eISSN 2957-5702

ҒЫЛЫМИ ЖУРНАЛ

БИОҚАУІПСІЗДІК ЖӘНЕ БИОТЕХНОЛОГИЯ

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

БИОБЕЗОПАСНОСТЬ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

THE SCIENTIFIC JOURNAL

BIOSAFETY AND BIOTECHNOLOGY

www.biosafety.kz

2025 • 23



eISSN 2957-5702

2020 ЖЫЛДАН ШЫҒА БАСТАҒАН • ИЗДАЕТСЯ С 2020 ГОДА • PUBLISHED SINCE 2020

2025 • 23

Редакция алқасы:

Закарья К.Д., б.ғ.д., профессор (бас редактор) (Қазақстан)
Абдураимов Е.О., в.ғ.д., профессор (бас редактордың орынбасары) (Қазақстан)
Faez Awad, PhD (Ливия)
Орынбаев М.Б., в.ғ.к., профессор, академик (Қазақстан)
Айтназаров Р.Б., PhD (Ресей)
Сұлтанқұлова К.Т., б.ғ.к., профессор (Қазақстан)
Кутумбетов Л.Б., в.ғ.д., профессор (Қазақстан)
Ершебулов З.Д., PhD (Қазақстан)
Еспембетов Б.А., в.ғ.к., профессор (Қазақстан)
Жүгүнісов Қ.Д., PhD (Қазақстан)
Нұрғазиев Р.З., в.ғ.д., профессор (Қырғызстан)
Булатов Е.А., б.ғ.к., профессор (Қазақстан)
Risatti G., PhD, профессор (АҚШ)
Қошеметов Ж.Қ., б.ғ.д., профессор (Қазақстан)
Қасенов М.М., в.ғ.к., профессор (Қазақстан)
Скиба Ю.А., б.ғ.к. (Қазақстан)
Жапаркулова К.А., PhD (Қазақстан)
Абеуов Х.Б., в.ғ.к., профессор (Қазақстан)
Gorge O., PhD (Франция)
Червякова О.В., б.ғ.к., профессор (Қазақстан)
Стукова М.А., PhD (Ресей)
Наханов А.Қ., б.ғ.к. профессор (Қазақстан)
Рсалиев А.С., PhD, профессор (Қазақстан)
Туруспеков Е.К., б.ғ.к., профессор (Қазақстан)
Абугалиева С.И., б.ғ.д., профессор (Қазақстан)
Гультяева Е.И., б.ғ.д., доцент (Ресей)

Құрылтайшы: «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» ЖШС

Қазақстан Республикасының Ақпарат және қоғамдық даму министрлігінің Ақпарат комитетінде 20.11.2019 ж. **№KZ33V00017380** куәлікпен тіркелген Мерзімділігі: жылына 4 рет.

Редакцияның мекен-жайы 080409, Жамбыл облысы, Қордай ауданы, Гвардейский қтк., Б. Момышұлы к-сі, 15. тел. (726-36) 7-22-28 *www: biosafety.kz*, E-mail: journal@biosafety.kz

© Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты, 2025

Редакционная коллегия:

Закарья К.Д., д.б.н., профессор (главный редактор) (Казахстан)
Абдураимов Е.О., д.в.н., профессор (заместитель главного редактора) (Казахстан)
Faez Awad, PhD (Ливия)
Орынбаев М.Б., к.в.н., профессор, академик (Казахстан)
Айтназаров Р.Б., PhD (Россия)
Султанкулова К.Т., к.б.н., профессор (Казахстан)
Кутумбетов Л.Б., д.в.н. профессор (Казахстан)
Ершебулов З.Д.,PhD (Казахстан)
Еспембетов Б.А., к.в.н., профессор (Казахстан)
Жугунисов К.Д., PhD (Казахстан)
Нургазиев Р.З., д.в.н., профессор (Кыргызстан)
Булатов Е.А., к.б.н**.,** профессор (Казахстан)
Risatti G., PhD, профессор (США)
Кошеметов Ж.К., д.б.н., профессор (Казахстан)
Касенов М.М., к.в.н., профессор (Казахстан)
Скиба Ю.А., к.б.н**.** (Казахстан)
Жапаркулова К.А., PhD (Казахстан)
Абеуов Х.Б., к.в.н., профессор (Казахстан)
Gorge O., PhD (Франция)
Червякова О.В., к.б.н., профессор Казахстан)
Стукова М.А., PhD (Россия)
Наханов А.К., к.б.н., профессор (Казахстан)
Рсалиев А.С., PhD, профессор (Казахстан)
Туруспеков Е.К., к.б.н., профессор (Казахстан)
Абугалиева С.И., д.б.н., профессор (Казахстан)
Гультяева Е.И., д.б.н., доцент (Россия)

Учредитель: ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»

Зарегистрирован в Комитете информации Министерства информации и общественного развития Республики Казахстан свидетельством **№KZ33V00017380** от 20.11.2019 г.
Периодичность: 4 раза в год.

Адрес редакции 080409, Жамбылская область, Кордайский район, пгт. Гвардейский, Ул. Б. Момышулы, 15. тел. (726-36) 7-22-28 *www: biosafety.kz*, E-mail: journal@biosafety.kz

© Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, 2025

Editorial board:

Zakarya K.D., D.B.Sci., Prof, (editor-in-chief) (Kazakhstan)
Abduraimov Ye.O., D.V.Sci., Prof (deputy chief editor) (Kazakhstan)
Faez Awad, PhD, (Libya)
Orynbayev M.B., PhD, Prof, Academician (Kazakhstan)
Aitnazarov R.B., PhD (Russia)
Sultankulova K.T., PhD, Prof (Kazakhstan)
Kutumbetov L.B., D.V.Sci., Prof (Kazakhstan)
Yershebulov Z.D., PhD (Kazakhstan
Yespembetov B.A., PhD , Prof (Kazakhstan)
Zhugunissov K.D., PhD (Kazakhstan)
Nurgaziev R.Z., D.V.Sci., Prof (Kyrgyzstan)
Bulatov Y. A., PhD, Prof (Kazakhstan)
Risatti G., PhD, Prof (USA)
Koshemetov Zh.K., D.B.Sci., Prof (Kazakhstan)
Kassenov M.M., PhD , Prof (Kazakhstan)
Skiba Y.A., PhD ,(Kazakhstan)
Zhaparkulova K.A., PhD ,(Kazakhstan)
Abeuov Kh.B., PhD , Prof (Kazakhstan)
Gorge O., PhD (France)
Chervyakova O.V., PhD, Prof (Kazakhstan)
Stukova M.A., PhD (Russia)
Nakhanov A.K., PhD, Prof (Kazakhstan)
Rsaliev A.S., PhD, Prof (Kazakhstan)
Turuspekov Ye.K., PhD, Prof (Kazakhstan)
Abugalieva S.I., D.B.Sci., Prof (Kazakhstan)
Gultyaeva E.I., D.B.Sci., As.Prof (Russia)

Founder: LLP «Research Institute for Biological Safety Problems» Registered with the Information Committee of the Ministry of Information and Public Development of the RK with the Certificate **№KZ33V00017380** dated 20.11.2019

Frequency: 4 times a year.

Address of the editorial office 080409, Zhambyl region, Kordai district, Gvardeysky. 15 B. Momyshuly str., Tel. (726-36) 7-22-28 *www: biosafety.kz,*
E-mail: journal@biosafety.kz

© Research institute of biosafety problems, 2025

МАЗМҰНЫ

Саметова Ж.Ж., Аманова Ж.Т., Тұрыскелді Ш.С., Үсембай А.Қ., Абитаев Р.Т., Кондибаева Ж.Б., Булатов Е.А. 4
VERO СУСПЕНЗИЯЛЫҚ ЖАСУША ӨСІНДІСІНДЕГІ МИКРОТАСЫҒЫШТАР: ҰККМО ВИРУСЫН (NIGERIA 75/1 ШТАМЫ) ТИІМДІ РЕПЛИКАЦИЯЛАУ ЖӘНЕ МАСШТАБТАУ ӘДІСІ

Шыныбекова Г.О., Алмежанова М.Д., Кожабергенов Н.С., Султанкулова К.Т. 13
DERMACENTOR MARGINATUS КЕНЕЛЕРІНЕН БРУЦЕЛЛАНЫ АНЫҚТАУ

Құдайбергенова Ж., Абай Ж., Айтлесова Р., Шыныбаев Қ., Қасенов М., Нурпейсова А. 22
ҚАЗАҚСТАНДАҒЫ ТҮЙЕЛЕРДЕ *TRYPANOSOMA EVANSI-ГЕ* ҚАРСЫ АНТИДЕНЕЛІК ЖАУАП

Назаров С. Ғ., Жаңабайқызы С. 28
РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ МАЗИ НА ОСНОВЕ ГУСТОГО ЭКСТРАКТА ЛАБАЗНИКА ОБЫКНОВЕННОГО (*FILIPENDULA VULGARIS M.*)

Наханов А.К.,Коканов С.К., Теребай А.А., Мараховская Л.Г. 50
КАНЦЕРОГЕНЕЗДІ МОДЕЛЬДЕУДЕГІ ЖӘНЕ ЖЕКЕ МЕДЕЦИНАДАҒЫ ЖАСУШАЛАР БИОТЕХНОЛОГИЯЛАРЫНЫҢ ПОТЕНЦИАЛЫ

Тұрғын М.Б., Кендирбаева С.К., Кенжебаева М.К., Жүгінісов К.Д., Мамбеталиев М., Азанбекова М.А., Килибаев С.С. 84
АДАМНЫҢ ТЫНЫС АЛУ СИНЦИТИАЛДЫҚ ИНФЕКЦИЯ ВИРУСЫНА АРНАЛҒАН ТҰРАҚТАНДЫРУШЫ ОРТАНЫ ТАҢДАУ

АВТОРЛАР ТУРАЛЫ МӘЛІМЕТ 93

ЖУРНАЛДА ЖАРИЯЛАУ ҮШІН МАҚАЛАЛАРҒА ҚОЙЫЛАТЫН ТАЛАПТАР 95

СОДЕРЖАНИЕ

Саметова Ж.Ж., Аманова Ж.Т., Тұрыскелді Ш.С., Усембай А.Қ., Абитаев Р.Т., Кондибаева Ж.Б., Булатов Е.А. 4
МИКРОНОСИТЕЛИ В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК VERO: ПОДХОД К ЭФФЕКТИВНОЙ РЕПЛИКАЦИИ И МАСШТАБИРОВАНИЮ ЧМЖЖ (ШТАММ NIGERIA 75/1)

Шыныбекова Г.О.,Алмежанова М.Д., Кожабергенов Н.С., Султанкулова К.Т. 13
ВЫЯВЛЕНИЕ БРУЦЕЛЛ В КЛЕЩАХ *DERMACENTOR MARGINATUS*

Кудайбергенова Ж., Абай Ж., Айтлесова Р., Шыныбаев К., Касенов М., Нурпейсова А. 22
АНТИТЕЛЬНЫЙ ОТВЕТ НА *TRYPANOSOMA EVANSI* У ВЕРБЛЮДОВ КАЗАХСТАНА

Назаров С.Г., Жанабайкызы С. 28
РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ МАЗИ НА ОСНОВЕ ГУСТОГО ЭКСТРАКТА ЛАБАЗНИКА ОБЫКНОВЕННОГО (*FILIPENDULA VULGARIS M.)*

Наханов А.К.,Коканов С.К., Теребай А.А., Мараховская Л.Г. 50
КЛЕТОЧНЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ В МОДЕЛИРОВАНИИ КАНЦЕРОГЕНЕЗА И ИХ ПОТЕНЦИАЛ В ПРЕЦИЗИОННОЙ МЕДИЦИНЕ

Тургын М.Б., Кендирбаева С.К., Кенжебаева М.К., Жугунисов К.Д., Мамбеталиев М., Азанбекова М.А., Килибаев С.С. 84
ПОДБОР СТАБИЛИЗИРУЮЩЕЙ СРЕДЫ ДЛЯ ВИРУСА РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ ЧЕЛОВЕКА

ДАННЫЕ ОБ АВТОРАХ 93

ТРЕБОВАНИЯ К НАУЧНЫМ СТАТЬЯМ ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ В ЖУРНАЛЕ 95

CONTENTS

Sametova Zh.Zh., Amanova Zh.T., Turyskeldy Sh.S., Ussembay A.K., Abitaev R.T. , Kondybaeva Zh.B., Bulatov Ye.A. 4
MICROCARRIERS IN VERO SUSPENSION CELL CULTURE: AN APPROACH FOR EFFICIENT REPLICATION AND SCALE-UP OF PPR VIRUS (NIGERIA 75/1 STRAIN)

Shynybekova G.O.,Almezhanova M.D., Kozhabergenov N.S., Sultankulova K.T. 13
DETECTION OF BRUCELLA IN *DERMACENTOR MARGINATUS TICKS*

Kudaibergenova Zh., Abay Zh., Aitlessova R., Shynybayev K., Kassenov M., NurpeisovaA. 22
ANTIBODY RESPONSE TO *TRYPANOSOMA EVANSI* IN CAMELS OF KAZAKHSTAN

Nazarov S.G., Zhanabaikyzy S. 28
DEVELOPMENT AND INVESTIGATION OF AN OINTMENT BASED ON A THICK EXTRACT OF MEADOWSWEET (*FILIPENDULA VULGARIS M.*)

Nakhanov A.K., Kokanov S.K., Terebay A.A., Marakhovskaya L.G. 50
CELLULAR BIOTECHNOLOGIES IN THE MODELING OF CARCINOGENESIS AND THEIR POTENTIAL IN PRECISION MEDICINE

Turgyn M.B., Kendirbaeva S.K., Kenzhebaeva M.K., Zhugunisov K.D., Mambetaliev M., Azanbekova M.A., Kilibayev S.S. 84
SELECTION OF A STABILIZING MEDIUM FOR HUMAN RESPIRATORY SYNCYTIAL INFECTION VIRUS

AUTHORS' INFORMATION 93

AUTHOR INSTRUCTIONS TO THE JOURNAL 95

МРНТИ 34.33.15; 34.31.19; 68.41.37 DOI: 10.58318/2957-5702-2025-23-4-13
Оригинальная статья

МИКРОНОСИТЕЛИ В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК VERO: ПОДХОД К ЭФФЕКТИВНОЙ РЕПЛИКАЦИИ И МАСШТАБИРОВАНИЮ ЧМЖЖ (ШТАММ NIGERIA 75/1)

Саметова Ж.Ж.*, Аманова Ж.Т., Тұрыскелді Ш.С., Үсембай А.Қ., Абитаев Р.Т., Кондибаева Ж.Б., Булатов Е.А.

ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», Национальный холдинг «QazBioPharm», Гвардейский, Республика Казахстан
*zh.sametova@biosafety.kz

Аннотация. В настоящем исследовании оценивалась репродукция штамма *Nigeria* 75/1 вируса чумы мелких жвачных животных (ЧМЖЖ) в культуре клеток *Vero*, культивируемых в суспензионных условиях с использованием микроносителей (МН). Данный подход представляет собой современную платформу, сочетающую преимущества суспензионного культивирования с высокой удельной продуктивностью клеток, обеспечиваемой адгезией на поверхности МН.

Было исследовано влияние различных параметров – типа МН (Cytodex 1 и Cytodex 3), посевной концентрации клеток *Vero*, инфицирующей дозы вируса и длительности культивирования на продуктивность системы. Экспериментальные результаты показали, что использование МН обеспечивает надежную адгезию и активную пролиферацию клеток *Vero*, создавая оптимальные условия для репликации вируса. Полученный вирусный титр (≥ 6,75 lg $ТЦД_{50}$/см³) превышал показатели, описанные при традиционном монослойном культивировании, что свидетельствует о повышенной эффективности репродукции вируса. Таким образом, полученные данные подтверждают высокую перспективность технологии культивирования с применением МН как в экспериментальных исследованиях, так и для промышленной разработки и производства вакцин против ЧМЖЖ.

Ключевые слова: вирус, чума мелких жвачных животных, культура клеток Vero, суспензионное культивирование, микроносители.

Введение

Чума мелких жвачных животных (*Peste des petits ruminants,* ЧМЖЖ) – высококонтагиозное вирусное заболевание, вызываемое вирусом ЧМЖЖ, относящимся к роду *Morbillivirus* семейства *Paramyxoviridae* [1]. Возбудитель поражает овец, коз и других мелких жвачных животных, вызывая высокую смертность и значительные экономические потери, особенно в странах Африки, Ближнего Востока и Азии [2]. Впервые заболевание было описано в 1942 г в Кот-д'Ивуаре, и в настоящее время о случаях ЧМЖЖ регулярно сообщается в странах указанных регионов [3]. Согласно данным МЭБ, из 198 стран, признанных ООН, 57 имеют официальный статус свободных от ЧМЖЖ, 67 остаются эндемичными, а 74 никогда не регистрировали данную инфекцию. По оценкам ФАО (2018 г.), около 68% мирового поголовья мелких жвачных (примерно 2,5 млрд голов) сосредоточено в инфицированных странах, что напрямую затрагивает более 300 млн семей, чья экономика зависит от овцеводства и козоводства.

Профилактика ЧМЖЖ осуществляется с использованием живых аттенуированных вакцин, разработанных несколько десятилетий назад. Наиболее широко применяются штаммы *Nigeria 75/1 и Sungri 96*, доказавшие высокую эффективность и безопасность при массовой иммунизации в эндемичных регионах [4, 5]. Традиционно вирус для производства вакцин культивируется в адгезивных монослойных культурах клеток *Vero.* Однако этот метод ограничивает масштабируемость, усложняет автоматизацию и требует значительных производственных площадей [4, 6]. В связи с этим возрастает интерес к суспензионным системам культивирования, в частности, с использованием клеток *Vero,* культивируемых на МН [5]. Применение МН позволяет увеличить выход вирусного продукта, повысить стандартизацию технологического процесса и снизить себестоимость производства [7].

Концепция использования МН была предложена Ван Везелем в 1967 году [8] для устранения ограничений традиционных адгезивных культур. МН представляют собой микросферы диаметром

90–350 мкм, на поверхности которых клетки прикрепляются и пролиферируют [9, 10]. Их высокая площадь поверхности способствует увеличению плотности клеточной массы и, соответственно, повышению выхода целевого продукта [11]. Эффективность применения МН зависит от их химических и физико-механических свойств, условий посева и прикрепления клеток, а также методов обработки и отделения клеток от носителя [12]. Важным преимуществом суспензионного культивирования является возможность поддержания стабильных параметров среды (pH, концентрации растворённого кислорода, содержания питательных веществ и метаболитов) на протяжении всего процесса [13]. В настоящее время доступно множество типов МН, включая Cytodex-1, Cytodex-2, Cytodex-3, Hillex, Cytoline-1, Cytoline-2, RapidCell, 2D MicroHex, Synthemax II, SphereCol, Collagen, Cultispher-G, Cultispher-S и др. Комплексный сравнительный анализ около 50 видов МН с различным составом и свойствами был проведён исследовательской группой Derakhti с соавт. [14].

В связи с этим целью настоящей работы является оценка репродукции штамма *Nigeria 75/1* вируса ЧМЖЖ в суспензионной культуре клеток *Vero,* выращенной с использованием МН. Полученные результаты позволят определить потенциал данной платформы для масштабного производства вакцин против ЧМЖЖ.

