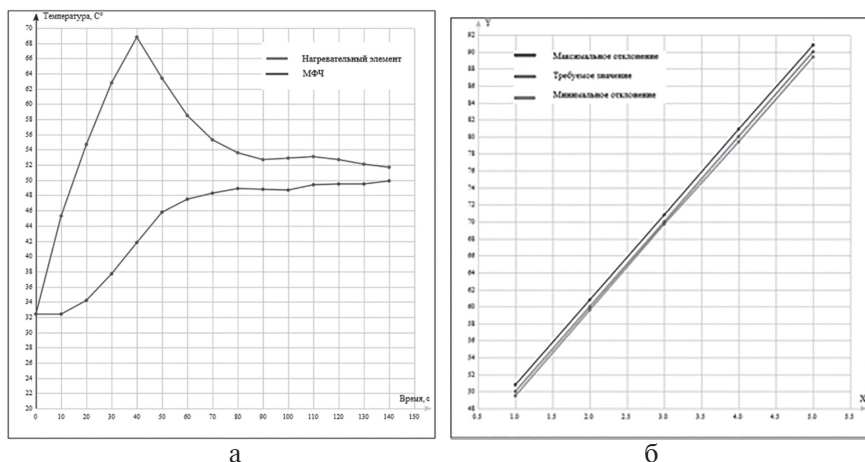


Рис. 1. Температурные данные: а) сравнение температуры нагревательного элемента и МФЧ, б) максимальное и минимальное значения температур рабочей поверхности нагревателя на разных измерительных полках

Максимальное отклонение температуры составило 0,8 °С. Значение температур на разных измерительных полках представлены в табл. 1.

Таблица 1. Значения температуры на разных измерительных полках

Номер измерения	1	2	3	4	5
Максимальная температура	50,7	60,8	70,8	80,8	90,8
Требуемое значение температуры	50	60	70	80	90
Отклонение температуры ниже нормы	49,7	59,6	69,7	79,8	89,8

Использование оптически прозрачного ИТО-нагревателя по параметрам нагрева уступает коммерчески доступным устройствам, однако позволяет проводить термоциклирование МФЧ с обеспечением оптического доступа с обеих сторон. Актуальным являются дальнейшие исследования, направленные на увеличение мощности термоциклера и уменьшение неравномерности температурного поля МФЧ.

Благодарности

Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-00761-25-00 Министерства науки и высшего образования РФ.

Литература

1. Tony, A., Badea, I., Yang, C., Liu, Y., Wells, G., Wang, K., Yin, R., Zhang, H., & Zhang, W. The Additive Manufacturing Approach to Polydimethylsiloxane (PDMS) Microfluidic Devices: Review and Future Directions // *Polymers*. 2023. Vol. 15. № 8. P. 1926. <https://doi.org/10.3390/polym15081926>
2. Dos-Reis-Delgado, A. A., Carmona-Dominguez, A., Sosa-Avalos, G., Jimenez-Saaib, I. H., Villegas-Cantu, K. E., & Gallo-Villanueva, R. C. Recent advances and challenges in temperature monitoring and control in microfluidic devices // *Electrophoresis*. 2023. Vol. 44. P. 268–297. <https://doi.org/10.1002/elps.202200162>
3. Miralles, V., Huerre, A., Malloggi, F., & Jullien, M.-C. A Review of Heating and Temperature Control in Microfluidic Systems: Techniques and Applications // *Diagnostics*. 2013. Vol. 3. № 1. P. 33–67. <https://doi.org/10.3390/diagnostics3010033>.
4. Guijt, R. M., Dodge, A., van Dedem, G. W. K., de Rooij, N. F., & Verpoorte, E. Chemical and physical processes for integrated temperature control in microfluidic devices // *Lab on a Chip*. 2003. Vol. 3. № 1. P. 1–4. <https://doi.org/10.1039/b210629a>
5. Kim, H., Gilmore, C. M., Piqu, A., Horwitz, J. S., Mattoussi, H., Murata, H., Kafafi, Z. H., & Chrisey, D. B. Electrical, optical, and structural properties of indium-tin-oxide thin films for organic light-emitting devices // *Journal of Applied Physics*. 1999. Vol. 86. № 11. P. 6451–6461. <https://doi.org/10.1063/1.371708>

СРАВНЕНИЕ АЛГОРИТМОВ ОБРАБОТКИ ГРАФИКОВ ПЛАВЛЕНИЯ ДНК

Р. Р. Морозов, Д. А. Белов*

* belov.da@list.ru

*Институт аналитического приборостроения РАН, 198095,
Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А*

Анализ ДНК методом плавления высокого разрешения активно используется, поскольку позволяет быстро, эффективно и экономично определять характеристики нуклеиновых кислот для профилирования последовательностей ДНК [1], сканирования мутаций [2] и других целей [3, 4]. Существуют различные алгоритмы обработки графиков плавления ДНК, состоящие как минимум из двух этапов: (i) фильтрации сигнала и (ii) определения и удаления базовой линии — неинформативного фонового сигнала, накладывающегося на график плавления ДНК. Существует два распространенных алгоритма ее удаления.