Материалы и методы

2.1. Культура клеток и вирус. В эксперименте использовали аттенуированный штамм *Nigeria 75/1* вируса ЧМЖЖ, хранящийся в лаборатории «Коллекции микроорганизмов» Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности (НИИПББ). Биологическая активность вируса составляла 5,75 ± 0,4 lg $ТЦД_{50}/см^3$. Для репродукции вируса применяли суспензионные культуры клеток линии *Vero,* полученные от лаборатории «Клеточной биотехнологии», НИИПББ, адаптированные к росту на носителях. В качестве носителей использовали МН типов Cytodex 1 и Cytodex 3 (#GE17-0448-03 и #GE17-0485-01, Cytiva, USA). Перед использованием МН подготовлены в соответствии с инструкцией производителя: промывали, гидратировали в PBS и стерилизовали автоклавированием.

Клетки линии *Vero* культивировали в среде Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, USA) содержащей 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (FBS), L-глутамин (#25030081, Gibco, USA), пенициллин и стрептомицин.

2.2. Определение посевной концентрации клеток Vero. Культивирование клеток *Vero* на МН проводили в суспензионных условиях с использованием магнитных мешалок (Bibby Scientific, UK) при 37 ℃ в течение 96 ч. Перемешивание осуществлялось со скоростью 50 об/мин. При культивировании клеток *Vero* на выбранных МН использовали следующие посевные концентраций клеток: 25×10^5 кл/$см^3$; 30×10^5 кл/ $см^3$ и 50×10^5 кл/$см^3$. В качестве ростовой среды использовали DMEM с добавлением 5% FBS и 6% глутамина (в конечной концентрации 1%). Осаждение клеток на поверхности МН осуществляли при 37 ºС в течение 1 ч в режиме периодического перемешивания (5 мин перемешивание, 10 мин покоя), после чего переходили на постоянное перемешивание при 50 об/мин. Заполнение поверхности МН клетками контролировали ежедневным микроскопированием проб клеточной суспензии. Выход клеточной биомассы оценивали через 24, 48 и 96 ч культивирования с использованием автоматизированного счётчика клеток TC20 (Bio-Rad, California, USA).

2.3. Определение инфицирующей дозы вируса. При достижении концентрации клеток не менее $1,5\text{-}3,0 \times 10^5$ кл/мл осуществляли инфицирование клеточной суспензии штаммом *Nigeria 75/1* вируса ЧМЖЖ в дозах 0,1; 0,01; 0,001 $ТЦД_{50}$/кл. Всего были инфицированы 3 спиннера рабочим объемом 500 $см^3$. Инфицированные клетки поместили в инкубатор при 37 ℃ с 5% CO_2 в течение 1 ч с периодическим перемешиванием каждые 10 мин для прикрепления клеток к микроносителям. Культивирование вируса ЧМЖЖ проводили в CO_2-инкубаторе при температуре 37 ℃ с 5% CO_2 в течение 120 ч, с заменой питательной среды через 48 ч, после чего собирали супернатант.

2.4. Определение срока культивирование вируса ЧМЖЖ на МН.

Для определения оптимального срока культивирования проводили инфицирование суспензии клеток Vero с концентрацией не менее 30×10^5 кл/мл в трёх спиннерах рабочим объёмом 500 $см^3$ при дозе 0,01 $ТЦД_{50}$/клетку. Инфицированные клетки поместили в инкубатор при 37 ℃ с 5% CO_2 в течение 120 ч, с заменой питательной среды через 48 ч. Супернатант собирали каждые

2.5. Определение инфекционной активности вируса ЧМЖЖ

Инфекционную активность вирусных образцов определяли методом титрования в клеточной

линии Vero. Для этого клетки высевали в 96-луночные планшеты (10 000 кл./лунка), на следующий день вносили десятикратные серийные разведения вирусных образцов (10^{-1}–10^{-7}), заражая по 4 лунки на каждое разведение. Инкубацию проводили в CO_2-инкубаторе при (37 ± 0,5) °C в атмосфере 5% CO_2 в течение 10 сут. Цитопатический эффект учитывали с помощью светового микроскопа. Инфекционный титр выражали в lg $TCID_{50}$/мл, рассчитывая его по методу Рида–Менча [15].

2.6. Статистический анализ данных

Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism версии 8.0.1. Сравнение плотности клеток и титров вируса ЧМЖЖ, выращенного на различных типах микроносителей, выполнялось с использованием двухвыборочного t-теста Стьюдента (двусторонний). Статистическую значимость определяли при уровне $p < 0,05$.

Результаты

3.1. Влияние посевной концентрации на ростовые характеристики клеток Vero.

Ростовые параметры клеток *Vero* исследовали при использовании двух типов МН – Cytodex 1 и Cytodex 3. Оценку выхода клеточной биомассы проводили на 24, 48 и 96 ч культивирования. Для отделения клеток от поверхности МН применяли обработку 2 М раствором NaCl с последующим подсчётом. В ходе эксперимента было установлено, что уже через 10–12 ч после посева клетки начинали прикрепляться к поверхности МН и приобретали характерную распластанную морфологию. К 24–30 ч наблюдалось формирование практически сплошного клеточного слоя, покрывающего 90–95% поверхности как Cytodex 1, так и Cytodex 3 (рис. 1).

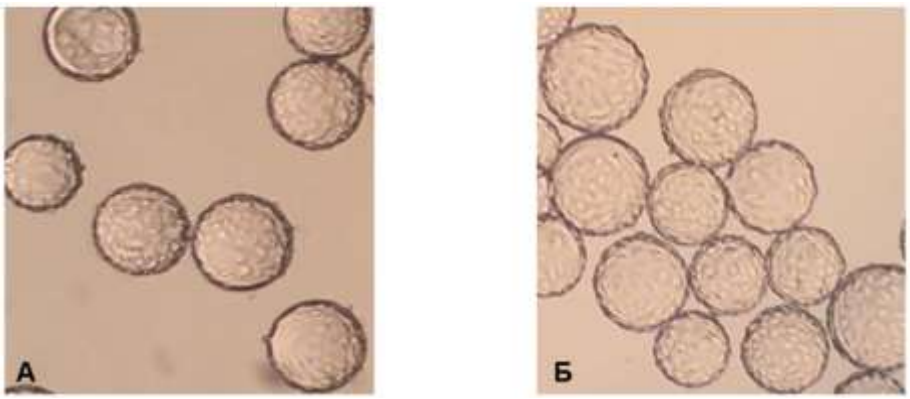


Рисунок 1. Культура клеток линии *Vero*, выращенная на МН: **А.** Cytodex 1. **Б.** Cytodex 3.

Эти результаты подтверждают высокую адгезивную способность клеток линии *Vero* к обоим типам МН и указывает на быстрое формирование плотного клеточного монослоя, что является ключевым условием для эффективной последующей репродукции вируса.

Далее было проведено исследование влияния посевной концентрации клеток *Vero* на их конечное количество при культивировании на различных типах МН (рис. 2). Анализ полученных данных показал, что варьирование исходной плотности клеток оказывало существенное влияние на динамику их роста и накопления биомассы. При низкой концентрации (25×10^5 кл/см^3) прирост клеточной массы был умеренным для обоих типов МН. Повышение посевной концентрации до 30×10^5 кл/см^3 обеспечивало максимальные показатели накопления клеток, особенно на Cytodex 3, где наблюдался наибольший выраженный прирост по сравнению с другими условиями. В то же время при высокой концентрации (50×10^5 кл/см^3) рост клеток замедлялся и конечное их количество снижалось независимо от типа МН. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о существовании оптимальной посевной плотности, при которой достигается наиболее эффективный рост клеток *Vero* при культивировании на МН.

Сравнительный анализ роста клеток Vero на микроносителях Cytodex 1 и Cytodex 3 при различных посевных плотностях показал, что среднее количество клеток на Cytodex 3 было выше во всех исследованных условиях по сравнению с Cytodex 1 (рис. 2). Однако статистически значимые различия наблюдались только при посевной плотности $3,0 \times 10^5$ кл/мл (1543,3 ± 245,8 против 895,7 ± 296,8; $p = 0,044$). При плотностях $2,5 \times 10^5$ и $5,0 \times 10^5$ кл/мл различия между группами не достигали уровня статистической значимости ($p = 0,180$ и $p = 0,232$ соответственно). Эти данные указывают на преимущество использования микроносителей Cytodex 3 для

культивирования клеток Vero при оптимальной посевной плотности 3,0 × 10^5 кл/мл.

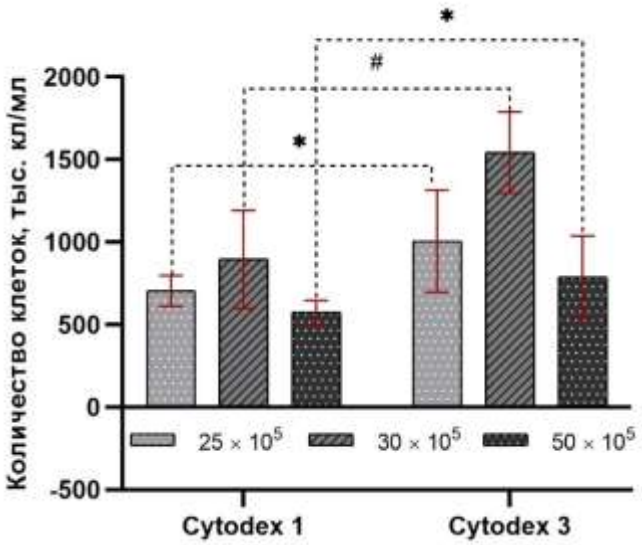


Рисунок 2. Рост клеток линии *Vero* на МН Cytodex 1 и Cytodex 3 в зависимости от посевной концентрации. * p > 0,05, # *p* = 0,044

3.2. Влияние инфицирующей дозы на репликацию вируса ЧМЖЖ

Поскольку инфицирующая доза вируса является одним из ключевых факторов, определяющих эффективность его накопления, на следующем этапе было изучено влияние дозы заражения на репродукцию вируса в культуре клеток *Vero*, выращенных на МН Cytodex 3 (рисунок 3). Анализ показал, что при инфицирующих дозах 0,1 и 0,01 $ТЦД_{50}$/кл формировались высокие вирусные титры, достигающие до 6,16 и 6,58 lg $ТЦД_{50}/см^3$ соотвтетственно. Наиболее выраженный эффект наблюдался при использовании МН Cytodex 3 с дозой 0,01 $ТЦД_{50}$/кл, где титр составил 6,58 lg $ТЦД_{50}/см^3$, что превышало значения, полученные при применении Cytodex 1. При снижении инфицирующей дозы до 0,001 $ТЦД_{50}$/кл наблюдалось существенное уменьшение титров (до 3,50 - 4,50 lg $ТЦД_{50}/см^3$) вне зависимости от типа МН, что указывает на прямую зависимость эффективности вирусной репликации от величины начальной дозы заражения.

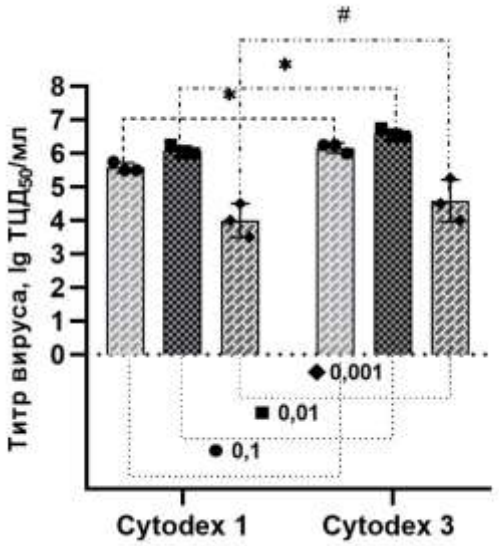


Рисунок 3. Накопление вируса ЧМЖЖ в клетках линии *Vero*, культивируемых на МН Cytodex 1 и Cytodex 3, в зависимости от инфицирующей дозы. * p < 0,05, # p > 0,05

При сравнении титров вируса, полученных на клетках с использованием микронносителей Cytodex 1 и Cytodex 3, были выявлены статистически значимые различия при дозах заражения 0,1 и 0,01 $ТЦД_{50}/см^3$. Так, при дозе 0,1 $ТЦД_{50}/см^3$ средний титр вируса на Cytodex 1 составил 5,58 ± 0,14 log_{10}, тогда как на Cytodex 3 он был достоверно выше — 6,17 ± 0,14 log_{10} (p < 0,05). Аналогичная тенденция отмечена при дозе 0,01 $ТЦД_{50}/см^3$: 6,08 ± 0,14 log_{10} для Cytodex 1 против 6,58 ± 0,14 log_{10}

для Cytodex 3 ($p < 0,05$) (рис. 3).

При наименьшей дозе заражения 0,001 $ТЦД_{50}/см^3$ различия между группами были менее выраженными: 4,00 ± 0,50 log_{10} для Cytodex 1 и 4,58 ± 0,63 log_{10} для Cytodex 3; статистическая значимость различий в этом случае не достигнута ($p > 0,05$) (рис. 3).

Таким образом, наиболее оптимальной дозой инфицирования в данных условиях являлась 0,01 $ТЦД_{50}$/клетку.

3.3. Влияние срока культивирование на репликацию вируса ЧМЖЖ

На основе полученных ранее результатов по оценке посевной концентрации клеток и инфицирующей дозы вируса в качестве оптимального МН был выбран Cytodex 3. С учётом определенных оптимальных параметров (плотность клеток (30×10^5) и доза заражения (0,01 $ТЦД_{50}/см^3$)) проведены дальнейшие исследования, направленные на изучение влияния сроков культивирования на биологическую активность штамма *Nigeria 75/1*. Анализ полученных результатов показал, что инфекционный титр вируса возрастал в течение первых 3-х сут, достигая максимального значения 6,75 ± 0,00 lg $ТЦД_{50}/см^3$ на 3-4 сут (рисунок 4). В дальнейшем наблюдалось постепенное снижение титра, которое к 7-8 сут стабилизировался на уровне около 5,00 lg $ТЦД_{50}/см^3$, а к 9-10 сут снижался до 3,75 ± 0,00 lg $ТЦД_{50}/см^3$. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что оптимальным сроком сбора вируссодержащего материала в данных условиях культивирования являются 3-4 сут после заражения.

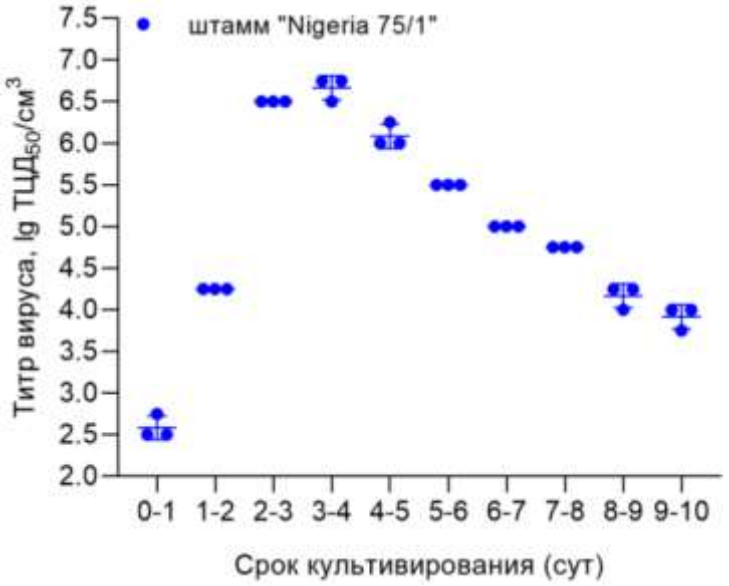


Рисунок 4. Динамика накопления вируса ЧМЖЖ в клетках линии *Vero*, культивируемых на МН Cytodex 3, в зависимости от длительности культивирования

Обсуждение

После первого выявления вируса ЧМЖЖ для обеспечения перекрёстной защиты применялись вакцины против чумы крупного рогатого скота (ЧКРС). Такой подход был обусловлен отсутствием специализированных вакцин против ЧМЖЖ, при этом вирус ЧКРС является филогенетически близким патогеном [16], что позволяло рассчитывать на частичную иммунную защиту. Лишь в 1989 году была внедрена живая аттенуированная вакцина против ЧМЖЖ – штамм *Nigeria 75/1,* после чего использование вакцин против ЧКРС для профилактики ЧМЖЖ было запрещено [17]. Это стало важным этапом формирования самостоятельной стратегии борьбы с заболеванием. В настоящее время живая аттенуированная вакцина *Nigeria 75/1* (линии II) производится в крупных масштабах и применяется в странах Африки, Ближнего Востока и Азии [17–20], что свидетельствует о ее признании как глобального инструмента контроля инфекции. Широкий географический охват применения подтверждает универсальность данного штамма и его высокую эпидемиологическую значимость.

Эффективные живые аттенуированные вакцины против ЧМЖЖ формируют у овец и коз пожизненный защитный иммунитет, обеспечивая перекрёстную защиту от всех четырёх линий вируса [21, 22]. Это делает их одним из наиболее надежных средств профилактики заболевания в эндемичных регионах. Однако при разработке и производстве вакцин необходимо учитывать все

аспекты процесса культивирования и масштабирования. Вакцинное производство требует строгой технологической преемственности между лабораторными и промышленными этапами [23]. Нередко условия, обеспечивающие высокие показатели биологической активности и качества вакцины в малых объёмах при стационарном культивировании, оказываются недостаточно эффективными при переходе к промышленным масштабам. В результате на этапе масштабирования может наблюдаться снижение биологической активности и других ключевых характеристик вакцинного препарата, что требует корректировки технологических режимов. Поэтому проведение исследований, направленных на оптимизацию параметров масштабирования и адаптацию технологических процессов, является актуальной задачей для обеспечения стабильного качества и сохранения иммуногенных свойств вакцины при выпуске больших серий.

В данном исследовании изучена репродукция штамма *Nigeria 75/1* вируса ЧМЖЖ в культуре клеток *Vero*, выращиваемых в суспензионных условиях с применением МН. Такой подход позволяет оценить эффективность альтернативных систем культивирования, которые потенциально могут повысить производительность и упростить процесс масштабирования. Результаты показали высокую эффективность репродукции вируса: полученный титр ($\geq$ 6 lg $ТЦД_{50}/см^3$) сопоставим или превышает значения, описанные при традиционном культивировании в монослое [1, 6]. Использование МН обеспечило увеличение удельной плотности клеток и, соответственно, выход вируса без необходимости расширения площади поверхности, что особенно важно в условиях ограниченных производственных мощностей. Это имеет существенное значение для масштабного производства вакцин, где требуется высокая воспроизводимость и компактность процесса [7].

Культивирование клеток в суспензии с применением МН создаёт предпосылки для переноса технологии в управляемые биореакторные системы, что соответствует современным требованиям к производству вирусных вакцин: автоматизация процессов, обеспечение высокого уровня биобезопасности, снижение рисков перекрёстной контаминации. Ранее аналогичные технологии продемонстрировали эффективность при производстве вакцин против кори, бешенства и других вирусов на основе клеток *Vero* [24, 25], что подтверждает возможность адаптации данного подхода для получения вакцин против ЧМЖЖ в промышленных масштабах.

Таким образом, полученные результаты указывают на высокую перспективность использования технологии культивирования с применением МН в системах на основе клеток *Vero*. Этот подход может быть интегрирован в существующие производственные линии и стать основой для разработки более эффективных и технологически устойчивых методов производства вакцин против ЧМЖЖ.

Заключение

Проведённое исследование подтвердило возможность эффективной репродукции аттенуированного штамма *Nigeria 75/1* вируса ЧМЖЖ в суспензионной культуре клеток *Vero* с использованием МН. Полученные результаты показали, что данный подход обеспечивает формирование высоких вирусных титров ($\geq$ 6,75 lg $ТЦД_{50}/см^3$) и выраженный цитопатический эффект, что свидетельствует о его высокой эффективности.

Выявленные параметры культивирования позволяют рассматривать использование МН как перспективное направление для масштабирования процесса и внедрения в промышленное производство вакцин. Полученные данные могут быть положены в основу разработки технологических решений для получения живой аттенуированной вакцины против ЧМЖЖ с сохранением её биологической активности.

Финансирование: Работа была выполнена в рамках ПЦФ «Биологическая безопасность Республики Казахстан: оценка угроз, научно-технические основы их предупреждения и ликвидации» на 2021–2023гг.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Литература

1. Kumar N and al. Peste des petits ruminants virus infection of small ruminants; A Comprehensive ReviewA threat to small ruminants // Viruses 2014, 6(6), 2287-2327; https://doi.org/10.3390/v6062287

2. Banyard A.C., Parida S., Batten C., Oura C. et al. Global distribution of peste des petits ruminants virus and prospects for improved diagnosis and control // *Journal of General Virology* (2010), 91, P.2885–2897. https://doi.org/10.1099/vir.0.025841-0

3. FAO/OIE. Global Strategy for the Control and Eradication of PPR. 2015. (Available online: https://openknowledge.fao.org/items/3a081556-4053-499c-856b-b087dce7e604) [Дата обращения 15.08.2025]

4. Hodgson SMoffat K, Hill HFlannery JT, Graham SPBaron MD, Darpel KE.2018.Comparison of the Immunogenicities and Cross-Lineage Efficacies of Live Attenuated Peste des Petits Ruminants Virus Vaccines PPRV/Nigeria/75/1 and PPRV/Sungri/96. J Virol92:10.1128/jvi.01471-18. https://doi.org/10.1128/jvi.01471-18

5. Sen A., Saravanan P., Balamurugan V., Rajak K.K., Sudhakar S.B., Bhanuprakash V., Parida S., Singh R.K. Vaccines against peste des petits ruminants virus // *Expert Review of Vaccines.* 2010. Vol. 9. P. 785-796. https://doi.org/10.1586/erv.10.74

6. Sousa M. et al. Process intensification for Peste des Petites Ruminants Virus vaccine production// *Vaccine*. 2019. Vol. 37, № 47. P. 7041–7051. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.07.009

7. Silva A.C. et al. Scalable culture systems using different cell lines for the production of Peste des Petits ruminants vaccine // *Vaccine*. 2008 Vol. 26, № 26. P. 3305–3311. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.03.077

8. Van Wezel A. Growth of Cell-strains and Primary Cells on Micro-carriers in Homogeneous Culture // *Nature.* 1967. Vol. 216. P. 64-65. https://doi.org/10.1038/216064a0

9. GE Healthcare. Microcarrier Cell Culture: Principles and Methods. 2005. (Available online: https://ru.scribd.com/document/364986081/Microcarrier-Cell-Culture-Principles-and-Methods) [Дата обращения 15.08.2025]

10. Souza, M.C., Freire, M.S., Castilho, L.R. (2007). Cultivation of Vero Cells on Microporous and Macroporous Microcarriers. In: Smith, R. (eds) Cell Technology for Cell Products., vol 3. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5476-1_136

11. Kehoe D., Jing D., Lock L., Tzanakakis E. Scalable stirred-suspension bioreactor culture of human pluripotent stem cells // Tissue Engineering Part A. 2010. Vol.16. – P. 405-421. https://doi.org/10.1089/ten. tea.2009.0454

12. Forestell S., Kalogerakis N., Behie L., Gerson D. Development of the optimal inoculation conditions for microcarrier cultures // *Biotechnology and Bioengineering*. 2002. Vol.39. – P. 305-313. https://doi.org/10.1002/bit.260390308

13. Caron M., Emans P., Coolsen M., Voss L., Surtel D., Cremers A., van Rhijn L. Welting Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures // *Osteoarthritis and Cartilage.* 2012. Vol. 20. P. 1170-1178. https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.06.016

14. Derakhti S., Safiabadi-Tali S.H., Amoabediny G., Sheikhpour M. Attachment and detachment strategies in microcarrier-based cell culture technology: A comprehensive review // *Materials Science and Engineering C*. 2019. Vol. 103. P. 109782. https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109782.

15. Reed L.J., Muench H., A simple method of estimating fifty per cent endpoints // *American Journal of Epidemiology*. 1938. Vol.27, Issue 3, P. 493–497, https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408

16. Dou Y., Liang Z., Prajapati M., Zhang R., Li Y., Zhang Z. Expanding diversity of susceptible hosts in Peste Des Petits Ruminants virus infection and its potential mechanism beyond // *Frontiers in Veterinary Sciences*. 2020. Vol. 7. https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00066

17. Diallo A, Taylor WP, Lefèvre PC, Provost A. Atténuation d'une souche de virus de la peste des petits ruminants: candidat pour un vaccin homologue vivant [Attenuation of a strain of rinderpest virus: potential homologous live vaccine]. *Rev Elev Med Vet Pays Trop*. 1989;42(3):311-319.

18. Bora M., Yousuf R.W., Dhar P., Singh R.P. An overview of process intensification and thermo stabilization for upscaling of Peste des petits ruminants vaccines in view of global control and eradication // *Virus disease.* 2018. Vol. 29. P. 285–296. https://doi.org/10.1007/s13337-018-0455-3

19. Sarkar J., Sreenivasa B.P., Singh R.P., Dhar P., Bandyopadhyay S.K. Comparative efficacy of various chemical stabilizers on the thermostability of a live-attenuated peste des petits ruminants (PPR) vaccine // *Vaccine*. 2003. Vol. 21. P. 4728–4735. https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00512-7

20. Diallo A., Minet C., Le Goff C., Berhe G., Albina E., Libeau G., Barrett T. The threat of peste des petits ruminants: Progress in vaccine development for disease control // *Vaccine*. 2007. Vol. 25. P. 5591–5597. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.02.013

21. Mahapatra M., Selvaraj M., Parida S. Comparison of Immunogenicity and Protective Efficacy of PPR Live Attenuated Vaccines (Nigeria 75/1 and Sungri 96) Administered by Intranasal and Subcutaneous Routes // *Vaccines*. 2020. Vol. 8. P. 168. https://doi.org/10.3390/vaccines8020168

22. Cosseddu G.M., Polci A., Pinoni C., Capobianco Dondona A., Iapaolo F., Orsini G., Izzo F., Bortone G., Ronchi F.G., Di Ventura M., et al. Evaluation of Humoral Response and Protective Efficacy of an Inactivated Vaccine Against Peste des Petits Ruminants Virus in Goats // *Transboundary and Emerging Diseases.* 2016. Vol. 63. P. 447–452. https://doi.org/10.1111/tbed.12314

23. Panagopoulos A., Sideri K. From lab to mass production: a policy for enabling the licensing of mRNA vaccines // Frontiers in Public Health. 2023. Vol. 11. P. 1151713. https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1151713

24. Gallo-Ramirez L.E. et al. Production of viral vaccines in suspension cultures of Vero cells using microcarriers: Advances and challenges // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015. Vol. 99. P. 2125–2136.

25. Barrett P.N. et al. Vero cell platform in vaccine production: Moving toward cell culture–based viral vaccines // *Expert Review of Vaccines.* 2009. Vol. 8, № (5). P. 607–618. https://doi.org/10.1586/erv.09.19

References

1. Kumar N., et al. Peste des petits ruminants virus infection of small ruminants: a comprehensive review and a threat to small ruminants. *Viruses*. 2014;6(6):2287–2327. https://doi.org/10.3390/v6062287

2. Banyard A.C., Parida S., Batten C., Oura C., et al. Global distribution of peste des petits ruminants virus and prospects for improved diagnosis and control. *Journal of General Virology*. 2010;91:2885–2897. https://doi.org/10.1099/vir.0.025841-0

3. FAO, OIE. *Global Strategy for the Control and Eradication of Peste des Petits Ruminants (PPR)*. Rome; 2015. Available online. Accessed August 15, 2025.

4. Hodgson S., Moffat K., Hill H., Flannery J., Graham S., Baron M.D., Darpel K.E. Comparison of the immunogenicities and cross-lineage efficacies of live attenuated Peste des Petits Ruminants virus vaccines Nigeria 75/1 and Sungri 96. *Journal of Virology*. 2018;92:e01471-18. https://doi.org/10.1128/JVI.01471-18

5. Sen A., Saravanan P., Balamurugan V., Rajak K.K., Sudhakar S.B., Bhanuprakash V., Parida S., Singh R.K. Vaccines against peste des petits ruminants virus. *Expert Review of Vaccines*. 2010;9:785–796. https://doi.org/10.1586/erv.10.74

6. Sousa M., et al. Process intensification for peste des petits ruminants virus vaccine production. *Vaccine*. 2019;37(47):7041–7051. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.07.009

7. Silva A.C., et al. Scalable culture systems using different cell lines for the production of peste des petits ruminants vaccine. *Vaccine*. 2008;26(26):3305–3311. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.03.077

8. Van Wezel A. Growth of cell strains and primary cells on microcarriers in homogeneous culture. *Nature*. 1967;216:64–65. https://doi.org/10.1038/216064a0

9. GE Healthcare. *Microcarrier Cell Culture: Principles and Methods*. 2005. Available online. Accessed August 15, 2025.

10. Souza M.C., Freire M.S., Castilho L.R. Cultivation of Vero cells on microporous and macroporous microcarriers. In: Smith R., ed. *Cell Technology for Cell Products*. Vol. 3. Dordrecht: Springer; 2007. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5476-1_136

11. Kehoe D.E., Jing D., Lock L.T., Tzanakakis E.S. Scalable stirred-suspension bioreactor culture of human pluripotent stem cells. *Tissue Engineering Part A*. 2010;16:405–421. https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0454

12. Forestell S.P., Kalogerakis N., Behie L.A., Gerson D.F. Development of optimal inoculation conditions for microcarrier cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 2002;39:305–313. https://doi.org/10.1002/bit.260390308

13. Caron M.M.J., Emans P.J., Coolsen M.M.E., et al. Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2012;20:1170–1178. https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.06.016

14. Derakhti S., Safiabadi-Tali S.H., Amoabediny G., Sheikhpour M. Attachment and detachment strategies in microcarrier-based cell culture technology: a comprehensive review. *Materials Science and Engineering C*. 2019;103:109782. https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109782

15. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Epidemiology*. 1938;27(3):493–497. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408

16. Dou Y., Liang Z., Prajapati M., et al. Expanding diversity of susceptible hosts in peste des petits ruminants virus infection and its potential mechanisms. *Frontiers in Veterinary Science*. 2020;7:66. https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00066

17. Diallo A., Taylor W.P., Lefèvre P.C., Provost A. Attenuation of a strain of peste des petits ruminants virus: candidate for a homologous live vaccine. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*. 1989;42(3):311–319.

18. Bora M., Yousuf R.W., Dhar P., Singh R.P. Process intensification and thermostabilization for upscaling of peste des petits ruminants vaccines. *VirusDisease*. 2018;29:285–296. https://doi.org/10.1007/s13337-018-0455-3

19. Sarkar J., Sreenivasa B.P., Singh R.P., Dhar P., Bandyopadhyay S.K. Comparative efficacy of chemical stabilizers on the thermostability of live-attenuated PPR vaccine. *Vaccine*. 2003;21:4728–4735. https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00512-7

20. Diallo A., Minet C., Le Goff C., et al. The threat of peste des petits ruminants: progress in vaccine development for disease control. *Vaccine*. 2007;25:5591–5597. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.02.013

21. Mahapatra M., Selvaraj M., Parida S. Comparison of immunogenicity and protective efficacy of PPR live attenuated vaccines administered by intranasal and subcutaneous routes. *Vaccines*. 2020;8:168. https://doi.org/10.3390/vaccines8020168

22. Cosseddu G.M., Polci A., Pinoni C., et al. Evaluation of humoral response and protective efficacy of an inactivated vaccine against peste des petits ruminants virus in goats. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2016;63:447–452. https://doi.org/10.1111/tbed.12314

23. Panagopoulos A., Sideri K. From lab to mass production: a policy for enabling the licensing of mRNA vaccines. *Frontiers in Public Health*. 2023;11:1151713. https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1151713

24. Gallo-Ramírez L.E., et al. Production of viral vaccines in suspension cultures of Vero cells using microcarriers: advances and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015;99:2125–2136.

25. Barrett P.N., et al. Vero cell platform in vaccine production: moving toward cell culture–based viral vaccines. *Expert Review of Vaccines*. 2009;8(5):607–618. https://doi.org/10.1586/erv.09.19

VERO СУСПЕНЗИЯЛЫҚ ЖАСУША ӨСІНДІСІНДЕГІ МИКРОТАСЫҒЫШТАР: ҰҚҚМО ВИРУСЫН (NIGERIA 75/1 ШТАМЫ) ТИІМДІ РЕПЛИКАЦИЯЛАУ ЖӘНЕ МАСШТАБТАУ ӘДІСІ

Саметова Ж.Ж.*, Аманова Ж.Т., Тұрыскелді Ш.С., Үсембай А.Қ., Абитаев Р.Т., Кондибаева Ж.Б., Булатов Е.А.

«Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» ЖШС, «QazBioPharm» ұлттық холдингі, Гвардейский, Қазақстан Республикасы
*zh.sametova@biosafety.kz

Аннотация. Бұл мақалада суспензиялық ортада микротасығыштарда өсірілген *Vero* жасуша өсіндісінде ұсақ күйіс қайыратын малдар обасы (ҰҚҚМО) вирусының (Nigeria 75/1 штамы) көбеюін бағалайтын зерттеулер жүргізілді. Бұл әдіс, микротасығыштардағы адгезивті қасиетпен қамтамасыз етілген жасушалардың жоғары өнімділігін суспензиялық өсірудің артықшылықтарымен ұштастыратын, заманауи платформа болып табылады.

Жүйенің өнімділігіне әртүрлі параметрлердің − вирустың зарарлау дозасы, өсу ұзақтығы, *Vero* жасуша өсіндісінің концентрациясы, микротасығыштардың түрі (Cytodex 1 және Cytodex 3) әсері зерттелінді. Зерттеу нәтижесінде микротасығыштардың *Vero* жасушасының белсенді пролиферациясы мен адгезивтілігін қамтамасыз ететіндігі анықталынды. Өсірілген вирустың титрі (≥ 6,75 lg $ТЦД_{50}$/см³) дәстүрлі моноқабатты өсіру кезінде сипатталған вирус титрінің мәнінен жоғары болуы вирусты өсіру тиімділігінің жоғарылағанын көрсетеді. Алынған зерттеу нәтижелері, тәжірибелік зерттеулерде, өнеркәсіптік әзірлеуде және ҰҚҚМО қарсы вакциналарды өндіруде,

микротасығыштардың өсіру технологиясында қолданылуының жоғары мүмкіншілігі барын растайды.

Түйін сөздер: вирус, ұсақ күйіс қайыратын малдар обасы, Vero жасуша өсіндісі, суспензиялық өсіру, микротасығыштар.

MICROCARRIERS IN VERO SUSPENSION CELL CULTURE: AN APPROACH FOR EFFICIENT REPLICATION AND SCALE-UP OF PPR VIRUS (NIGERIA 75/1 STRAIN)

Sametova Zh. Zh.*, Amanova Zh. T., Turyskeldy Sh. S., Ussembay A. K., Abitaev R. T., Kondybaeva Zh. B., Bulatov Ye. A.

LLP «Research Institute for Biological Safety Problems», National holding «QazBioPharm», Guardeyskiy, Republic of Kazakhstan
*zh.sametova@biosafety.kz

Abstract. This study assessed the replication of the Nigeria 75/1 strain of the peste des petits ruminants (PPR) virus in Vero cells cultured in suspension using microcarriers. This approach represents a modern platform that combines the advantages of suspension cultivation with the high specific productivity of cells achieved through adhesion to the surface of microcarriers.

The influence of various parameters—type of microcarriers (Cytodex 1 and Cytodex 3), seeding concentration of Vero cells, infectious dose of the virus, and cultivation duration—on the system's productivity was investigated. Experimental results demonstrated that the use of microcarriers ensures reliable adhesion and active proliferation of Vero cells, thereby creating optimal conditions for virus replication. The obtained viral titer (≥ 6.75 log $TCID_{50}/cm^3$) exceeded the values reported for traditional monolayer cultivation, indicating increased efficiency of virus replication. Thus, the obtained data confirm the high potential of cultivation technology using microcarriers both for experimental studies and for industrial development and production of a vaccine against PPR.

Keywords: virus, peste des petits ruminants, Vero cell culture, suspension culture, microcarriers.

МРНТИ 34.15.27 DOI:10.58318/2957-5702-2025-23-13-22

Оригинальная статья

ВЫЯВЛЕНИЕ БРУЦЕЛЛ В КЛЕЩАХ *DERMACENTOR MARGINATUS*

Шыныбекова Г. О., Алмежанова М. Д., Кожабергенов Н. С., Султанкулова К. Т.

ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», Национальный холдинг «QazBioPharm», Гвардейский, Республика Казахстан
*sh.gaukhar@biosafety.kz

Аннотация. Клещи являются переносчиками многочисленных патогенов, а их бактериальный состав, численность, разнообразие и взаимодействие влияют как на их рост, так и на эффективность передачи болезней. Появление технологий метагеномного секвенирования нового поколения (NGS) расширило возможности обнаружения и характеристики микробных патогенов. Благодаря анализу данных о последовательностях можно идентифицировать наличие ДНК бруцелл у клещей и определить ее генетические характеристики. В весенний период 2023 года в Таскалинском районе Западно-Казахстанской области, собраны образцы клещей. Секвенирование генов 16S рРНК бактерии в образцах клещей проведено с использованием платформы Ion Torrent по технологии NGS.

В образцах клещей *D. marginatus*_WKR_Taskala метагеномный анализ выявил *Brucella suis bv. 3* (25%) и другие виды *Brucella* (75%). Анализ ридов, полученных в результате метагеномного секвенирования образца клеща идентифицировал 3973 ридов, из которых 2966 классифицированы как *Brucella spp.*, а 1007 – как *Brucella suis bv. 3*. Значения индексов альфа-разнообразия для образца *D. marginatus*_WKR_Taskala составили: Шеннона = 0.797, Симпсона 1−D = 0.473, Маргалефа =

0.241. Клещи признаны основными переносчиками широкого спектра заболеваний среди домашних и диких животных по сравнению с другими членистоногими. Несмотря на многочисленные исследования, посвященные связи между передачей бруцеллеза и клещами, точная роль клещей в передаче этого заболевания и связанные с этим риски остаются недостаточно изученными.

Ключевые слова: клещ, *Dermacentor marginatus,* 16S рРНК, метагеномика, *Brucella,* альфа-разнообразие

Введение

Бруцеллёз – это зоонозное инфекционное заболевание, вызываемое бактериями рода *Brucella*, представляющее серьёзную угрозу, как для здоровья человека, так и для животных. Передача возбудителя может осуществляться различными путями, включая контакт с инфицированными животными, употребление заражённых продуктов и через укусы кровососущих членистоногих. У восприимчивых животных бруцеллез чаще всего передается при прямом контакте с инфицированными животными или через окружающую среду, загрязненную выделениями инфицированных животных [1]. Крупный рогатый скот, собаки, овцы, козы и свиньи являются основными резервуарами видов *Brucella* для заражения человека. Бруцеллез распространен в странах Средиземноморья, Западной Азии и некоторых частях Африки и Латинской Америки [2]. Проведённое исследование в Западном Иране показывает, что из 244 обследованных клещей, собранных с домашних мелких жвачных животных, был обнаружен *Brucella spp.* у 4 клещей (1,6 %)**,** из них 3 экземпляра *Dermacentor marginatus* (1,22 %) и один *Rhipicephalus turanicus* (0,4 %). Один из клещей *D. marginatus* оказался положительным на *Brucella abortus*, тогда как *B. melitensis* не был обнаружен ни в клещах, ни в образцах крови животных. Авторы делают вывод, что такие данные свидетельствуют о возможной роли клещей, включая *D. marginatus*, в передаче *Brucella spp.* между животными и потенциально человеку [3].