1. Метод базовой линии. Этот метод нормализует график плавления в зависимости от углов наклона его ветвей и использовался в сочетании с термодинамическими исследованиями денатурации ДНК и РНК с использованием ультрафиолетового поглощения [5], а также определения генетического разнообразия [6].

В первую очередь определяются температуры начала и конца плавления ДНК T_1 и T_2 , где T_1 определяется как максимальное значение температуры, при котором плавление еще не началось, а T_2 как минимальное значение температуры, при котором плавление уже закончилось.

Далее участки графика плавления до и после T_1 и T_2 линейно аппроксимируются. Полученные отрезки L_0 и L_1 экстраполируются на весь температурный интервал. Они называются нижней и верхней базовыми линиями. После этого сигнал обрабатывается по формуле (1):

$$M(T) = \frac{(F(T) - L_0(T))}{(L_1(T) - L_0(T))}, \quad (1)$$

где: M — интенсивность флуоресценции сигнала плавления ДНК, — суммарная интенсивность флуоресценции сигнала плавления и базовой линии, — значения нижней базовой линии, — значения верхней базовой линии. Экспериментальный график плавления представлен на рис. 1, а, результат обработки сигнала плавления по методу базовой линии представлен на рис. 1, б.

2. Метод удаления экспоненциального фона [7]. Суть метода — подбор такой экспоненциальной функции, вычитание которой из графика плавления приведет к тому, что значения производной в точках T_1 и T_2 станут равны нулю. Соответственно, первым этапом этого алгоритма также является определение этих точек.

Последующие преобразования описываются формулами (2)–(5): $B(T)$ — экспоненциальная функция, B_0 — постоянный сдвиг, C и a — коэффициенты экспоненциальной функции. В некоторых случаях расчет экспоненциальной функции может производиться по линейно аппроксимированным участкам из метода базовой линии [8]. Результат обработки сигнала плавления по методу удаления экспоненциального фона представлен на рис. 1, в.

$$F(T) = M(T) + B(T) \quad (2)$$

$$B(T) = B_0 + C * e^{a * (T - T_1)} \quad (3)$$

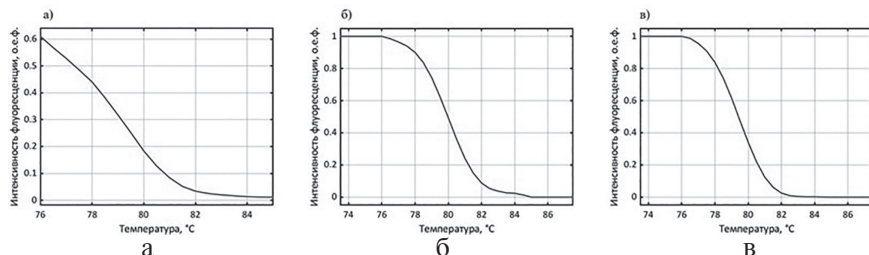


Рис. 1. а) Экспериментальный график плавления, б) график плавления, обработанный по методу базовой линии, в) график плавления, обработанный по методу удаления экспоненциального фона

$$a = \frac{\ln \frac{dF}{dT}(T_2) - \ln \frac{dF}{dT}(T_1)}{T_2 - T_1} \quad (4)$$

$$C = \frac{\frac{dF}{dT}(T_1)}{a} \quad (5)$$

Ключевым фактором, ограничивающим возможности метода базовой линии, является наклон линейных участков графика плавления. У экспериментальных сигналов плавления они не параллельны, и прямые, построенные по этим участкам, пересекаются при определенной температуре. В точке их пересечения обработанный сигнал плавления из-за деления на ноль не существует, а в области вокруг их пересечения получаются некорректные значения. Метод удаления экспоненциального фона не имеет таких ограничений использования, как метод базовой линии, при этом в большей степени меняет форму графика плавления при обработке.

Таким образом, более предпочтительным ввиду своей универсальности является метод удаления экспоненциального фона.

Общим в обоих методах является необходимость определения температур начала и конца плавления ДНК T_1 и T_2 . Единого алгоритма определения этих температур на текущий момент не существует. С этой целью применяются различные варианты пороговых изменений, построения касательных и статистические методы. Более точным вариантом является построение касательных к первой производной сигнала плавления. Для преодоления ограничений описанных методов целесообразно в будущем использовать полную или частичную аппроксимацию сигнала плавления.