Имеются литературные данные о эпидемиологической роли клещей в передаче бруцеллеза среди домашнего скота и домашних животных. *Brucella spp.* были идентифицированы как *Hyalomma anatolicum, D. nuttalli* и *Dermacentor marginatus*, полученные от крупного рогатого скота и овец на северо-востоке Китая [4]. Кроме того, *B. melitensis* был обнаружен у *Haemaphysalis longicornis* , собранного с коз или растительности в центральном Китае [5], и *у D. nuttalli* , собранного с растительности или овец на севере Китая [6, 7]. Аналогичным образом, *Brucella spp.* был распространенным патогеном у *Rhipicephalus sanguineus*, паразитирующего на собаках в Лаосской Народно-Демократической Республике, а также у *Rhipicephalus turanicus* и образцов крови собак в Северо-Западном Китае, что подвергало владельцев риску заражения бруцеллезом и вызывало важные последствия для общественного здравоохранения [8, 9]. Кроме того, как молекулярными, так и культуральными методами было продемонстрировано, что взрослые самки *D. marginatus* или *D. nuttalli* , собранные с овец, крупного рогатого скота или растительности в Китае, трансовариально и трансстадиально передавали *B. melitensis* и *B. abortus* [10]. Соответственно, *B. melitensis* был более многочисленным у взрослых самок и личиночных стадий *D. nuttalli*, собранных с растительности или домашнего скота в Северном Китае [6, 7].

Клещи вида *Dermacentor marginatus* широко распространены в различных регионах Казахстана и известны как переносчики ряда бактериальных и вирусных инфекций [11-13]. Однако их роль в эпидемиологии бруцеллёза до настоящего времени остаётся недостаточно изученной. Определение наличия возбудителя *Brucella spp.* в популяциях этих клещей может дать важную информацию о потенциальных механизмах сохранения и циркуляции инфекции в природных очагах.

В условиях Казахстана изучение роли иксодовых клещей в циркуляции возбудителя *Brucella ssp*. приобретает особую актуальность, поскольку территория страны характеризуется развитым животноводством и высокой численностью, как домашних, так и диких животных. Применение современных молекулярных методов позволит уточнить спектр природных резервуаров и переносчиков бруцеллеза, а также разработать более эффективные меры профилактики и биобезопасности.

Целью данной работы является выявление бруцеллеза в клещах с использованием метагеномного анализа.

Материалы и методы

Этическое одобрение. Экспериментальные процедуры, использованные в исследовании, соответствовали рекомендациям документа №10/14-11-22, одобренного Комитетом по этике обращения с животными Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности (НИИПББ).

Сбор образцов клещей.

В апреле-мае 2023 г. проведен сбор иксодовых клещей в Таскалинском районе Западно-Казахстанской области. Сведения о коллекции иксодовых клещей представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика образцов клещей, отобранных в Западно-Казахстанской области

Место сбора образцов	Расположение	Количество клещей	Вид клеща	Пол
ЗКО, Таскалинский район, с. Таскала	51°06′27″ с. ш. 50°17′34″ в. д	1 пул (10 клещей)	*D. marginatus*	Самка
ЗКО, Таскалинский район, с. Бирлик	51°07′44″ с. ш. 50°12′01″ в. д.	1 пул (10 клещей)	*D. marginatus*	Самка
ЗКО, Таскалинский район, с. Атамекен	50°49′00″ с. ш. 49°58′28″ в. д.	1 пул (10 клещей)	*D. marginatus*	Самка
ЗКО, Таскалинский район, с. Мереке	50°46′01″ с. ш. 49°20′13″ в. д.	1 пул (10 клещей)	*D. marginatus*	Самка

Для нанесения точек отлова клещей использовали географическую информационную систему. Места сбора (координаты) образцов клещей были занесены в электронную базу данных для создания карты (Рисунок 1).



Рисунок 1 – Места сбора клещей *D. marginatus* в Таскалинском районе Западно-Казахстанской области с использованием картографического анализа QGIS

– с. Мереке, Таскалинский район, ЗКО; – с. Атамекен, Таскалинский район, ЗКО;

– с. Бирлик, Таскалинский район, ЗКО; – с. Таскала, Таскалинский район, ЗКО

Географическое распределение клещей было визуализировано с помощью картографического анализа, выполненного в программном обеспечении QGIS.

Выделение ДНК

Очищенные 70% этанолом клещи были гомогенизированы с помощью механического гомогенизатора в центрифужных пробирках, содержащих 500 мкл охлажденного стерильного фосфатно-солевого буфера (PBS, 1X). Гомогенизированные образцы затем центрифугировали при 4

°C и 12 000 g в течение 10 мин, после чего был собран супернатант. Общая ДНК была извлечена из супернатанта с использованием набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) в соответствии с протоколом производителя. Чистота извлеченной ДНК была оценена с помощью электрофореза в агарозном геле, и образцы ДНК хранились при температуре −80 °C до дальнейшего использования.

Подготовка библиотеки

Концентрацию ДНК из микробного сообщества измеряли с помощью набора Qubit dsDNA HS (высокая чувствительность) (Life Technologies). Библиотеки готовили с помощью набора Ion 16 S™ Metagenomics (Thermo-Fisher Scientific). Если вкратце, 12 мкл ДНК смешивали с 15 мкл Environmental Master Mix. В каждую пробирку добавляли по 3 мкл каждого набора праймеров 16 S (10X): один набор образцов с праймерами для V2-4-8 (пул 1), а другой с праймерами для V3-6,7-9 (пул 2). Образцы помещали в термоциклер со следующими температурными условиями: 95 °C в течение 10 мин; затем 25 циклов 95 °C в течение 30 с, 58 °C в течение 30 с, 72 °C в течение 30 с; и, наконец, 72 °C в течение 7 мин. Продукты амплификации очищали с помощью бус AMPure XP (Beckman Coulter) и элюировали в воде, свободной от нуклеаз. Концентрации продуктов амплификации из пулов 1 и 2 измеряли в агарозном геле, после чего оба пула объединяли.

Затем к каждому образцу добавляли 20 мкл буфера 5X End Repair и 1 мкл фермента End Repair Enzyme, после чего инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре. Объединенные ампликоны снова очищали с помощью гранул AMPure XP и элюировали в буфере Low TE. Лигирование и репарацию разрывов проводили с использованием ×10 лигазного буфера, адаптера Ion P1, штрихкодов Ion Xpress, смеси dNTP, ДНК-лигазы, полимеразы репарации разрывов, воды без нуклеазы и образца ДНК при следующих температурных условиях: 25 °C в течение 15 минут, 72 °C в течение 5 минут. Затем ДНК, лигированную с адаптером и репарированную с разрывами, очищали с помощью гранул AMPure XP и элюировали в буфере Low TE.

Далее библиотеку амплифицировали с помощью набора Ion Plus Fragment Library Kit (ThermoFisher Scientific) при следующих температурных условиях: 95 °C в течение 5 мин; затем 7 циклов: 95 °C в течение 15 с, 58 °C в течение 15 с, 70 °C в течение 1 мин; и наконец, 70 °C в течение 1 мин. Амплифицированную библиотеку очищали с помощью гранул AMPure XP и элюировали в буфере Low TE. Оптимальную концентрацию библиотеки для приготовления матрицы определяли методом количественной ПЦР (Applied Biosystems® Quantstudio 5) с использованием набора Ion Universal Library Quantitation Kit (Thermo-Fisher Scientific). Концентрацию каждой библиотеки доводили до 30 пМ и равные объемы каждой библиотеки объединяли.

Секвенирование

Библиотеки были подготовлены для секвенирования с помощью прибора Ion Chef и наборов Ion 510™ & 520™ & Ion 530™ Kit–Chef (Thermo-Fisher Scientific). Затем чипы загружались в систему Ion GeneStudio S5 вместе с реагентами набора Ion S5 Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific) и секвенировались в лаборатории. Образцы в данном исследовании были секвенированы на чипах Ion 530 с размером фрагмента 400 п.н.

Таксономическая классификация

Таксономический анализ бактериального сообщества проводили путем анализа данных высокопроизводительного секвенирования гипервариабельной области V3-V4 гена 16S рРНК на платформе технологии секвенирования нового поколения Ion Torrent. Полученные данные были таксономически классифицированы на платформе Центра бактериальной и вирусной биоинформатики (BV-BRC) с использованием стандартной базы данных Kraken2.

Статистический анализ данных

Для изучения параметров альфа-разнообразия сообществ рассчитывались индексы разнообразия Шеннона, доминирования Симпсона [14] и Маргалефа [15]. В таблице 2 представлены расчетные формулы индексов для количественной оценки параметров альфа-разнообразии.

Таблица 2 – Индексы для количественной оценки параметров альфа-разнообразии

Название индекса	Расчетная формула	Уровень разнообразия
Индекс разнообразия Шеннона	$H' = -\sum_{i=1}^{R}(p_i \ln p_i)$	Альфа-разнообразие
Индекс видового богатства Маргалефа	$d = \frac{S-1}{lnN}$	Альфа-разнообразие
Индекс доминирования Симпсона	$D = \sum\left(\frac{n_i(n_i-1)}{N(N-1)}\right)$	Альфа-разнообразие

Примечание.

Индекс Шеннона: где pi – доля особей, принадлежащих к i-му виду, R – общее количество видов, ln – натуральный логарифм;

Индекс Маргалефа: где S – видовое богатство, N – объем выборки (численность сообщества);

Индекс Симпсона: где ni – число особей i-го вида, а N – общее число особей

Результаты

Бактерия бруцелла обнаружена в образце клеща при проведении метагеномного анализа. В образце D. marginatus_WKR_Taskala, основная доля представлена общими ридами рода *Brucella*. Это указывает на распределение *Brucella*, с доминированием неидентифицированных до вида последовательностей. Результаты таксономических данных бактерии бруцелла представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Таксономические данные рода *Brucella*, полученные при метагеномном анализе образца клеща из *D. marginatus*_WKR_Taskala

Риды	Таксономические данные
2966	*Bacteria, Pseudomonadota, Alphaproteobacteria, Hyphomicrobiales, Brucellaceae, Brucella*
1007	*Bacteria, Pseudomonadota, Alphaproteobacteria, Hyphomicrobiales, Brucellaceae, Brucella, Brucella suis, Brucella suis bv. 3*

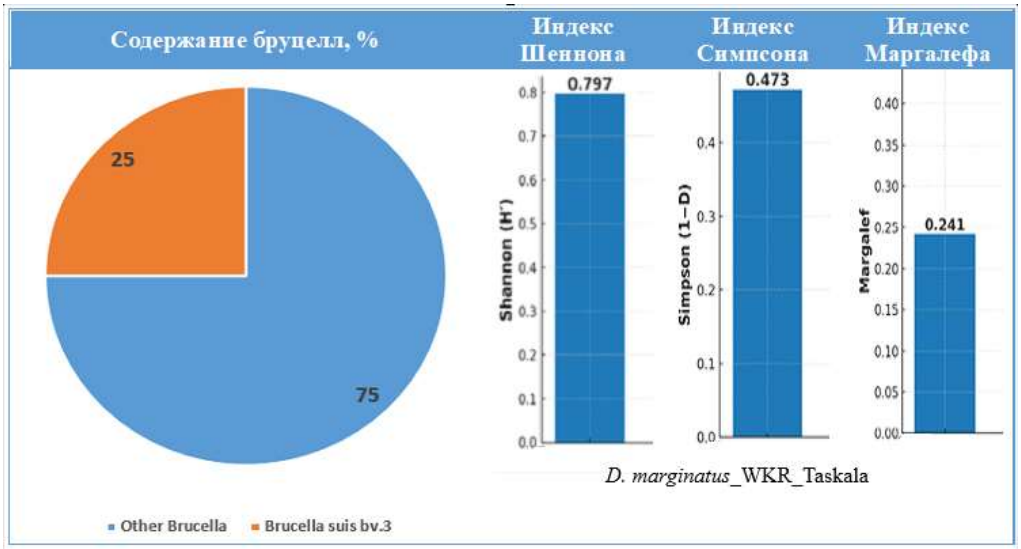


Рисунок 2 – Индексы альфа-разнообразия рода *Brucella* в образцах клещей *D. marginatus*_WKR_Taskala. Представлены значения индексов Шеннона, Симпсона и Маргалефа

Таксономический анализ ридов, полученных при метагеномном секвенировании образца клеща *D. marginatus*_WKR_Taskala, показал присутствие последовательностей, относящихся к роду *Brucella*. Всего идентифицировано 2966 ридов, классифицированных как *Brucella spp.*, и 1007 ридов, отнесённых к виду *Brucella suis* (биовар 3), что в сумме составило N=3973 рида и два

таксона (*Brucella spp.* и *B. suis*). Определены индексы альфа-разнообразия, рассчитанные на основе распределения *Brucella* (*Brucella spp., B. suis*). Результаты представлены на рисунке 2.

На основе ридов, классифицированных как *Brucella spp.* и *Brucella suis* были рассчитаны индексы альфа-разнообразия. В образце *D. marginatus*_WKR_Taskala (N=3973 рида) значения индексов составили: Шеннона = 0.797, Симпсона 1−D = 0.473, Маргалефа = 0.241. Результаты расчёта указывают на умеренную равномерность распределения ридов между выявленными таксонами при доминировании *Brucella spp.*

Обсуждение

Бруцеллез – одно из наиболее распространенных зоонозных инфекционных заболеваний животных. Это заболевание значительно снижает продуктивность животноводства, тем самым влияя на экономику страны. Научные исследования показывают, что ДНК *Brucella* была выявлена у некоторых видов клещей, включая: *Ixodes ricinus, Dermacentor marginatus, Hyalomma spp.*[3, 6, 16]. Однако наличие ДНК *Brucella* в клеще не доказывает, что клещ является полноценным переносчиком, способным передавать инфекцию человеку или животному при укусе.

В образце *D. marginatus*_WKR_Taskala основная доля представлена общими ридами рода *Brucella* (около 75%), тогда как *Brucella suis* составила лишь 25%. Это указывает на распределение *Brucella*, с доминированием неидентифицированных до уровня вида последовательностей.

Обнаружение *B. suis* (возбудителя свиного бруцеллёза) в клещах из ЗКО может быть связано с циркуляцией возбудителя среди диких кабанов и других животных, которые выступают хозяевами для *D. marginatus*. Дикие кабаны широко распространены по Казахстану, включая западные области; это соответствует мировой роли вида как основного природного резервуара для *B. suis*. Наличие устойчивых популяций кабана увеличивает вероятность контактов клещей с инфицированными хозяевами.

На северо-западном побережье Каспия, вдоль Урала и его низовьев, кабаны встречаются в пойменных лесах. Замечали их и у Уральска, а также в районе рек Доссор–Эмба между холмами и озёрами. В ЗКО и сопредельных регионах есть дикое кабанье поголовье, которое может служить природным резервуаром *B. suis*. *B. suis* – основной возбудитель свиного бруцеллёза у домашних и диких свиней, но в мировой литературе его находили и у несвинных хозяев (зайцы, олени, грызуны, собаки, крупный рогатый скот как случайные носители).

Поскольку клещи питаются на разных животных, обнаружение последовательностей *B. suis* может отражать эпизоотическую ситуацию в регионе. Однако, учитывая высокую генетическую близость внутри рода *Brucella*, данные метагеномики требуют подтверждения с помощью специфических методов. *B. suis* (в первую очередь биовары 1-3) обычно поражает домашних свиней, но дикие кабаны – основные природные резервуары, распространённые в Европе [17].

Серологические и бактериологические исследования, проведённые в странах Европы, показали высокую распространённость *B. suis* среди диких кабанов – иногда до ~50% или выше [18]. В одном из недавних исследований ДНК *Brucella* была обнаружена в клещах рода *Dermacentor*, паразитировавших на диких кабанах из охотничьих угодий, где эти животные были серопозитивны на *Brucella* [19]

Учитывая позитивность клещей на бруцеллез в данном исследовании, существует вероятность передачи бруцеллеза от инфицированных клещей человеку и животным через укусы клещей. Таким образом, борьба с клещами важна для предотвращения распространения бруцеллеза.

Выводы

Полученные данные указывают на возможное участие диких кабанов в циркуляции *Brucella* и подчеркивают необходимость дальнейших исследований с расширенной выборкой. Использование технологий метагеномного секвенирования позволило выявить наличие ДНК возбудителя в клещах *D. marginatus*, что подчеркивает роль этих членистоногих как источников инфекции.

В связи с недостаточной изученностью механизма передачи возбудителя через укусы клещей требуется проведение комплексных исследований, объединяющих эпидемиологические, молекулярно-генетические и экспериментальные подходы. Такой междисциплинарный подход позволит глубже понять роль клещей в эпизоотологии и эпидемиологии бруцеллеза.

Финансирование: Работа была выполнена в рамках ГФ AP19677632 «Метагеномика микробиома иксодовых клещей Казахстана» на 2023–2025гг.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Литература

1. Pal M., Kerorsa G.B, Desalegn C., Kandi V. Human and animal brucellosis: A comprehensive review of biology, pathogenesis, epidemiology, risk factors, clinical signs, laboratory diagnosis, public health significance, economic importance, prevention and control // J. Infect. Dis. – 2020. – Vol.8. – P.118-126
2. Islam M.S., Islam M.A., Rahman M.M., Islam K., Islam M.M., Kamal M.M., Islam M.N. Presence of Brucella spp in milk and dairy products: A comprehensive review and its perspectives // J. Food Qual. – 2023. – P.1-19
3. Moravedji M., Beig M., Baseri N., Rahravani M., Latifian M., Esmaeili S. Molecular detection of Brucella abortus and Brucella melitensis in domestic ruminants and their ticks in selected areas of western Iran // J Vet Res. – 2023. – Vol. 24(3). – P.270-275. doi: 10.22099/ijvr.2023.47192.6806
4. Li Y., Wen X., Li M., Moumouni P. F. A., Galon E. M., Guo Q., Rizk M. A., Liu M., Li J., Ji S., Tumwebaze M. A., Byamukama B., Chahan B., and Xuan X. Molecular detection of tick-borne pathogens harbored by ticks collected from livestock in the Xinjiang Uygur autonomous region. // Ticks and Tick-Borne Diseases. – 2020. – Vol. 11(5), https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101478
5. Zhang K., Li A., Wang Y., Zhang J., Chen Y., Wang H., Shi R., Qiu Y. Investigation of the presence of Ochrobactrum spp. and Brucella spp. in Haemaphysalis longicornis // Ticks and Tick-Borne Diseases. – 2021. – Vol. 12(1). https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101588
6. Zhao L., Ma Y. M., Yang B., Han W. X., Zhao W. H., Chai H. L., Zhang Z. S., Zhan Y. J., Wang L. F., Xing Y., Yu L. F., Wang J. L., Ding Y. L., and Liu Y. H. Comparative analysis of microbial communities in different growth stages of Dermacentor nuttalli // Frontiers in Veterinary Science. – 2022. – Vol. 9. https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1021426
7. Huang T., Zhang J., Sun C., Liu Z., He H., Wu J., Geriletu A novel arthropod host of brucellosis in the arid steppe ecosystem // Frontiers in Veterinary Science – 2020. –Vol.7. https://doi.org/10.3389/fvets.2020.566253
8. Nguyen H. M., Theppannga W., Vongphayloth K., Douangngeun B., Blacksell S. D., Robinson M. T., Screening of ectoparasites from domesticated dogs for bacterial pathogens in Vientiane // Zoonoses and Public Health. – 2020. – Vol. 67(8). – P. 862–868. https://doi.org/10.1111/zph.12753
9. Guo J., Song S., Cao S., Sun Z., Zhou Q., Deng X., Zhao T., Chai Y., Zhu D., Chen C., Baryshnikov P. I., Blair H. T., Wang Z., Wang Y., Zhang H. Molecular detection of zoonotic and veterinary pathogenic bacteria in pet dogs and their parasitizing ticks in Junggar Basin, north-western China // Frontiers in Veterinary Science. – 2022. – Vol. 9. https://doi.org/10.3389/fvets.2022.895140
10. Wang Q., Zhao S., Wureli H., Xie S., Chen C., Wei Q., Cui B., Tu C., and Wang Y., Brucella melitensis and B. abortus in eggs, larvae and engorged females of Dermacentor marginatus // Ticks and Tick-Borne Diseases. – 2018. – Vol. 9(4). – P. 1045-1048, https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.03.021
11. Sang C., Yang M., Xu B., Liu G., Yang Y., Kairullayev K., Bauyrzhan O., Hazihan W., Hornok S., Wang Y. Tick distribution and detection of Babesia and Theileria species in Eastern and Southern Kazakhstan // Ticks Tick-Borne Dis. – 2021. – Vol. 12. – P. 101817
12. Turebekov N., Abdiyeva K., Yegemberdiyeva R., Dmitrovsky A., Yeraliyeva L., Shapiyeva Z., Amirbekov A., Oradova A., Kachiyeva Z., Ziyadina L., Hoelscher M., Froeschl G., Dobler G., Zinner J., Frey S., Essbauer S. Prevalence of Rickettsia species in ticks including identification of unknown species in two regions in Kazakhstan // Parasit Vectors. – 2019. – Vol. 3(12). – P. 197. doi: 10.1186/s13071-019-3440-9
13. Орынбаев М.Б., Рыстаева Р.А., Омарова З.Д., Керимбаев А.А., Сарсенбаева Г.Ж., Копеев С.К., Наханов А.К., Строчков В.М., Султанкулова К.Т. Выделение Coxiella burnetii из клещей в Республике Казахстан// Биобезопасность и Биотехнология – 2020. – Т. 1. – С. 62-67
14. Thukral A. K., Bhardwaj R., Kumar V., Sharma A. New Indices Regarding the Dominance and Diversity of Communities, Derived From Sample Variance and Standard Deviation // Heliyon. – 2019. – Vol.5(10). doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02606
15. Margalef D.R. Information theory in ecology // General Systems – 1958. Vol.3. – P. 36-71
16. Abdoli R., Bakhshi, H., Kheirandish Sedigheh., Faghihi Faezeh., Hosseini-Chegeni Asadollah., Oshaghi M. A., Telmadarraiy Z., Sedaghat M. M. Circulation of Brucellaceae, Anaplasma and Ehrlichia spp. in borderline of Iran, Azerbaijan, and Armenia // Asian Pacific Journal of Tropical Medicine – 2021. – Vol. 14(5). – P. 223-230 doi: 10.4103/1995-7645.315893

17. Wu N., Abri C., Thomann A. et al. Risk factors for contacts between wild boar and outdoor pigs in Switzerland and investigations on potential Brucella suis spill-over. BMC // Vet Res. – 2012. – Vol. 8. https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-116

18. Pires H., Cardoso L., Lopes A.P., Fontes M.D.C., Santos-Silva S., Matos M., Pintado C., Roque N., Fonseca L.F., Morgado I. et al. Hunting for Answers: Assessing Brucella spp. Seroprevalence and Risks in Red Deer and Wild Boar in Central Portugal // Pathogens – 2024. – 13. 242. https://doi.org/10.3390/pathogens13030242

19. Rebollada-Merino A., Martínez I., Duque C. Detection of Brucella in Dermacentor Ticks of Wild Boar with Brucellosis // Transbound Emerg Dis. – 2024. – Vol.16. doi: 10.1155/2024/6618287

References

1. Pal M., Kerorsa G.B, Desalegn C., Kandi V. Human and animal brucellosis: A comprehensive review of biology, pathogenesis, epidemiology, risk factors, clinical signs, laboratory diagnosis, public health significance, economic importance, prevention and control // J. Infect. Dis. – 2020. – Vol.8. – P.118-126

2. Islam M.S., Islam M.A., Rahman M.M., Islam K., Islam M.M., Kamal M.M., Islam M.N. Presence of Brucella spp in milk and dairy products: A comprehensive review and its perspectives // J. Food Qual. – 2023. – P.1-19

3. Moravedji M., Beig M., Baseri N., Rahravani M., Latifian M., Esmaeili S. Molecular detection of Brucella abortus and Brucella melitensis in domestic ruminants and their ticks in selected areas of western Iran // J Vet Res. – 2023. – Vol. 24(3). – P.270-275. doi: 10.22099/ijvr.2023.47192.6806

4. Li Y., Wen X., Li M., Moumouni P. F. A., Galon E. M., Guo Q., Rizk M. A., Liu M., Li J., Ji S., Tumwebaze M. A., Byamukama B., Chahan B., and Xuan X. Molecular detection of tick-borne pathogens harbored by ticks collected from livestock in the Xinjiang Uygur autonomous region. // Ticks and Tick-Borne Diseases. – 2020. – Vol. 11(5), https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101478

5. Zhang K., Li A., Wang Y., Zhang J., Chen Y., Wang H., Shi R., Qiu Y. Investigation of the presence of Ochrobactrum spp. and Brucella spp. in Haemaphysalis longicornis // Ticks and Tick-Borne Diseases. – 2021. – Vol. 12(1). https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101588

6. Zhao L., Ma Y. M., Yang B., Han W. X., Zhao W. H., Chai H. L., Zhang Z. S., Zhan Y. J., Wang L. F., Xing Y., Yu L. F., Wang J. L., Ding Y. L., and Liu Y. H. Comparative analysis of microbial communities in different growth stages of Dermacentor nuttalli // Frontiers in Veterinary Science. – 2022. – Vol. 9. https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1021426

7. Huang T., Zhang J., Sun C., Liu Z., He H., Wu J., Geriletu A novel arthropod host of brucellosis in the arid steppe ecosystem // Frontiers in Veterinary Science – 2020. –Vol.7. https://doi.org/10.3389/fvets.2020.566253

8. Nguyen H. M., Theppannga W., Vongphayloth K., Douangngeun B., Blacksell S. D., Robinson M. T., Screening of ectoparasites from domesticated dogs for bacterial pathogens in Vientiane // Zoonoses and Public Health. – 2020. – Vol. 67(8). – P. 862–868. https://doi.org/10.1111/zph.12753

9. Guo J., Song S., Cao S., Sun Z., Zhou Q., Deng X., Zhao T., Chai Y., Zhu D., Chen C., Baryshnikov P. I., Blair H. T., Wang Z., Wang Y., Zhang H. Molecular detection of zoonotic and veterinary pathogenic bacteria in pet dogs and their parasitizing ticks in Junggar Basin, north-western China // Frontiers in Veterinary Science. – 2022. – Vol. 9. https://doi.org/10.3389/fvets.2022.895140

10. Wang Q., Zhao S., Wureli H., Xie S., Chen C., Wei Q., Cui B., Tu C., and Wang Y., Brucella melitensis and B. abortus in eggs, larvae and engorged females of Dermacentor marginatus // Ticks and Tick-Borne Diseases. – 2018. – Vol. 9(4). – P. 1045-1048, https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.03.021

11. Sang C., Yang M., Xu B., Liu G., Yang Y., Kairullayev K., Bauyrzhan O., Hazihan W., Hornok S., Wang Y. Tick distribution and detection of Babesia and Theileria species in Eastern and Southern Kazakhstan // Ticks Tick-Borne Dis. – 2021. – Vol. 12. – P. 101817

12. Turebekov N., Abdiyeva K., Yegemberdiyeva R., Dmitrovsky A., Yeraliyeva L., Shapiyeva Z., Amirbekov A., Oradova A., Kachiyeva Z., Ziyadina L., Hoelscher M., Froeschl G., Dobler G., Zinner J., Frey S., Essbauer S. Prevalence of Rickettsia species in ticks including identification of unknown species in two regions in Kazakhstan // Parasit Vectors. – 2019. – Vol. 3(12). – P. 197. doi: 10.1186/s13071-019-3440-9

13. Orynbaev M.B., Rystaeva R.A., Omarova Z.D., Kerimbaev A.A., Sarsenbaeva G.Zh., Kopeev S.K., Nahanov A.K., Strochkov V.M., Sultankulova K.T. Vydelenie Coxiella burnetii iz kleshchej v

Respublike Kazahstan// Biobezopasnost' i Biotekhnologiya – 2020. – T. 1. – S. 62-67
14. Thukral A. K., Bhardwaj R., Kumar V., Sharma A. New Indices Regarding the Dominance and Diversity of Communities, Derived From Sample Variance and Standard Deviation // Heliyon. – 2019. – Vol.5(10). doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02606
15. Margalef D.R. Information theory in ecology // General Systems – 1958. Vol.3. – P. 36-71
16. Abdoli R., Bakhshi, H., Kheirandish Sedigheh., Faghihi Faezeh., Hosseini-Chegeni Asadollah., Oshaghi M. A., Telmadarraiy Z., Sedaghat M. M. Circulation of Brucellaceae, Anaplasma and Ehrlichia spp. in borderline of Iran, Azerbaijan, and Armenia // Asian Pacific Journal of Tropical Medicine – 2021. – Vol. 14(5). – P. 223-230 doi: 10.4103/1995-7645.315893
17. Wu N., Abri C., Thomann A. et al. Risk factors for contacts between wild boar and outdoor pigs in Switzerland and investigations on potential Brucella suis spill-over. BMC // Vet Res. – 2012. – Vol. 8. https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-116
18. Pires H., Cardoso L., Lopes A.P., Fontes M.D.C., Santos-Silva S., Matos M., Pintado C., Roque N., Fonseca L.F., Morgado I. et al. Hunting for Answers: Assessing Brucella spp. Seroprevalence and Risks in Red Deer and Wild Boar in Central Portugal // Pathogens – 2024. – 13. 242. https://doi.org/10.3390/pathogens13030242
19. Rebollada-Merino A., Martínez I., Duque C. Detection of Brucella in Dermacentor Ticks of Wild Boar with Brucellosis // Transbound Emerg Dis. – 2024. – Vol.16. doi: 10.1155/2024/6618287

DERMACENTOR MARGINATUS КЕНЕЛЕРІНЕН БРУЦЕЛЛАНЫ АНЫҚТАУ

Шыныбекова Г. О., Алмежанова М. Д., Кожабергенов Н. С., Султанкулова К. Т.

«Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» ЖШС, «QazBioPharm» ұлттық холдингі, Гвардейский, Қазақстан Республикасы
*sh.gaukhar@biosafety.kz

Аннотация. Кенелер көптеген қоздырғыштардың тасымалдаушысы болып табылады және олардың бактериялық құрамы, саны, әртүрлілігі және өзара әрекеттесуі олардың өсуіне де, аурудың таралуына да әсер етеді. Жаңа метагеномикалық секвенирлеу (NGS) технологияларының пайда болуы микробтық патогендерді анықтау және сипаттау мүмкіндіктерін кеңейтті. Тізбектілік деректерін талдау арқылы кенелерде бруцелла ДНҚ бар екенін анықтауға және оның генетикалық сипаттамаларын анықтауға болады. Батыс Қазақстан облысының Тасқала ауданында 2023 жылдың көктемінде кене сынамалары алынды. Кене үлгілеріндегі бактериялардың 16S рРНҚ гендерінің секвенсы NGS технологиясы көмегімен Ion Torrent платформасы арқылы орындалды. *D. marginatus*_WKR_Taskala кене үлгілерінде метагеномикалық талдау *Brucella suis bv.* 3 (25%) және басқа *Brucella* түрлері (75%) анықталды. Кене үлгісінің метагеномдық реттілігі нәтижесінде алынған көрсеткіштерді талдау 3973 оқуды анықтады, оның 2966-сы *Brucella spp.* және 1007 жылы *Brucella suis bv. 3*. *D. marginatus*_WKR_Taskala үлгісі үшін альфа-әртүрлілік индексінің мәндері: Шеннон = 0,797, Симпсон 1−D = 0,473, Маргалеф = 0,241. Кенелер басқа буынаяқтылармен салыстырғанда үй және жабайы жануарлар арасында кең ауқымды аурулардың маңызды тасымалдаушысы болып танылады. Бруцеллездің таралуы мен кенелер арасындағы байланысқа арналған көптеген зерттеулерге қарамастан, бұл аурудың таралуындағы кенелердің нақты рөлі және онымен байланысты қауіптер әлі де аз зерттелген.

Негізгі сөздер: кене, *Dermacentor marginatus*, 16S рРНҚ, метагеномика, *Brucella*, альфа-әртүрлілігі

DETECTION OF BRUCELLA IN *DERMACENTOR MARGINATUS* TICKS

Shynybekova G. O., Almezhanova M. D., Kozhabergenov N. S., Sultankulova K. T.

LLP «Research Institute for Biological Safety Problems», National holding «QazBioPharm», Guardeyskiy, Republic of Kazakhstan
*sh.gaukhar@biosafety.kz

Abstract. Ticks are carriers of numerous pathogens, and their bacterial composition, abundance, diversity, and interaction affect both their growth and the efficiency of disease transmission. The emergence of next-generation metagenomic sequencing (NGS) technologies has expanded the possibilities for detecting and characterising microbial pathogens. Sequence data analysis can identify the presence of *Brucella* DNA in ticks and determine its genetic characteristics. In the spring of 2023, tick samples were collected in the Taskalinsky district of the West Kazakhstan Region. Sequencing of the 16S rRNA genes of bacteria in tick samples was performed using the Ion Torrent platform based on NGS technology.

In *D. marginatus*_WKR_Taskala tick samples, metagenomic analysis identified *Brucella suis bv. 3* (25%) and other *Brucella species* (75%). Analysis of the reads obtained as a result of metagenomic sequencing of the tick sample identified 3,973 reads, of which 2,966 were classified as *Brucella spp.* and 1,007 as *Brucella suis bv. 3*. The alpha diversity indices for the *D. marginatus*_WKR_Taskala sample were: Shannon = 0.797, Simpson 1−D = 0.473, Margalef = 0.241. Ticks are recognised as the main carriers of a wide range of diseases among domestic and wild animals compared to other arthropods. Despite numerous studies on the link between brucellosis transmission and ticks, the exact role of ticks in the transmission of this disease and the associated risks remain unclear.

Keywords: tick, *Dermacentor marginatus*, 16S rRNA, metagenomics, *Brucella*, alpha-diversity

МРНТИ 34.27.39

DOI: 10.58318/2957-5702-2025-23-22-28
Review Article

ANTIBODY RESPONSE TO *TRYPANOSOMA EVANSI* IN CAMELS OF KAZAKHSTAN

Zhadra Kudaibergenova [1,2], Zhandos Abay [1], Roza Aitlessova[1], Kuandyk Shynybayev [1], Markhabat Kassenov [1], Ainur Nurpeisova [1]

[1] Kazakh Scientific Research Veterinary Institute LLP, Almaty, Kazakhstan
[2] Kazakh National Agrarian Research University, Almaty, Kazakhstan
*abaizh097@mail.ru

Abstract. Surra, caused by *Trypanosoma evansi*, is a major constraint to camel health and productivity in arid and semi-arid regions. Despite Kazakhstan's large camel population, peer-reviewed data on surra epidemiology remain scarce.

A cross-sectional seroepidemiological survey was conducted in two camel-breeding regions of Kazakhstan (Mangystau and Kyzylorda) during 2024 and 2025. Serum samples (n = 2,745 in 2024; n = 2,900 in 2025) were tested for anti-*T. evansi* antibodies using the complement fixation test (CFT) and the formol gel test (FGT). Seroprevalence was expressed with 95% confidence intervals (CI), and regional/temporal differences were assessed using Pearson's chi-square test.

In Mangystau, CFT prevalence decreased from 5.0% (95% CI: 2.15–11.18) in 2024 to 0.78% (95% CI: 0.21–2.82) in 2025 (p = 0.0319), while FGT positivity declined from 65.0% to 5.88% (p < 0.001). Conversely, in Kyzylorda, CFT prevalence increased significantly from 4.0% (95% CI: 3.32–4.82) to 8.88% (95% CI: 7.87–10.01; p < 0.001), whereas FGT values rose slightly from 7.8% to 8.96% without statistical significance (p = 0.1504).

This study provides one of the first systematic multi-year assessments of *T. evansi* circulation in

camels in Kazakhstan, revealing contrasting regional dynamics, with a sharp decline in Mangystau and a significant increase in Kyzylorda. These findings underscore the heterogeneous nature of surra epidemiology and highlight the need for continued surveillance and combined diagnostic approaches to inform control strategies

Keywords: Camel (*Camelus dromedarius*), *Trypanosoma evansi*, Surra, Antibodies, Complement fixation test (CFT), Formol gel test (FGT), Seroepidemiology

Introduction

Camel husbandry plays an important role in the agricultural economy and traditional livelihoods of Kazakhstan, providing meat, milk, wool, and transport for pastoral communities. However, camel health and productivity are constrained by infectious diseases, particularly parasitic infections such as trypanosomosis. Surra, caused by *Trypanosoma evansi (T. evansi)*, is a chronic vector-borne disease affecting multiple domestic animal species, with camels serving as the principal hosts in many arid and semi-arid regions. The disease is associated with anemia, weight loss, reproductive disorders, and mortality, resulting in substantial economic losses in camel-breeding systems worldwide [1,2].

Trypanosoma evansi is transmitted mechanically by biting flies and is currently regarded as the most widely distributed pathogenic trypanosome. Its prevalence varies considerably depending on ecological conditions, host characteristics, and diagnostic methods, with serological surveys in camels frequently reporting seropositivity rates ranging from 10% to 30% [1,2,8]. In addition to its veterinary importance, sporadic cases of human infection have been reported, indicating zoonotic potential [9].

Despite the large camel population in Kazakhstan, data on the epidemiology of surra remain limited. Systematic peer-reviewed studies addressing the regional distribution and temporal dynamics of *T. evansi* infection in camels are scarce, which hampers accurate risk assessment and the development of effective surveillance and control strategies. Existing information is largely fragmentary and insufficient to characterize differences between regions with distinct ecological and management conditions.

Serological methods remain the most practical tools for large-scale surveillance of surra in camel populations, particularly in resource-limited settings. The complement fixation test and the formol gel test are widely used for epidemiological monitoring due to their technical simplicity and applicability under field conditions, although they differ in sensitivity and specificity [7,8].

The present study therefore aimed to investigate the seroprevalence of *T. evansi* antibodies in camels from different regions of Kazakhstan during 2024 and 2025, and to compare spatial and temporal patterns using complementary serological assays.