Благодарности

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 24-25-00492.

Литература

1. Kim N., Kwon J.S., Kang W.H., Yeom S.I. High-Resolution Melting (HRM) Genotyping. *Methods Mol Biol*, 2023. № 2638. P. 337–349.
2. Wu SB., Franks T.K., Hunt P., Wirthensohn M. G., Gibson J.P., Sedgley M. Discrimination of SNP genotypes associated with complex haplotypes by high resolution melting analysis in almond: implications for improved marker efficiencies. *Mol Breeding*, 2009. №25. P. 351–357.
3. Wittwer C.T., Hemmert A.C., Kent J.O., Rejali N.A. DNA melting analysis. *Mol Aspects Med*, 2024. № 97. P. 1–14.
4. Likhachev I.V., Shigaev A.S., Lakhno V.D. On the thermodynamics of DNA double strand in the Peyrard-Bishop-Dauxois model. *Physics Letters A*, 2024. №510
5. SantaLucia, J., Jr. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998. № 95(4). P. 1460–1465.
6. Hussein, E.M., Al-Mohammed, H.I., Hussein, A.M. Genetic diversity of *Dientamoeba fragilis* isolates of irritable bowel syndrome patients by high-resolution melting-curve (HRM) analysis. *Parasitol Res*, 2009. 105, P. 1053–1060.
7. Palais R., Wittwer C.T. Chapter 13 Mathematical Algorithms for High-Resolution DNA Melting Analysis. 1st ed. *Methods Enzymol*, 2009. № 454. P. 323–343.
8. Montgomery J., Wittwer C.T., Palais R., Zhou L. Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis. *Nature Protocols*, 2007. № 2. P. 59–66.

РАЗРАБОТКА БИОСЕНСОРНОЙ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ НАНОСТЕРЖНЕЙ ОКСИДА ЦИНКА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ЛАКТОФЕРРИНА

А. С. Принцева^{1,*}, А. А. Рябко², А. А. Колобов³, Н. О. Ситков¹

* alya.printseva@inbox.ru

¹ Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В. И. Ульянова (Ленина), 197376, Санкт-Петербург, Инструментальная, 2

² ФТИ им. А. Ф. Иоффе, 194021, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 26

³ Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека (ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России), 195279, Санкт-Петербург, ул. Руставели, 3

Лактоферрин — мультифункциональный белок, участвующий в регуляции иммунного ответа, защите слизистых оболочек и антибактериальной активности [1]. Повышение его концентрации в биологических жидкостях служит индикатором воспалительных и инфекционных процессов, включая заболевания дыхательных путей, мочеполовой системы и кишечника. В связи с этим актуальна разработка простых, чувствительных и быстрых инструментов для детектирования лактоферрина в клинически значимых диапазонах концентраций.

В работе представлена импедиметрическая биосенсорная система, основанная на наноструктурированных покрытиях из оксида цинка (ZnO) и пептидных распознающих элементах. Использование наностержней ZnO обусловлено их высокой электропроводностью, развитой поверхностью и химической стабильностью, что делает этот материал перспективным для электрохимических сенсоров [2].

Затравочный слой ZnO наносили методом ультразвукового спрей-пиролиза при температуре 380 °С на подложки с гребенчатыми электродами из никрома, после чего проводили низкотемпературный гидротермальный рост наностержней при 85 °С в водном растворе нитрата цинка и гексаметиленetetрамина [3]. Такая

технология обеспечивает контролируемую морфологию и однородность покрытия. Для последующей функционализации поверхности применяли силанизацию 3-аминопропилтриметоксисилоном (APTMS), формируя аминогруппы для ковалентного связывания биолигандов. Затем вводили кросслинкер MBS (m-maleimidobenzoyle-N-hydroxysuccinimide ester), обеспечивающий стабильное связывание пептидов через реакцию maleимидной группы с тиольными остатками. В качестве распознающего элемента использовали пептид LETI-13, комплементарный активным участкам лактоферрина.

Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия (РФЭС) подтвердила эффективность функционализации: после силанизации наблюдалось снижение интенсивности пиков Zn 2p, указывающее на образование поверхностного слоя, а появление пика N 1s свидетельствовало о присутствии аминогрупп. После конъюгации пептидов наблюдалось увеличение интенсивности соответствующих сигналов, что подтверждает успешное связывание биомолекул.