Materials and Methods

Study area and design: A cross-sectional seroepidemiological survey was conducted to investigate the prevalence of *T. evansi* infection in camels across major camel-breeding regions of Kazakhstan (Mangystau and Kyzylorda regions) during two consecutive years, 2024 and 2025. The study included administrative regions known for high camel population density, representing both desert and semi-desert ecological zones typical for camel husbandry. Sampling sites were selected in collaboration with regional veterinary services to ensure broad geographic coverage.

Sample collection: Whole blood samples were collected from camels by jugular venipuncture into plain vacutainer tubes. Animals older than one year and not subjected to anti-trypanosomal treatment in the last six months were included in the study. After collection, blood samples were allowed to clot at ambient temperature, and sera were separated by centrifugation at 1,500 × g for 10 min. The sera were transferred into cryovials and stored at –20 °C until further testing.

Serological testing: Serological detection of antibodies against *T. evansi* was performed using the complement fixation test (CFT) and the formol gel test (FGT), following protocols recommended by the World Organisation for Animal Health (WOAH) [10]. Antigen preparations and positive/negative control sera were included in each batch to ensure assay validity.

In the CFT, results were expressed according to the degree of hemolysis inhibition (0–4+ scale), with titres ≥1:5 considered positive [11].

The FGT was used as a screening tool, with visible gel formation within 30 minutes considered a positive reaction.

Statistical analysis: Seroprevalence was calculated as the proportion of antibody-positive samples among the total number tested, with 95% confidence intervals (CI) estimated using the Wilson score method. Differences in prevalence between years (2024 vs. 2025) and between regions (Mangystau and Kyzylorda) were assessed using Pearson's chi-square test (χ^2). The strength of association between categorical

variables (year, region) and seropositivity was evaluated by calculating Cramér's V coefficient. Statistical significance was defined as $p < 0.05$. Data were processed using Microsoft Excel 2021 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA).

Ethics statement: All sampling procedures were carried out by trained veterinarians in accordance with national animal welfare regulations. The study protocol was reviewed and approved by the Biological Ethics Committee of the Kazakh Scientific Research Veterinary Institute (Approval No. 1, dated 14 July 2023).

Results

A total of 2,745 camel serum samples were analyzed in 2024 and 2,900 in 2025 from two major camel-rearing regions of Kazakhstan (Mangystau and Kyzylorda). Serological testing using the complement fixation test (CFT) and the formol gel test (FGT) revealed clear spatial and temporal variations in *T. evansi* seroprevalence (Table 1).

Table 1 – Seroprevalence of T. evansi in camels by region and year (CFT and FGT assays, 2024–2025)

Year	Region	Number tested (N)	CFT-positive (n, %) [95% CI]	FGT-positive (n, %) [95% CI]
2024	Mangystau	100	5 (5.0%) [2.15–11.18]	65 (65.0%) [55.25–73.64]
	Kyzylorda	2,645	106 (4.0%) [3.32–4.82]	207 (7.8%) [6.86–8.91]
2025	Mangystau	255	2 (0.78%) [0.21–2.82]	15 (5.88%) [3.58–9.53]
	Kyzylorda	2,645	235 (8.88%) [7.87–10.01]	237 (8.96%) [7.92–10.13]

Note: FGT, Formol gel test; CFT, Complement fixation test.

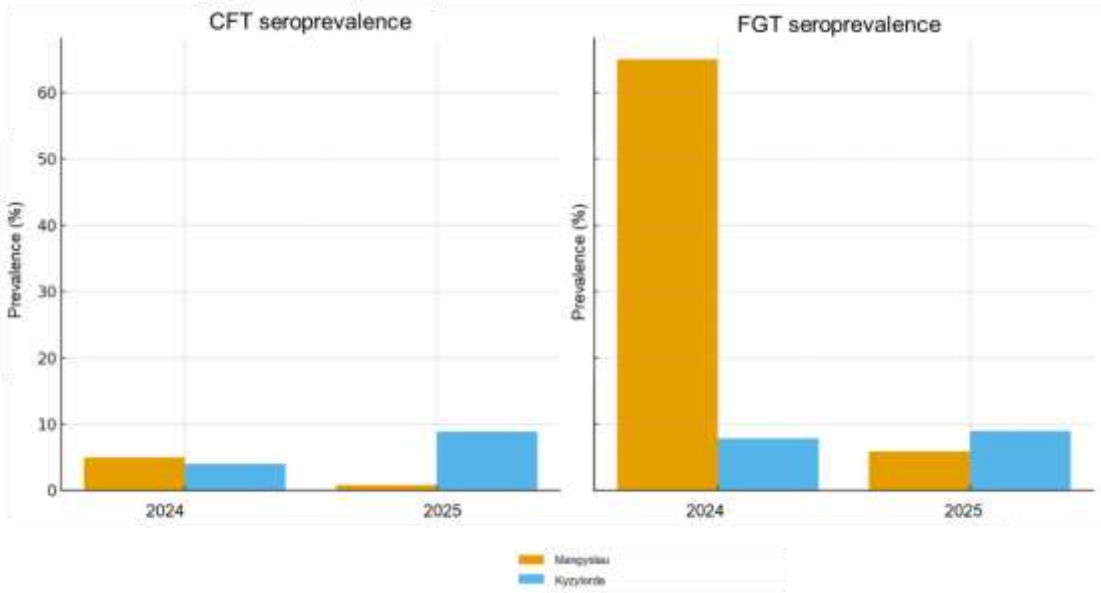


Figure 1 – Seroprevalence of Trypanosoma evansi in camels from Mangystau and Kyzylorda regions of Kazakhstan in 2024 and 2025 as determined by complement fixation test (CFT, left) and formol gel test (FGT, right)

In Mangystau Region, the CFT detected antibodies in 5.0% of camels (95% CI: 2.15–11.18) in 2024, which significantly decreased to 0.78% (95% CI: 0.21–2.82) in 2025 ($\chi^2 = 4.60$, $p = 0.0319$). Similarly, FGT results showed a dramatic decline from 65.0% (95% CI: 55.25–73.64) in 2024 to only 5.88% (95% CI: 3.58–9.53) in 2025 ($\chi^2 = 140.44$, $p < 0.001$). These results indicate a sharp reduction in *T. evansi* seropositivity within the region over one year.

In Kyzylorda Region, the CFT revealed 4.0% seropositivity (95% CI: 3.32–4.82) in 2024, which significantly increased to 8.88% (95% CI: 7.87–10.01) in 2025 ($\chi^2 = 51.36$, $p < 0.001$). In contrast, the FGT

results showed a slight increase from 7.8% (95% CI: 6.86–8.91) to 8.96% (95% CI: 7.92–10.13) across the same period; however, this difference was not statistically significant ($\chi^2 = 2.07$, $p = 0.1504$).

Overall, the findings suggest divergent regional dynamics, with a pronounced decline in both CFT and FGT seroprevalence in Mangystau and a significant increase in CFT-detected seropositivity in Kyzylorda, as shown in Figure 1.

Discussion

The present study provides new insights into the seroepidemiology of camel trypanosomosis caused by *Trypanosoma evansi (T. evansi)* in Kazakhstan and demonstrates pronounced spatial and temporal differences between the Mangystau and Kyzylorda regions during 2024–2025. The most notable finding is the sharp decline in seroprevalence in Mangystau contrasted with a significant increase in Kyzylorda, particularly when assessed by the complement fixation test (CFT).

Several factors may explain the observed decrease in seropositivity in Mangystau. This region is characterized by an arid climate, sparse vegetation, and relatively low density of hematophagous flies, which may limit the mechanical transmission of *T. evansi* [1]. In addition, local veterinary practices, including targeted treatment of clinically suspected animals, could have contributed to a reduction in infection pressure at the population level. Although detailed data on preventive and therapeutic measures were not available for the present study, similar declines in seroprevalence following control interventions have been reported in camel populations from other endemic regions [3,4].

A particularly pronounced reduction was observed in formol gel test (FGT) positivity in Mangystau. This finding requires cautious interpretation, as the FGT is known to be a highly sensitive but poorly specific assay. The FGT may detect residual antibodies persisting after previous exposure or treatment, as well as nonspecific serum protein changes [5]. Consequently, a marked decrease in FGT positivity may reflect not only a true reduction in transmission but also changes in antigenic stimulation or improvements in herd health status. In contrast, the CFT is considered more specific and is more likely to reflect sustained or recent immune responses. The parallel decline in both tests therefore supports the hypothesis of reduced circulation of *T. evansi* in this region.

In Kyzylorda, the increase in CFT seroprevalence suggests ongoing or intensified circulation of the parasite. This region hosts one of the largest camel populations in Kazakhstan and is characterized by frequent herd movements, shared grazing areas, and proximity to riverine and irrigated zones that may favor vector activity. The lack of a statistically significant increase in FGT positivity, despite a clear rise in CFT values, further highlights the differing diagnostic characteristics of the two assays and suggests that CFT may be more informative for detecting changes in active transmission dynamics.

The discrepancy between CFT and FGT results observed in this study is consistent with previous reports. The FGT tends to overestimate seroprevalence due to its susceptibility to cross reactions and persistence of antibodies following past infections or treatment. Conversely, the CFT, while less sensitive, offers higher specificity and is therefore better suited for confirmation of seropositive cases [6,7]. Differences in sample quality and handling may also contribute to variability between tests. Factors such as storage conditions, repeated freeze thaw cycles, and delays between blood collection and serum separation may disproportionately affect FGT results compared with CFT [8,9].

Another important consideration is the widespread use of trypanocidal drugs in camel herds. Chemotherapeutic treatment can reduce parasitemia and clinical signs while antibodies remain detectable for prolonged periods. This situation complicates the interpretation of serological data and may partly explain discordant test results, particularly in endemic areas where repeated exposure and treatment are common.

Taken together, these findings indicate that sharp differences between CFT and FGT results should not be interpreted as methodological inconsistencies but rather as a reflection of the distinct diagnostic properties of the tests and the complex epidemiology of surra. The combined use of both assays provides a more comprehensive picture of population exposure and immune status than either test alone.

Future studies should incorporate molecular diagnostic approaches, such as PCR based detection of *T. evansi* DNA, to confirm active infections and to distinguish between current and past exposure. In addition, entomological investigations and longitudinal sampling across different seasons would improve understanding of transmission dynamics and the role of vectors in different ecological settings. Such integrated approaches are essential for refining surveillance strategies and improving control of camel trypanosomosis in Kazakhstan.

Conclusion

This study provides the first multi-year seroepidemiological data on *Trypanosoma evansi* infection in camels in Kazakhstan. The results revealed contrasting dynamics between regions, with a marked decline in seroprevalence in Mangystau and a significant increase in Kyzylorda. These findings highlight the heterogeneous nature of surra circulation and underline the need for continuous surveillance, combined diagnostic approaches, and region-specific control strategies to protect camel health and productivity.

Funding: This work was supported by the Science and Technology Program (IRN BR218004/0223) of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1 Aregawi, W. G., Agga, G. E., Abdi, R. D., & Buscher, P. (2019). Systematic review and meta-analysis on the global distribution, host range, and prevalence of Trypanosoma evansi. Parasites & Vectors, 12, 67. https://doi.org/10.1186/s13071-019-3311-4

2 Selim, A., Abdelhady, A., Almohammed, H. I., et al. (2022). Seroprevalence, risk factors, and hematobiochemical changes associated with Trypanosoma evansi infection in dromedary camels. Animals, 12(18), 2401. https://doi.org/10.3390/ani12182401

3 Evans, G. (1880). On a new blood parasite found in camels: Trypanosoma evansi. Veterinary Journal, 11, 187–188.

4 Sazmand, A., & Joachim, A. (2017). Parasitic diseases of camels in Iran (1931–2017): A literature review. Parasite, 24, 21. https://doi.org/10.1051/parasite/2017024

5 Anonymous. (1935). Dr. Griffith Evans's hundredth birthday. Canadian Medical Association Journal, 33(4), 430–431.

6 Desquesnes, M., Bossard, G., Thévenon, S., Patrel, D., Ravel, S., Pavlovic, D., et al. (2009). Development and application of an antibody-ELISA to follow up a Trypanosoma evansi outbreak in a dromedary camel herd in France. Veterinary Parasitology, 162(3–4), 214–220. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.02.007

7 Hoare, C. A. (1972). The Trypanosomes of Mammals: A Zoological Monograph. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

8 Desquesnes, M., Holzmuller, P., Lai, D. H., Dargantes, A., Lun, Z. R., & Jittaplapong, S. (2013). Trypanosoma evansi and surra: A review and perspectives on transmission, epidemiology and control. Parasitology, 140(6), 692–714. https://doi.org/10.1017/S0031182012002276

9 Joshi, P. P., Shegokar, V. R., Powar, R. M., et al. (2005). Human Trypanosoma evansi infection in India. New England Journal of Medicine, 352(13), 1305–1306. https://doi.org/10.1056/NEJMoa042324

10 World Organisation for Animal Health (WOAH). (2021). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter: Trypanosomosis (T. evansi). https://www.woah.org

11 Hébert, L., Froger, D., Madeline, A., Lecouturier, F., Lemans, C., Zientara, S., 2023. European inter-laboratory profi-ciency test for dourine antibody detection using the complement fixation test. Vet. Sci. 10, 592.

ҚАЗАҚСТАНДАҒЫ ТҮЙЕЛЕРДЕ *TRYPANOSOMA EVANSI*-ГЕ ҚАРСЫ АНТИДЕНЕЛІК ЖАУАП

Құдайбергенова Ж.[1,2], Абай Ж.[1], Айтлесова Р[1]., Шыныбаев Қ.[1], Қасенов М.[1], Нурпейсова А.[1]

[1] «Қазақ ветеринария ғылыми-зерттеу институты» ЖШС, Алматы, Қазақстан
[2] Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті, Алматы, Қазақстан
*abaizh097@mail.ru

Аннотация. *Trypanosoma evansi* қоздыратын су-ауру ауруы шөлейт және жартылай шөлейт аймақтарда түйелердің денсаулығы мен өнімділігіне елеулі зиян келтіретін негізгі факторлардың бірі болып табылады. Қазақстанда түйе санының көп болуына қарамастан, су-ауру эпидемиологиясы бойынша рецензияланатын ғылыми деректер шектеулі.

2024 – 2025 жылдары Қазақстанның түйе шаруашылығы дамыған екі өңірінде – Маңғыстау және Қызылорда облыстарында – көлденең сероэпидемиологиялық зерттеу жүргізілді. Қан сарысуының үлгілері (2024 ж. – n = 2 745; 2025 ж. – n = 2 900) *T. evansi*-ге қарсы антиденелердің болуына комплементті байланыстыру реакциясы (КБР) және формол-гель сынамасы (ФГС) әдістері арқылы зерттелді. Серопревалеттілік 95% интервалдарымен (СИ) есептелді, ал аймақтық және уақытша айырмашылықтар Пирсонның χ^2 критерийі арқылы бағаланды.

Маңғыстау облысында КБР бойынша серопревалеттілік 2024 жылы 5,0% (95% СИ: 2,15 - 11,18) көрсеткішінен 2025 жылы 0,78%-ға (95% СИ: 0,21-2,82) дейін төмендеді ($p = 0,0319$), ал ФГС бойынша оң нәтижелердің үлесі 65,0%-дан 5,88%-ға дейін азайды ($p < 0,001$). Керісінше, Қызылорда облысында КБР бойынша серопревалеттілік 4,0%-дан (95% СИ: 3,32 - 4,82) 8,88%-ға дейін (95% СИ: 7,87-10,01) сенімді түрде артты ($p < 0,001$), ал ФГС көрсеткіштері 7,8%-дан 8,96%-ға дейін шамалы өсіп, статистикалық тұрғыдан мәнді болмады ($p = 0,1504$).

Бұл зерттеу Қазақстандағы түйелер арасында *T. evansi* айналымына жүргізілген алғашқы жүйелі көпжылдық бағалаулардың бірі болып табылады және өңірлік деңгейде қарама-қайшы динамиканы – Маңғыстау облысында айқын төмендеуді және Қызылорда облысында елеулі өсуді – анықтайды. Алынған нәтижелер су-аурудың эпидемиологиясының гетерогенді сипатын көрсетіп, ауруды бақылау стратегияларын жетілдіру үшін тұрақты эпидемиологиялық мониторинг пен біріктірілген диагностикалық тәсілдерді қолдану қажеттігін негіздейді.

Түйін сөздер: түйе (*Camelus dromedarius*), *Trypanosoma evansi*, су-ауру, антиденелер, комплементті байланыстыру реакциясы (КБР), формол-гель сынамасы (ФГС), сероэпидемиология.

АНТИТЕЛЬНЫЙ ОТВЕТ НА *TRYPANOSOMA EVANSI* У ВЕРБЛЮДОВ КАЗАХСТАНА

Кудайбергенова Ж.[1,2], Абай Ж.[1]., Айтлесова Р[1]., Шыныбаев К.[1], Касенов М.[1], Нурпейсова А.[1].

[1] ТОО «Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт», Алматы, Казахстан
[2] Казахский национальный аграрный исследовательский университет, Алматы, Казахстан
*abaizh097@mail.ru

Аннотация. Болезнь су-ауру, вызываемая *Trypanosoma evansi*, является одним из основных ограничивающих факторов, влияющих на здоровье и продуктивность верблюдов в аридных и полуаридных регионах. Несмотря на значительную численность верблюдов в Казахстане, данные рецензируемых исследований по эпидемиологии су-ауру остаются ограниченными.

В 2024-2025 гг. было проведено поперечное сероэпидемиологическое исследование в двух верблюдоводческих регионах Казахстана – Мангистауской и Кызылординской областях. Образцы сыворотки крови (n = 2 745 в 2024 г.; n = 2 900 в 2025 г.) были исследованы на наличие антител к *T. evansi* с использованием реакции связывания комплемента (РСК) и формол-гель теста (ФГП). Серопревалентность рассчитывали с 95%-ными доверительными интервалами (ДИ), а региональные и временные различия оценивали с применением критерия χ^2 Пирсона.

В Мангистауской области распространённость по РСК снизилась с 5,0% (95% ДИ: 2,15-11,18) в 2024 г. до 0,78% (95% ДИ: 0,21-2,82) в 2025 г. ($p = 0,0319$), при этом доля положительных результатов ФГП сократилась с 65,0% до 5,88% ($p < 0,001$). Напротив, в Кызылординской области распространённость по РСК достоверно возросла с 4,0% (95% ДИ: 3,32-4,82) до 8,88% (95% ДИ: 7,87-10,01; $p < 0,001$), тогда как показатели ФГП увеличились незначительно – с 7,8% до 8,96% и не достигли статистической значимости ($p = 0,1504$).

Настоящее исследование представляет собой одну из первых систематических многолетних оценок циркуляции *T. evansi* среди верблюдов в Казахстане и выявляет контрастную региональную динамику, характеризующуюся резким снижением показателей в Мангистауской области и их значительным ростом в Кызылординской области. Полученные данные подчёркивают гетерогенный характер эпидемиологии су-ауру и указывают на необходимость продолжения эпидемиологического надзора и применения комбинированных диагностических подходов для разработки эффективных мер контроля.

Ключевые слова: верблюд (*Camelus dromedarius*), *Trypanosoma evansi*, сурра, антитела, реакция связывания комплемента (РСК), формол-гелевая проба (ФГП), сероэпидемиология.

МРНТИ:76.31.31 DOI: 10.58318/2957-5702-2025-23-28-49
Оригинальная статья

РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ МАЗИ НА ОСНОВЕ ГУСТОГО ЭКСТРАКТА ЛАБАЗНИКА ОБЫКНОВЕННОГО (*FILIPENDULA VULGARIS M.)*

Назаров С. Г., Жанабайкызы С.