Измерения проводились с использованием потенциостата-гальваностата PS-50 с модулем FRA в диапазоне частот 1 Гц — 0,5 МГц при амплитуде переменного сигнала 10 мВ. После инкубации сенсоров с растворами лактоферрина в буфере PBS (20–2000 нг/мл) в течение

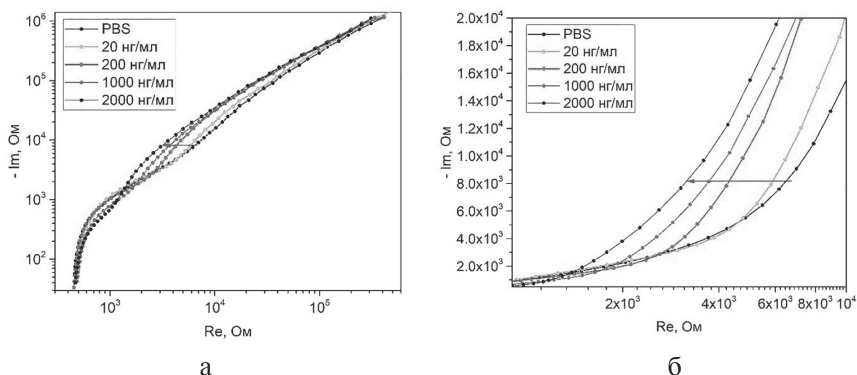


Рис. 1. Диаграмма Найквиста для биосенсора лактоферрина при вариации концентрации биоамаркера в растворе от 2 до 2000 нг/мл: а) в двойном логарифмическом масштабе; б) в логарифмическом масштабе

20 минут фиксировались диаграммы Найквиста. Увеличение радиуса полуокружности свидетельствовало о росте сопротивления переноса заряда (R_{ct}) при увеличении концентрации белка.

Таким образом, разработанный наноструктурированный биосенсор на основе ZnO-пептидных конъюгатов сочетает в себе простоту изготовления, химическую стабильность, высокую чувствительность и селективность. Использование импедиметрического метода регистрации позволяет проводить анализ без меток, обеспечивая компактность, низкую себестоимость и возможность интеграции сенсора в микрофлюидные диагностические системы для экспресс-оценки воспалительных состояний и инфекций.

Литература

1. Ахмед К. А. и др. Лактоферрин: потенциальные функции, фармакологические аспекты и терапевтические перспективы / К. А. Ахмед [и др.] // J Adv Biotechnol Exp Ther. 2021. Т. 4, № 2. С. 223.
2. Ситков Н. О. и др. Импедансный биосенсор с покрытием из наностержней оксида цинка, синтезированных модификацией гидротермального метода, для детекции антител / Н. О. Ситков [и др.] // Chemosensors. 2023. Т. 11, № 1. С. 66.
3. Рябко А. А. и др. Двухстадийный синтез структурированных микросистем на основе наностержней оксида цинка методом ультразвукового спрей-пиролиза и низкотемпературного гидротермального метода / А. А. Рябко [и др.] // Письма в Журнал технической физики. 2020. Т. 46, № 16. С. 25–28.

ИЗГОТОВЛЕНИЕ ГИБКОЙ ИМПЛАНТИРУЕМОЙ ЭЛЕКТРОНИКИ МЕТОДАМИ ЛАЗЕРНОЙ АБЛЯЦИИ

Т. Д. Катунов*, Е. И. Малышев, А. А. Воробьев

* timurkatunov@gmail.com

*СПбАУ РАН им. Ж. И. Алферова, 194021, Санкт-Петербург, ул. Хлопина, 8/3,
лит. А*

Развитие микро- и оптоэлектроники, в частности технологий обработки проводящих слоев методом лазерной абляции, позволяет достичь разрешения, сопоставимого с классической фотолитографией, что особенно актуально в задачах изготовления проводящих слоев на рельефных полимерных подложках [1].

В данной работе представлены результаты оптимизации технологии изготовления гибких электродных матриц на основе полидиметилсилоксана (PDMS) с применением методов лазерной абляции тонкопленочных металлических слоев. Использование оптоволоконного Nd:YAG лазера с наносекундными импульсами в сочетании с гальванометрическими зеркалами позволяет достичь разрешения гравировки порядка 10 мкм и скорости обработки порядка 10 см²/час, что, с учетом возможности адаптировать дизайн перед каждой обработкой, а также значительно меньшей стоимости оборудования, делает эту технологию наиболее предпочтительной для изготовления мелкосерийных или индивидуальных устройств для электрокортикографии [2], биоэлектронных интерфейсов и компонентов оптоэлектроники.

В результате оптимизации параметров лазерной абляции (мощности, частоты, длительности импульсов и скорости перемещения лазерного пятна) были подобраны режимы, обеспечивающие отсутствие гарта и деламинации подложек.

Электромеханические испытания подтвердили надежность и высокую производительность предложенного метода: все изготовленные тестовые образцы мультиэлектродных матриц имеют стабильность при циклических растяжениях до 10 % длины и потере

проводимости не более 5 %, а время обработки одного функционального прототипа составляет всего 30 минут.

Таким образом, разработанная технология применима для создания систем нейроинтерфейсов и гибкой оптоэлектроники.

Литература

1. Shim, S et al., A Simply Fabricated Neural Probe by Laser Machining of a Thermally Laminated Gold Thin Film on a Transparent Cyclic Olefin Polymer. ACS Omega, 4(2), 2590–2595. doi: 10.1021/acsomega.8b03682
2. Tybrandt K., Khodagholy D. et al., High-Density Stretchable Electrode Grids for Chronic Neural Recording. Adv Mater. 2018 Apr. Doi: 10.1002/adma.201706520

ПЛАТФОРМЕННОЕ РЕШЕНИЕ ДЛЯ IVD: ПРИБОРЫ И ПО

А. В. Телегина^{1,*}, А. Р. Агишева¹, И. В. Максин^{1,2}, Е. А. Мучкина¹

* atelegina@drdbiotech.ru

¹ ООО «РАПИД БИО», 121205, Москва, Большой Бульвар, 42, стр. 1

² МИРЭА — Российский технологический университет (Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова), 119454, Москва, пр. Вернадского, 78

Иммунохроматографические тесты (ИХА) за последние годы эволюционировали от простых экспресс-систем до полноценного клиничко-лабораторного инструмента благодаря платформенным решениям — анализаторам, обеспечивающим точное считывание, обработку и цифровую передачу результатов, что напрямую влияет на скорость и достоверность клинических решений. Сегодня ИХА-анализаторы применяются от инфекционной и гормональной

диагностики до кардио-, онко- и метаболических маркеров и условно делятся на две группы: настольные лабораторные системы и компактные РОСТ-решения для использования у постели пациента, позволяющие получать клинически значимый результат за считанные минуты без направления образца в центральную лабораторию. Технологически они используют оптическую, флуоресцентную и хемилюминесцентную детекцию с цифровой обработкой изображений, включая алгоритмы ИИ, что повышает чувствительность, снижает ошибки и обеспечивает количественную оценку показателей, критически важную для экстренных клинических сценариев (например, определение кардиомаркеров и маркеров воспаления) [1].

Большое внимание уделяется интеграции приборов с медицинскими информационными системами. Почти все современные решения поддерживают подключение к ЛИС/МИС через интерфейсы USB, Ethernet или Bluetooth и передачу данных в формате HL7, что обеспечивает непрерывный цифровой поток информации — от момента взятия биоматериала до внесения результата в электронную медицинскую карту пациента [2]. Многие производители, такие как LumiraDx, Roche, DIALUNOX и MediUL, предлагают облачные сервисы, которые позволяют хранить результаты, формировать отчеты и проводить анализ данных в реальном времени. Такие системы не только автоматизируют документооборот, но и дают возможность удаленного контроля качества и централизованного управления оборудованием.

Отдельного внимания заслуживают мобильные платформы, основанные на использовании смартфонов. Разработки NutriPhone, FeverPhone, GNSPLEX и аналогичные решения превращают камеру телефона в миниатюрный анализатор, способный проводить количественные измерения без дополнительного оборудования. Полученные результаты могут быть мгновенно переданы по электронной почте, через мессенджеры или напрямую в облако [3]. Подобные технологии особенно актуальны для телемедицины и регионов с ограниченным доступом к лабораторным ресурсам, где ценятся простота, мобильность и доступность диагностики.

Современные тенденции в развитии ИХА-анализаторов сводятся к четырем направлениям: переходу от качественного к количественному анализу для повышения клинической информативности; росту мультиплексности, позволяющей определять несколько маркеров из одной пробы и тем самым ускорять и уточнять диагностику; активной цифровизации и интеграции, создающей единый контур данных с удаленным мониторингом, аналитикой и автоматическим контролем качества; а также минимизации человеческого фактора, когда приборы автоматически определяют тип теста, сканируют, анализируют изображение и формируют заключение без участия оператора. Будущее ИХА-анализаторов — за компактными, интеллектуальными и взаимосвязанными решениями, объединяющими точность лабораторных методов, удобств и инструменты цифровой интеграции, формируя единую диагностическую экосистему, где прибор, ПО и аналитика работают как единое целое.

Литература

1. Park J. Lateral Flow Immunoassay Reader Technologies for Quantitative Point-of-Care Testing. *Sensors* (Basel). 2022 Sep 28;22(19):7398. doi: 10.3390/s22197398. PMID: 36236497; PMCID: PMC9571991.
2. Всемирная организация здравоохранения. Target Product Profile for Readers of Rapid Diagnostic Tests [Электронный ресурс]. Женева: WHO, 2023. URL: <https://www.who.int/tools/target-product-profile-database/item/tpp--for-readers-of-rapid-diagnostic-tests>
3. Mudanyali O, Dimitrov S, Sikora U, Padmanabhan S, Navruz I, Ozcan A. Integrated rapid-diagnostic-test reader platform on a cellphone. *Lab Chip*. 2012 Aug 7;12(15):2678–86. doi: 10.1039/c2lc40235a. Epub 2012 May 17. PMID: 22596243; PMCID: PMC3390446.