Казахский национальный медицинский университет имени С.Д. Асфендиярова,
г. Алматы,. Казахстан
*nazarov.s@kaznmu.kz

Аннотация. Проведена фармацевтическая разработка мази на основе густого экстракта лабазника обыкновенного (*Filipendula vulgaris M.),* полученного методом ультразвуковой экстракции. Использование ультразвукового воздействия позволило повысить эффективность извлечения биологически активных веществ, уменьшить время экстрагирования и сохранить термолабильные компоненты растительного сырья.

Химический состав густого экстракта изучен методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ/МС). В результате анализа установлено наличие комплекса соединений фенольной природы, флавоноидов, органических кислот, эфиров и других вторичных метаболитов, обладающих выраженной антиоксидантной и противовоспалительной активностью. Полученные данные подтверждают фармакологическую значимость экстракта и целесообразность его применения в качестве действующего ингредиента при создании мягких лекарственных форм.

На основе исследованного экстракта разработано пять модельных составов мази, отличающихся соотношением компонентов основы и концентрацией активного вещества. Для каждой модели проведена оценка физико-химических, органолептических и реологических характеристик. Определены такие показатели, как консистенция, устойчивость к расслаиванию, pH, вязкость, а также равномерность распределения экстракта в мазевой массе. На основании совокупности полученных данных выделен оптимальный состав, обеспечивающий стабильность структуры и фармакотехнологические свойства, соответствующие требованиям к мягким лекарственным формам.

Проведены токсикологические исследования и фармакологические испытания разработанных образцов. Установлено отсутствие признаков острой токсичности и раздражающего действия при наружном применении. Экспериментальная оценка противовоспалительной активности выявила достоверное снижение воспалительных реакций, что свидетельствует о выраженном терапевтическом потенциале разработанной мази.

Таким образом, результаты исследования подтверждают, что густой экстракт *Filipendula vulgaris* М. является перспективным растительным источником биологически активных веществ для создания мягких лекарственных форм с противовоспалительным действием. Разработанная мазевая композиция отличается стабильностью, безопасностью и фармакологической эффективностью, что позволяет рассматривать её как основу для дальнейших доклинических и технологических исследований с целью внедрения в фармацевтическую практику.

Ключевые слова: Лабазник обыкновенный, *Filipendula vulgaris* М., ультразвуковая экстракция, густой экстракт, мазь, фармацевтическая разработка, противовоспалительная активность, токсикологическая оценка.

Введение

Современное развитие фармацевтической науки направлено на поиск и внедрение эффективных, безопасных и доступных лекарственных средств, в частности препаратов растительного происхождения. Это соответствует приоритетам Целей устойчивого развития ООН, в том числе ЦУР 3 «Хорошее здоровье и благополучие» и ЦУР 12 «Ответственное потребление и производство». Одним из приоритетных направлений является создание мягких лекарственных

форм для наружного применения, которые обеспечивают пролонгированное действие, контролируемое высвобождение активных веществ и высокую биодоступность при минимальных побочных эффектах, что в целом повышает качество и безопасность фармакотерапии.

Воспалительные заболевания кожи и мягких тканей занимают одно из ведущих мест в структуре дерматологической и терапевтической патологии, существенно влияя на уровень здоровья населения и качество жизни пациентов. К ним относятся дерматиты, экземы, фурункулёзы, ожоги, раневые процессы и другие состояния, сопровождающиеся нарушением целостности кожного покрова и воспалительной реакцией. Широко применяемые синтетические противовоспалительные и антисептические средства нередко вызывают аллергические реакции, фотосенсибилизацию и иные нежелательные явления, что ограничивает возможность их длительного применения и противоречит принципам безопасной и устойчивой фармакотерапии.

В связи с этим возрастает интерес к фитопрепаратам, которые обладают мягким действием и комплексной биологической активностью, а также производятся из возобновляемого растительного сырья. Разработка и внедрение подобных лекарственных средств способствуют расширению ассортимента доступных и экологически ориентированных препаратов, рациональному использованию природных ресурсов и решению задач устойчивого развития в сфере здравоохранения и фармацевтики.

Особое внимание исследователей привлекают лекарственные растения, богатые фенольными соединениями, флавоноидами и эфирными компонентами, проявляющими противовоспалительные, антимикробные и репаративные свойства. Среди них выделяется лабазник обыкновенный (*Filipendula vulgaris* М.), представитель семейства Rosaceae, обладающий широким спектром биологической активности. Растение содержит флавоноиды (кверцетин, рутин, гиперозид), фенольные кислоты, дубильные вещества, а также эфирные масла, которые обусловливают его антиоксидантное, капилляроукрепляющее, вяжущее и противовоспалительное действие. [1-3].

Несмотря на известную фармакологическую ценность *Filipendula vulgaris* М., отечественные исследования, направленные на получение густых экстрактов и разработку на их основе мягких лекарственных форм, ограничены. Современные технологии, в частности ультразвуковая экстракция, позволяют значительно повысить эффективность извлечения действующих веществ, сократить время экстрагирования и сохранить активные компоненты без их термической деградации [3-6]. Это открывает возможности для создания стабильных, эффективных и стандартизованных фитопрепаратов наружного применения.

Таким образом, разработка мази на основе густого экстракта *Filipendula vulgaris* М., изучение её физико-химических и фармакологических свойств представляют собой актуальную научно-практическую задачу. Полученные результаты могут внести вклад в расширение ассортимента отечественных фитопрепаратов противовоспалительного действия, обладающих высокой эффективностью и безопасностью, а также в развитие фармацевтической технологии лекарственных форм растительного происхождения [7,8,9].

Цель исследования: Разработка мази на основе густого экстракта лабазника обыкновенного (*Filipendula vulgaris* М.) и изучение её физико-химических, токсикологических и фармакологических характеристик с целью обоснования перспективности применения в качестве мягкой лекарственной формы наружного действия с противовоспалительной активностью.

Задачи исследования:

– Получить густой экстракт *Filipendula vulgaris* М. методом ультразвуковой экстракции с оптимизацией параметров процесса для максимального извлечения биологически активных соединений.

– Исследовать химический состав полученного экстракта методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ/МС) с целью идентификации групп соединений, определяющих фармакологическую активность.

– Разработать несколько модельных составов мази, различающихся по соотношению компонентов основы и концентрации экстракта, с последующим выбором оптимального варианта.

– Провести оценку физико-химических, органолептических и реологических свойств модельных образцов мази, определить однородность полученной лекарственной формы.

– Выполнить токсикологическую оценку для установления безопасности при наружном применении.

– Изучить противовоспалительную активность мази в экспериментальных условиях и сопоставить результаты с препаратами сравнения.

Материалы и методы

Объект исследования - надземное сырьё лабазника обыкновенного (*Filipendula vulgaris* М.) - трава, собранная в фазу цветения на территории Восточно-Казахстанской области.

Спецификация качества густого экстракта и мази на основе лабазника обыкновенного (*Filipendula vulgaris* М.) разработана и проанализирована в соответствии со стандартными методами, приведёнными в статье Государственной фармакопеи Республики Казахстан «Экстракты», а также с учётом требований приказа Министерства здравоохранения Республики Казахстан № 20 от 16 февраля 2021 года «Об утверждении правил разработки производителем лекарственных средств и согласования государственной экспертной организацией нормативного документа по качеству лекарственных средств при проведении их экспертизы».

Разработка и валидация методик контроля качества проводились на базе Научно-исследовательского института фундаментальной и прикладной медицины имени Б. Атчабарова (НИИ ФПМ им. Б. Атчабарова), оснащённого современным аналитическим оборудованием, что обеспечило высокую точность и воспроизводимость полученных данных.

При формировании спецификации особое внимание уделялось комплексной оценке показателей качества, включающих идентификацию, подлинность, содержание влаги, массовую долю сухого остатка, показатель pH, микробиологическую чистоту, а также количественное определение биологически активных веществ. Для мазевой формы дополнительно оценивались однородность консистенции, стабильность при хранении, вязкость и совместимость компонентов основы с экстрактом.

Все испытания проводились с использованием стандартизированных фармакопейных методик, соответствующих современным требованиям к качеству растительного лекарственного сырья и мягких лекарственных форм. Полученные результаты подтвердили соответствие исследуемых образцов установленным нормативным параметрам, что свидетельствует о высоком уровне стандартизации, стабильности и фармацевтической надёжности как густого экстракта, так и разработанной мазевой композиции.

Результаты и обсуждение

Для получения густого экстракта использовалось высушенное и измельчённое растительное сырьё - надземная часть лабазника обыкновенного (*Filipendula vulgaris* М.), собранного в фазе цветения. Исходное сырьё характеризуется высоким содержанием фенольных соединений, флавоноидов, дубильных веществ и салицилатов, определяющих его фармакологическую активность[9-11].

Методологический подход и статистическая оптимизация.

Для оптимизации параметров ультразвуковой экстракции применялся метод факторного варьирования с последующей статистической обработкой данных по критерию достоверности различий. В качестве оптимизационного показателя использовалось суммарное содержание фенольных соединений, определяемое спектрофотометрически по реакции с реагентом Фолина-Чокальтеу при $\lambda = 760$ нм, в пересчёте на галловую кислоту (мг/г сухого экстракта).

Экспериментальные данные показали, что наибольшее влияние на эффективность извлечения фенольных соединений оказывают: температура процесса, время ультразвукового воздействия, частота ультразвука, соотношение сырья и экстрагента.

Таблица 1 – Оптимизации параметров ультразвуковой экстракции

№	Температура, °С	Время, мин	Частота, кГц	Соотношение «сырьё:экстрагент»	Содержание фенольных соединений, мг/г
1	25	20	25	1:8	21.2 ± 1.3
2	35	30	30	1:10	38.6 ± 1.1
3	40	30	35	1:10	58.8 ± 1.5
4	50	40	40	1:12	52.7 ± 1.2
5	60	45	40	1:10	39.3 ± 1.6

Как видно из таблицы, наибольшее содержание фенольных соединений наблюдалось при температуре 40 °C, времени ультразвукового воздействия 30 минут, частоте 35 кГц и соотношении «сырьё:экстрагент» 1:10. Эти параметры были приняты в качестве оптимальных условий экстракции (Таблица 1).

При данных параметрах достигается максимальный выход фенольных соединений (58.8±1.5 мг/г), что на 15–20% выше по сравнению с традиционными методами мацерации и перколяции. Повышение эффективности объясняется кавитационным эффектом ультразвуковых волн, способствующим разрушению клеточных стенок и более полному переходу действующих веществ в экстрагент.

Проведённая оптимизация позволила научно обосновать выбор условий ультразвуковой экстракции, обеспечивающих высокий выход фенольных соединений при сохранении их структурной стабильности, что имеет ключевое значение.

На основании статистической оптимизации параметров ультразвуковой экстракции установлено, что максимальное извлечение фенольных соединений достигается при температуре 40 °C, концентрации этанола 70 %, соотношении сырьё - экстрагент 1:10 и времени обработки 30 минут.

Растительное сырьё *Filipendula vulgaris* M. измельчали до размера частиц 1-3 мм и экстрагировали при указанных условиях с использованием ультразвуковой ванны (40 кГц, 150 Вт/л). Полученные экстракты после трёх последовательных циклов экстрагирования объединяли и упаривали на ротационном испарителе при температуре не выше 50 °C до содержания сухого остатка 42 % (Рисунок 1).



а) в)

Рисунок 1 –Ультразвуковая ванна (а), ротационный испаритель (в)

В результате получен густой экстракт тёмно-коричневого цвета с характерным запахом, без признаков расслоения, со стабильными физико-химическими параметрами и высоким содержанием фенольных соединений (58.8±1.5 мг/г пересчёте на галловую кислоту).

Хромато-масс-спектрометрическое исследование экстракта

Компонентный состав густого экстракта, полученного из растительного сырья *Filipendula vulgaris* M., был исследован методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ/МС) на приборе Agilent 7890N/5975N. Метод основан на последовательном разделении летучих компонентов при их прохождении через хроматографическую колонку и последующем определении их масс-спектров с помощью детектора.

Хроматографирование проводилось с использованием капиллярной колонки DB-35MS длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной плёнки 0,25 мкм. Газ-носитель - гелий со скоростью потока 1 мл/мин. Введение пробы осуществлялось в режиме без деления потока, объём инжектируемого образца - 2,0 мкл, температура инжектора - 240 °C.

Температурная программа хроматографа включала нагрев от 40 °C (удержание 0 мин) до 150 °C со скоростью 10 °C/мин (удержание 1 мин), затем до 240 °C со скоростью 5 °C/мин с удержанием 30 мин. Детектирование проводилось в режиме SCAN при диапазоне масс-зарядов m/z 34 - 850.

Для регистрации, обработки и интерпретации хроматографических данных использовалось

программное обеспечение Agilent MSD ChemStation (версия 1701EA). Идентификация соединений осуществлялась путём сопоставления полученных масс-спектров с библиотеками Wiley 7th Edition и NIST'02, содержащими более 550 000 спектров эталонных соединений.

Метод ГХ/МС позволил получить детализированный профиль летучих и полулетучих компонентов экстракта, что обеспечило качественную характеристику химического состава и последующую оценку его фармакологической значимости.

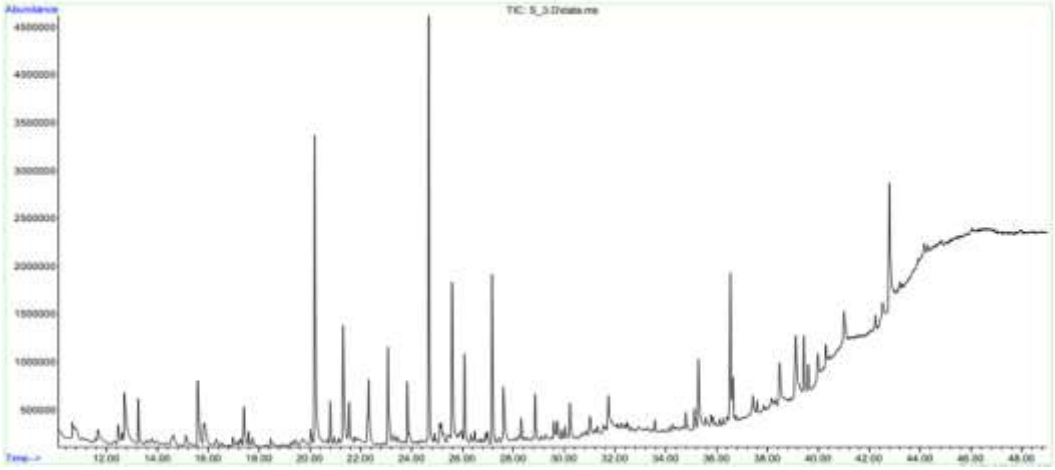


Рисунок 2 – Хроматограмма экстракта *Filipendula vulgaris* M., полученного методом ультразвуковой экстракции (ГХ/МС-анализ, Agilent 7890N/5975N)

Таблица 2 – Результаты анализа компонентного состава густого экстракта *Filipendula vulgaris* M. методом ГХ/МС

№	Время удерживания, мин	Идентифицированное соединение	Вероятность совпадения, %	Содержание, %
1	20,19	Фенол	96	10,65
2	13,25	2-Фуранметанол	93	1,27
3	15,59	1,2-Циклопентандион	92	2,72
4	24,68	2,3-Дигидро-3,5-дигидрокси-6-метил-4H-пиран-4-он	91	10,50
5	25,60	Глицерин	91	5,55
6	17,40	2-Метоксифенол	91	1,41
7	28,86	5-Гидроксиметилфурфурол	90	1,39
8	12,46	4-Гидроксибутановая кислота	90	0,79
9	12,70	2-Пропеновая кислота (акриловая)	89	3,63
10	23,84	2-Метокси-4-винилфенол	89	1,29
11	28,31	(S)-(+)-2′,3′-Дидезоксирибонолактон	89	0,75
12	23,07	2-Гидрокси-γ-бутиролактон	88	3,10
13	35,28	Гексадекановая кислота	88	2,83
14	36,54	Гидрохинон	87	4,70
15	42,79	Метил-β-D-глюкопиранозид	85	5,31
16	27,17	2,3-Дигидробензофуран	85	4,62
17	20,80	2,5-Диметил-4-гидрокси-3(2H)-фуранон	85	1,11

Газохроматографический анализ с масс-спектрометрическим детектированием позволил идентифицировать 17 основных компонентов экстракта *Filipendula vulgaris* M. В составе обнаружены преимущественно соединения фенольной, фурановой и органокислотной природы, что согласуется с литературными данными о фитохимическом составе растений рода Filipendula (Таблица 2 и рисунок 2).

Наибольшую долю составляют фенол (10,65%) и 2,3-дигидро-3,5-дигидрокси-6-метил-4H-пиран-4-он (10,5%), которые являются мощными антиоксидантами и ингибиторами свободнорадикальных процессов. Эти соединения играют ключевую роль в реализации

противовоспалительных и антисептических свойств растения.

Гидрохинон (4,7%) и 2-метоксифенол (1,41%) также принадлежат к классу фенольных соединений, обладающих выраженной бактерицидной и репаративной активностью, что подтверждает перспективность использования густого экстракта в составе мазей и дерматологических средств.

Присутствие глицерина (5,55%) и метил-β-D-глюкопиранозида (5,31%) указывает на наличие гидрофильных компонентов, способствующих удержанию влаги и смягчению кожи при наружном применении.

Соединения фуранового ряда, такие как 5-гидроксиметилфурфурол (1,39%) и 2,5-диметил-4-гидрокси-3(2H)-фуранон (1,11%), известны своими антиоксидантными и стабилизирующими свойствами, которые могут способствовать увеличению срока хранения и устойчивости лекарственной формы.

Наличие гексадекановой кислоты (2,83%) и 2-пропеновой кислоты (3,63%) подтверждает присутствие жирнокислотных фракций, участвующих в формировании липофильной матрицы экстракта и обеспечивающих его совместимость с мазевой основой.

Полученный экстракт характеризуется богатым набором биологически активных соединений, среди которых преобладают фенольные и кислородсодержащие компоненты, обладающие антиоксидантными, противовоспалительными, бактерицидными и регенеративными свойствами.

Стандартизацию густого экстракта лабазника обыкновенного (*Filipendula vulgaris*)

Стандартизацию густого экстракта лабазника обыкновенного (*Filipendula vulgaris*) проводили с учетом требований к качеству исходного сырья (ГФ РК) и к готовому препарату в соответствии с Приказом МЗ РК № 20 от 16.02.2021, ГФ РК.

Показатели качества густого экстракта *Filipendula vulgaris* M. представлены в таблицах 3.

Таблица 3 – Показатели качества густого экстракта *Filipendula vulgaris* M.