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ ЛАКТАТА С ПРИМЕНЕНИЕМ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ ПОКРЫТИЙ НА ОСНОВЕ ОКСИДА И ГИДРОКСИДА НИКЕЛЯ

А. В. Полидаускайте*, Н. О. Ситков, И. К. Хмельницкий

* moonorchard@yandex.ru

Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В. И. Ульянова (Ленина), 197376, Санкт-Петербург, Инструментальная, 2

Разработка экспресс-методов контроля уровня лактата в биологических жидкостях является важной задачей в клинической, спортивной медицине, а также при создании систем персонализированного здоровья [1]. Определенная перспектива наблюдается в создании и изучении неферментативных электрохимических сенсоров, которые лишены недостатков ферментативных аналогов, таких как высокая стоимость и низкая стабильность.

Для данных сенсоров высоким потенциалом обладают такие соединения, как оксид и гидроксид никеля (NiO и Ni(OH)_2). Окислительно-восстановительная пара $\text{Ni}^{2+}/\text{Ni}^{3+}$ позволяет добиться достаточно хорошей электрокаталитической активности, что в свою очередь подтверждает перспективность таких соединений для длительного, но при этом недорогого мониторинга [2].

Полученные покрытия наносились на три вида подложек (кремний, стекло, пластик), а затем исследовались с помощью растровой электронной микроскопии (РЭМ), соответствующие результаты представлены на рис. 1. Исследование морфологии подтвердило формирование развитой наноструктурированной поверхности, характеризующейся однородным распределением слоя. Для повышения чувствительности вводилась перфторированная катионообменная мембрана (Nafion): она обеспечивает подавление влияния ингибиторов, таких как аскорбиновая или мочевая кислота.

Мониторинг лактата с применением разработанных покрытий на основе оксида и гидроксида никеля может обеспечить достаточно

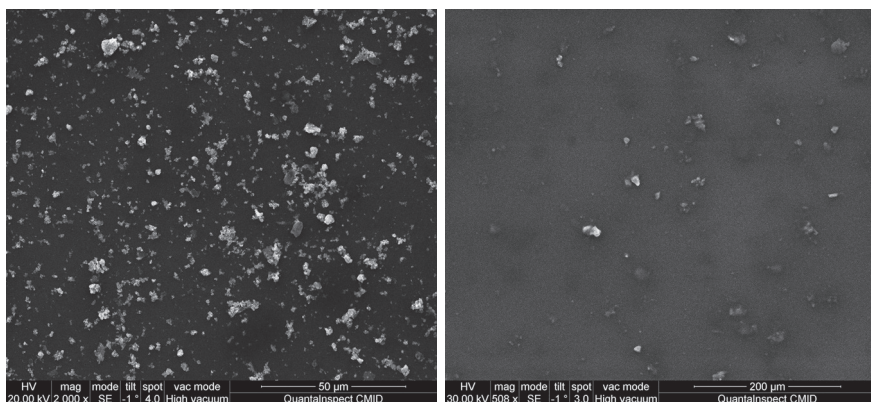


Рис. 1. Морфология наноструктурированных покрытий, полученных с использованием РЭМ: *а* — NiO (50 мкм); *б* — Ni(OH)₂ (200 мкм)

быструю оценку метаболического состояния организма, а это имеет большое значение при диагностике гипоксии, сепсиса, и оценке физических нагрузок.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 25-79-10055).

Литература

1. Messina L., Giardi M.T. Recent Status on Lactate Monitoring in Sweat Using Biosensors: Can This Approach Be an Alternative to Blood Detection? // Biosensors. 2025. Vol. 15, № 1. P. 3–6.
2. Kim S. et al. Non-enzymatic electrochemical lactate sensing by NiO and Ni(OH)₂ electrodes: A mechanistic investigation // Electrochimica Acta. 2018. Vol. 276, P. 240–246.



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ АНАЛИТИЧЕСКОГО ПРИБОРОСТРОЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

ИАП РАН – ведущая научно-исследовательская организация в области научного приборостроения, обладает уникальным опытом разработки новых методов и приборов по следующим основным направлениям:

- Методы и приборы диагностики поверхности, элементного и структурного анализа веществ и соединений.
- Методы и приборы нанотехнологии и нанодиагностики. Наноструктуры.
- Методы и приборы для исследований в науках о жизни и медицине. Микро- и наносистемная техника, нанобиотехнология.
- Информационные технологии, системы автоматизации, математическое моделирование в научном приборостроении.

Разработка и производство новых аналитических методов и приборов, среди них:

- Молекулярно-генетические анализаторы
 - Приборы для ПЦР в реальном времени
 - Масс-спектрометры
 - Лазерные анализаторы биологических объектов (в т.ч. клеток)
 - Носимые датчики здоровья
 - Зондовая и капиллярная микроскопия
 - Анаэроостаты
 - Приборы пробоподготовки и др.
-
- **Контрактная разработка приборов для медико-биологических исследований**
 - **Собственное мелкосерийное производство аналитических приборов**
 - **Импортозамещающее оборудование**

ИАП РАН Санкт-Петербург, 198095, ул. Ивана Черных, 31-33, лит. А.

Почтовый адрес: Санкт-Петербург, 198095, а/я 140

т. (812) 363-0720, ф. (812) 363-0719, e-mail: iap@ianin.spb.su, iap@iairas.ru, www.iairas.ru



ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗАТОР НАНОФОР® 05

УСТРОЙСТВО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДНК

Генетический анализатор **НАНОФОР®05** предназначен для автоматического определения последовательности ДНК и для проведения фрагментного анализа ДНК.

НАНОФОР®05 — это высокопроизводительный прибор, способный работать в автоматическом режиме 24 часа в сутки.

ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ

- Медицина
- Санитарно-эпидемиологический контроль
- Сельское хозяйство
- Криминалистика
- Биотехнология
- Фундаментальные исследования в области анализа нуклеиновых кислот



- Открытый
- 8-капиллярный • 7-цветный
- Комплектуется российскими реагентами

НАНОФОР СПС

АППАРАТНО-ПРОГРАММНЫЙ КОМПЛЕКС МАССОВОГО ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДНК

Аппаратно-программный комплекс предназначен для быстрой расшифровки полных последовательностей геномов патогенных микроорганизмов (бактерий и вирусов) методом массового параллельного секвенирования для их дальнейшей идентификации.

ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- Количество проточных ячеек: 1
- Максимальная длина прочтения фрагмента предварительно подготовленной к массовому параллельному секвенированию нуклеиновых кислот: не менее 7,5 млрд
- Максимальное количество генетической информации, получаемое за запуск АПК: не менее 2 x 250 пар нуклеотидов
- Максимальное время анализа от запуска АПК до получения данных о последовательностях исследуемых нуклеиновых кислот в цифровом виде: не более 40 часов
- Возможность парноконцевого прочтения исследуемых предварительно подготовленных к массовому параллельному секвенированию образцов нуклеиновых кислот



ИАП РАН Санкт-Петербург, 198095, ул. Ивана Черных, 31-33, лит. А.

Почтовый адрес: Санкт-Петербург, 198095, а/я 140

т. (812) 363-0720, ф. (812) 363-0719, e-mail: iap@ianin.spb.su, iap@iairas.ru, www.iairas.ru



Компания СИНТОЛ 127434, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42, корпус Б, офис 316

т. (495) 984-69-93 (многоканальный), (495) 506-79-97, ф. (495) 984-69-93, (499) 977-74-55

e-mail: syntol@syntol.ru, www.syntol.ru

АНАЛИЗАТОР НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ АНК-32 НА ОСНОВЕ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ



БЫСТРЫЙ

(40 циклов ПЦР — менее чем за 1 час)

МНОГОКАНАЛЬНЫЙ

(от 5 до 8 каналов детекции флуоресценции)

ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ

(чувствительность каждого канала — 1×10^{-10} М)

МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ

(ПЦР, плавление, измерение флуоресценции)

- возможность работы с 5-ю парами светофильтров, позволяющими детектировать все основные красители: FAM, R6G, HEX, JOE, TAMRA, ROX, Cy5, Cy5.5, а также SYBR Green I, Eva Green I;
- возможность использования до 8 пар светофильтров, возможность комбинаций фильтров возбуждения и эмиссии для детекции FRET;
- высокая чувствительность по всем каналам детекции обеспечивает высокую точность получаемых результатов и позволяет работать с очень малым количеством зонда (от 0,2 пкмоль на реакцию);
- приборы не требуют калибровки;
- возможность использования тест-систем и наборов реагентов различных производителей.

КОМПЛЕКС ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Комплекс КВНК предназначен для выделения нуклеиновых кислот из различных проб. Использование одноразовых картриджей позволяет ускорить, упростить и повысить безопасность работ с пробами опасных биологических объектов в стационарных и передвижных микробиологических и медицинских лабораториях при проведении генетических исследований

Комплекс КВНК представляет собой комплекс средств (прибор и одноразовые картриджи, заправленные реагентами), обеспечивающий высокоэффективное выделение нуклеиновых кислот в автоматическом режиме под управлением программ, хранящихся в ПЗУ комплекса (до 10 программ). Обеспечена возможность создания новых алгоритмов выделения НК за счет корректировки программ ПЗУ.



ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ

- аналитическая химия;
- биохимия;
- биотехнология;
- фармакология;
- медицина;
- экология.



ИАП РАН Санкт-Петербург, 198095, ул. Ивана Черных, 31-33, лит. А.

Почтовый адрес: Санкт-Петербург, 198095, а/я 140

т. (812) 363-0720, ф. (812) 363-0719, e-mail: iap@ianin.spb.su, iap@iairas.ru, www.iairas.ru

НАДЕЖНЫЕ И ДОСТУПНЫЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ ВСЕХ ЭТАПОВ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК

М-Сорб-Автомат

Набор для выделения
нуклеиновых кислот



Станция Colibri

Для автоматического выделения
нуклеиновых кислот

ОЦЕНКА КОНЦЕНТРАЦИИ ДНК



Флуориметр Qubix

Для измерения концентрации
ДНК, РНК и белков



Серия реагентов СинКвант

Для измерения концентрации
двущепочечной ДНК, РНК и белков



КЛАССИЧЕСКОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ

Нанофор 05

Капиллярный генетический
анализатор открытого типа



GenSeq

Набор реагентов для
секвенирования по Сэнгеру



SeqMAG

Магнитные частицы для
очистки реакционной смеси
после реакции Сэнгера



MetaGen-16sRNA

Набор для подготовки метагеномных библиотек для массового параллельного секвенирования



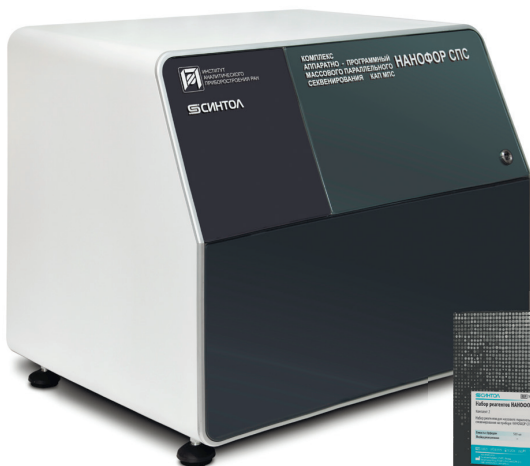
Серия реагентов SyntEra

Набор для подготовки геномных библиотек для массового параллельного секвенирования



Нанофор СПС

Генетический анализатор для массового параллельного секвенирования



SynMag

Магнитные частицы для очистки продуктов ПЦР и разделения ДНК по размерам

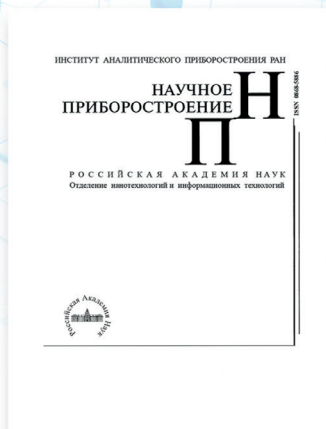


Комплект реагентов

Для массового параллельного секвенирования на приборе Нанофор СПС и MiSeq



ООО «НПФ Синтол»
Москва, Тимирязевская 42
+7(495)984-69-93 syntol@syntol.ru



БЕЛЫЙ
СПИСОК
ВАК
РИНЦ
RSCI

ЖУРНАЛ НАУЧНОЕ ПРИБОРОСТРОЕНИЕ

ежеквартальное издание освещает фундаментальные и прикладные проблемы современного научного приборостроения, в основном в естественнонаучных областях

статьи публикуются бесплатно

статьи проходят рецензирование и проверку на оригинальность

статьи доступны в полном объеме для всеобщего доступа сразу после публикации номера

статьи доступны на сайте ИАП, на платформах e-library, Киберленинка, ряда ЭБС (Университетская библиотека, Лань, Знаниум)



journal-np@yandex.ru

Научное издание

**Тезисы докладов
Четвертой ежегодной всероссийской молодежной
конференции по методам
и приборам для анализа биологических объектов
«АналитБиоПрибор-2025»**

Подготовка оригинал-макета *М. А. Ивановой*

Подписано в печать 24.11.2025. Формат 60×84/16. Печать цифровая.
Усл. печ. л. 13,14. Тираж 100. Заказ 286.

Выпущено Издательско-полиграфической ассоциацией
высших учебных заведений
194021, Санкт-Петербург, Политехническая ул., д. 28, лит. А,
пом. 3-Н ком. 191. Тел.: (812) 987-75-26
mediapapir@gmail.com www.mediapapir.com www.mediapapir.ru