№	Показатель качества	Норма / Требования	Метод испытаний
1	Описание	Цвет темный, зелено-коричневый, запах специфический, напоминающий запах исходного сырья.	ГФ РК, т. 1 (визуально)
2	Идентификация	1. К 20 мг субстанции, растворенной в 2 мл 70% этанола, прибавляют 5-7 капель конц. HCl, 0,01 г Mg или Zn, подогревают на водяной бане. Появляется оранжевое окрашивание. 2. К 20 мг субстанции, растворенной в 2 мл 70% этанола, прибавляют 4 капли раствора железоаммониевых квасцов. Появляется черно-синего окрашивания.	Качественная реакция
3	Растворимость	Легко растворим этаноле, мало растворим воде.	ГФ РК, т. 1, 1.4
4	Тяжелые металлы	Кадмий (Cd) - не более 1.0 мг/кг; Свинец (Pb) - не более 5.0 мг/кг; Ртуть (Hg) - не более 0.1 мг/кг; Мышьяк (As) - не более 1.0 мг/кг.	ГФ РК, т. 3, 2.4.8 и 2.4.2
5	Сухой остаток	Не менее 70 % по массе.	ГФ РК, т. 1, 2.8.16
6	Потеря в массе при высушивании	Не более 25%.	ГФ РК, т. 1, 2.8.17
7	Микробиологическая чистота	Категория 4 В: Общее число аэробных микроорганизмов: $\leq 10^5$ КОЕ/г; Общее число дрожжей и плесневых грибов: $\leq 10^4$ КОЕ/г; Бактерии семейства Enterobacteriaceae и др. грам-отр. бактерии: $\leq 10^3$ КОЕ/г;	ГФ РК, т. 1, 5.1.4, 2.6.12, 2.6.13; Ф ЕАЭС, т.1, ч.1, 2.1.9.10

		Отсутствие Escherichia coli и Salmonella spp. .	
8	Количественное определение	ГХ/МС (таблица 2), 58.8 мг/г в пересчёте на галловую кислоту.	ГФ РК, т. 1, 2.2.29; Ф ЕАЭС, т.1, ч.1, 2.1.2.27
9	Упаковка	По 50 г в контейнеры с винтовой горловиной и завинчивающимися крышками.	ГФ РК, т. 1, 2.2.29; Ф ЕАЭС, т.1, ч.1, 2.1.2.27
10	Маркировка	На этикетке: название и количество вспомогательных веществ, использованное сырье, концентрация этанола в растворителе (% об/об), содержание действующих веществ. Маркировка транспортной тары - по ГОСТ 14192-96.	ГФ РК, т. 1, 3.2.1; ГФ РК, т. 1, 3.2.2
11	Транспортирование	В соответствии с ГОСТ 17768-90Е в транспорте с условиями, соответствующими хранению экстрактов.	ГОСТ 17768-90Е; Приказ МЗ РК № КР ДСМ-19 от 16.02.21
12	Хранение	В контейнерах, в защищенном от света месте, при температуре не выше 25±2°С.	ГОСТ 17768-90Е; Приказ МЗ РК № КР ДСМ-19 от 16.02.21
13	Срок хранения	24 месяца.	В соответствии с НД
14	Основное фармакологическое действие	Антимикробное, антиоксидантное, противовоспалительное.	

Полученные результаты подтверждал, что густой экстракт *Filipendula vulgaris* М. соответствует требованиям по всем основным показателям качества. Препарат обладает стабильными физико-химическими свойствами и микробиологической безопасностью, что позволяет рекомендовать его в качестве стандартизованного сырья для последующего использования в составе лекарственных форм.

Разработка и обоснование составов образцов мази

В рамках разработки лекарственной формы мази для лечения дерматологических заболеваний была изучена влияние типа основы на её свойства. С этой целью были приготовлены пять опытных составов, различающихся по природе основы (гидрофобная или гидрофильная) и компонентному составу вспомогательных веществ. Их общая характеристика приведена в таблице 4.

Разработка эффективной лекарственной формы, обеспечивающей стабильность и контролируемую доставку активных веществ, требует научно обоснованного подхода к выбору основы, который базируется на анализе физико-химических свойств действующего вещества и целевой функции препарата. В случае растительного экстракта *Filipendula vulgaris*, характеризующегося сложным, но преимущественно гидрофильным составом (фенольные гликозиды, салицилаты, гидролизуемые танины), стратегия заключалась в создании серии композиций, охватывающих спектр от классических гидрофильных до сложных эмульсионных систем, что позволяет экспериментально оценить влияние полярности основы на реологию, стабильность и кинетику высвобождения. Так, образец №1 представляет собой модифицированную абсорбционную основу, где гидрофобный вазелиновый каркас (4.0 г) функционализирован введением стеариновой кислоты (5.0 г), выступающей не только как эмульгатор, но и как структурообразователь, формирующий с глицерином (8.5 г) лиотропную жидкокристаллическую фазу, способную иммобилизовать водный раствор экстракта и модулировать его высвобождение за счет изменения проницаемости липидных слоев. Принципиально иной подход реализован в образце №2, являющемся канонической гидрофильной безжировой основой на полиэтиленгликолях (ПЭГ-1500 – 32.0 г, ПЭГ-400 – 42.0 г), выбранной в силу ее идеальной совместимости с полярными компонентами экстракта; оптимальное для достижения пластичной, тиксотропной консистенции соотношение высоко- и низкомолекулярных ПЭГ (~ 43:57) обеспечивает быстрое разрушение структуры при сдвиговой нагрузке и, как следствие, мгновенное высвобождение активных веществ при нанесении на кожу за счет образования водорастворимой пленки. Для достижения пролонгированного действия и усиления смягчающего эффекта разработан образец №3 на основе

эмульсии типа «вода в масле» (В/М), в котором высокая концентрация липофильной дисперсионной среды (вазелин – 26.0 г, жидкий парафин – 5.0 г) в комбинации с цетиловым спиртом (10.0 г) как стабилизатором обратной эмульсии обеспечивает формирование полупроницаемого барьера на коже, замедляющего испарение влаги и контролирующего диффузию гидрофильных веществ из диспергированных в жировой матрице капель водно-глицериновой фазы (20.0 г). Альтернативную стратегию, ориентированную на быстрое проникновение и охлаждающий эффект, воплощает образец №4 – эмульсия «масло в воде» (М/В), где внешняя водная фаза, стабилизированная системой эмульгаторов (моностеарат глицерина – 8.07 г, цетиловый спирт – 6.05 г) в сочетании с ПЭГ-1500 (15.5 г), обеспечивает кинетически выгодное, быстрое высвобождение экстракта при контакте с гидратированным роговым слоем, а умеренное содержание вазелина (8.07 г) в масляной фазе придает составу необходимые смягчающие свойства без формирования выраженной окклюзии. Наиболее сложной с точки зрения коллоидной химии является комбинированная основа образца №5, в которой синергия липофильных (вазелин, подсолнечное масло), гидрофильных (глицерин – 30.0 г) и поверхностно-активных (Твин 80, моностеарат глицерина) компонентов, опосредованная включением структурообразователя Qliyeng 1000 (5 г), позволяет сформировать полифункциональную матрицу с биадгезивными свойствами. Такая основа потенциально способна к селективному солюбилизированию как полярных, так и умеренно липофильных компонентов экстракта, обеспечивая их ступенчатое высвобождение в зависимости от липидного состава и гидрофильности конкретных участков кожи. Таким образом, представленный ряд композиций не является произвольным набором ингредиентов, а отражает целенаправленный дизайн, в котором варьирование природы основы (от чисто липофильной до гидрофильной и биполярной) и тонкий баланс между структурообразующими (твердые ПЭГ, цетиловый спирт, стеариновая кислота), эмульгирующими (Твин 80, моностеарат глицерина) и пластифицирующими (жидкий парафин, ПЭГ-400, глицерин) компонентами позволяют управлять критическими параметрами качества: тиксотропным поведением, температурой плавления, устойчивостью к синерезису и, что наиболее важно, диффузионной подвижностью активных молекул в матрице основы и на границе раздела с кожей (Таблица 4).

Таблица 4 – Образцы мазей на основе экстракта *Filipendula vulgaris* М.

№	Ингредиенты(г)	Образцы					
		Функционал	№1	№2	№3	№4	**№5**
1	Экстракт *Filipendula vulgaris* М.	Активное вещество	5	5	5	5	**5**
2	Вазелин	Основа	4.0	3.0	26.0	8.07	**1.5**
3	Парафин жидкий		-	-	5.0	-	**-**
4	PEG-1500		-	32.0	-	15.5	**-**
5	PEG-400		-	42.0	15.0	-	**-**
6	Olivem 1000		-	-	-	-	**5**
7	Масло подсолнечника	Эмолент	-	-	-	-	**8**
8	Стеариновая кислота	Эмульгатор	5.0	-	-	-	**-**
9	Цетиловый спирт		-	-	10.0	6.05	**1.5**
10	Моностеарат глицерина		-	-	-	8.07	**1**
11	Твин 80		2.0	4.7	-	-	**0.5**
12	Катон CG	Консервант	0.4	-	-	0.4	**-**
13	Эуксил PE		-	0.2	0,4	-	**1**
14	Глицерин	Пластификатор	8.5	3.8	20,0	25.0	**30.0**
15	Очищенная вода	Растворитель	до 100	до 100	до 100	до 100	**до 100**

В качестве основ применялись липофильные и гидрофильные вещества, обеспечивающие необходимую консистенцию и стабильность мази. В качестве эмульгаторов использовались стеариновая кислота, цетиловый спирт, твин-80 и глицерин моностеарат, которые способствуют

равномерному распределению компонентов и улучшению текстуры препарата.

Для повышения микробиологической стабильности и увеличения срока хранения в состав включены консерванты «Катон CG» и «Эвксил PE» в международно допустимой концентрации, что обеспечивает выраженный антимикробный эффект.

Органолептическая оценка стабильности опытных образцов мази

На первом этапе скрининга была проведена органолептическая оценка пяти полученных образцов мазей на основе экстракта *Filipedula vulgaris* М. Критическими параметрами являлись однородность, цвет, консистенция и отсутствие видимых признаков нестабильности (расслоение, включения).

Первичную оценку физической стабильности и потребительских свойств разработанных составов проводили методом органолептического анализа. Контрольные точки исследования были выбраны для оценки начальных характеристик мази сразу после технологического процесса (через 3 часа после приготовления) и их изменения под воздействием факторов хранения (после 3 суток выдерживания при температуре 25 °С). Это позволяет выявить ранние признаки нестабильности, такие как расслаивание, изменение цвета, консистенции или появление посторонних запахов (Таблица 5).

Таблица 5 – Органолептические свойства и кислотные показатели мазей, органолептическая характеристика мази после хранения 3 суток при 25 °С

№	Наименование	Органолептическая характеристика мази (через 3 ч после приготовления)	Органолептическая характеристика мази (после хранения 3 суток при 25 °С)	Кислотное число
1	Мазь №1	Однородная, вязкая, легко наносится на кожу. Цвет: светло-желтый	Однородная, вязкая, легко наносится на кожу. Цвет: светло-желтый	Ia = 2,75
2	Мазь №2	Однородная, вязкая, легко наносится на кожу. Цвет: белый	Неоднородная, вязкая, растекается по коже. Цвет: белый	–
3	Мазь №3	Однородная, густая, с трудом наносится на кожу. Цвет: прозрачный	Однородная, густая, с трудом наносится на кожу. Цвет: прозрачный	–
4	Мазь №4	Однородная, вязкая, трудно наносится на кожу. Цвет: желтый	Неоднородная, вязкая, трудно наносится на кожу. Цвет: желтый	–
5	Мазь №5	Однородная, вязкая, легко наносится на кожу. Цвет: белый	Однородная, вязкая, легко наносится на кожу. Цвет: белый	Ia = 1,375

Таким образом, по результатам первичного скрининга образцы №1 и №5 могут быть признаны перспективными для дальнейших исследований. Образец №3 требует оптимизации реологии для улучшения потребительских свойств, а составы №2 и №4 - существенной доработки для обеспечения физической стабильности.



Рисунок 3 – Образцы мази на основе экстракта *Filipendula vulgaris* М.

Как видно на Рисунке 3, Образец 1 и Образец 5 визуально демонстрируют сходные и удовлетворительные характеристики. Оба представляют собой однородные, пластичные мази с

гладкой поверхностью, равномерным кремово-бежевым оттенком и без признаков расслоения или посторонних включений. Незначительные различия в оттенке могут быть обусловлены нюансами технологии приготовления или плотности дисперсии экстракта в основе.

Об № 2: При хранении потерял однородность и начал растекаться, что указывает на разрушение структурного каркаса основы. Требует введения стабилизаторов.

Об № 3: Сохранил стабильность (однородность, цвет), но изначально обладает неприемлемо густой консистенцией, затрудняющей нанесение. Требует коррекции реологии.

Об № 4: Проявил признаки нестабильности (потеря однородности) в сочетании с исходно плохой наносимостью. Необходима комплексная доработка рецептуры для улучшения.

Несмотря на сопоставимое органолептическое качество, для детального исследования кинетики высвобождения активного вещества был избран образцы 1 и 5. Данный выбор был сделан на основании формализованных критериев отбора.

Высвобождение фенольных соединений из мазевых композиций определяли методом «диффузии в агар».

Данный метод широко применяется для сравнительного изучения биофармацевтических характеристик мазевых лекарственных форм, отличается простотой выполнения и воспроизводимостью результатов. Метод основан на диффузии биологически активных веществ из навески мази в агаровый гель с последующей визуализацией зоны их распространения. Сравнительная оценка степени высвобождения активных компонентов осуществляется по диаметру окрашенной зоны, образующейся в результате физико-химического взаимодействия фенольных соединений, диффундирующих из мазевой основы, с соответствующим индикатором.

Для проведения исследования использовали 2% агаровый гель, приготовленный на стандартном растворителе следующего состава (г/л): натрия хлорид - 8,9; калия хлорид - 0,3; кальция хлорид - 0,33; вода очищенная - до 1000 мл. Полученный теплый агаровый раствор в объеме 20 мл разливали в чашки Петри и оставляли для формирования геля при комнатной температуре в течение 24 часов.

Для выявления фенольных соединений в качестве индикатора использовали раствор хлорида железа (III), который вводили в состав агарового геля. Образование окрашенной зоны обусловлено образованием характерных комплексов фенольных соединений с ионами Fe^{3+}.

В каждой из чашек Петри в сформировавшемся геле с помощью металлического цилиндра (Ø = 8 мм) вырезали по 3 лунок, в которые помещали исследуемые мазевые композиции массой по 0,3 г. Подготовленные системы термостатировали при температуре 37 °С в течение 24 часов. По окончании эксперимента измеряли диаметр окрашенных зон вокруг каждой лунки с использованием миллиметровой бумаги.

На основании средних значений диаметров окрашенных зон строили диаграмму, отражающую степень высвобождения фенольных соединений из исследуемых мазевых композиций. Полученные результаты представлены на рисунке 4.

Анализ данных диаграммы показал, что высвобождение фенольных соединений наблюдалось из всех исследуемых мазевых композиций, но состав № 5 по сравнению с составом №1 показал более высокую биодоступность.

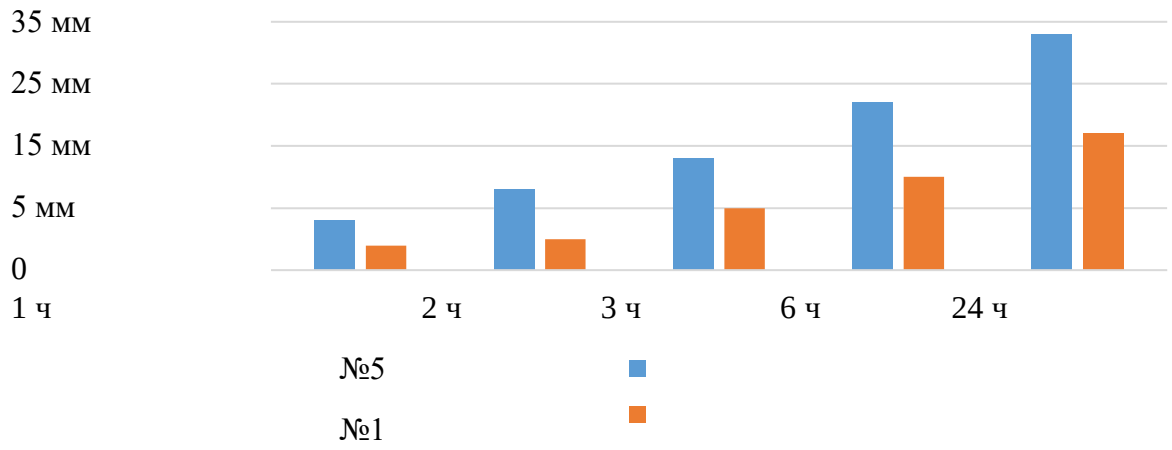


Рисунок 4 – Высвобождения фенольных соединений из исследуемых мазевых композиций

На основании проведенных исследований (органолептическая оценка, анализ стабильности, изучение высвобождения) образец №5 был выделен как оптимальный, сочетающий требуемые потребительские свойства с высокой эффективностью доставки активных веществ (фенольных соединений), что делает его предпочтительным для дальнейшей разработки.

Определение количества фенольных соединений в мази, приготовленной на основе густого экстракта лабазника обыкновенного (*Filipendula vulgaris* М.), методом ВЭЖХ.

Приготовление стандартных растворов. Галловую кислоту (5,2 мг), салициловую кислоту (5,2 мг), рутин (5 мг), кверцетин (5 мг) растворяли в 96% этаноле в ультразвуковой бане в течение 20 минут и перенесли в колбу емкостью 50 мл и довели до метки этанолом. Брали по 200 мкл каждого раствора и смешивали, и путем их разбавления готовили в общей сложности 4 различных раствора. Каждый раствор сливали во флакон и использовали для анализа.

Хроматографические условия. Определение фенольных соединений. Были использованы стандартный раствор, Shim Pack GIST C18 (150 × 4,6 мм; 5 мкм, Shimadzu, Япония) колонка с обратной фазой и градиентная подвижная фаза, состоящая из ацетонитрила (А) и 0,5% уксусной кислоты в воде (Б) (Таблица 6). Объем инъекции был установлен на уровне 10 мкл, скорость потока - на 0,5 мл/мин, а термостат колонки - на 40 ^{o} С. Аналитический сигнал (площадь пика) фенольных соединений регистрировали при 300 нм (рис. 5).

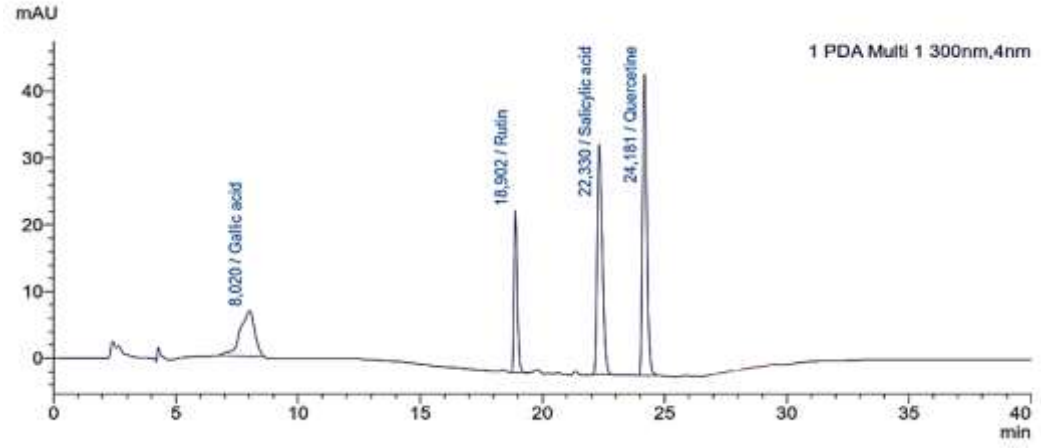


Рисунок 5 – Хроматограмма стандартов при 300 нм

Таблица 6 – Программа для градиента мобильной фазы

Время	Ацетонитрил (А), %	0,5 % уксусная кислота (В), %
0	5	95
5	5	95
17	40	60
22	40	60
22,1	5	95
40	Заканчивание	

Приготовление испытуемого раствора. Навеску мази, приготовленной на основе экстракта, массой (1.00 ± 0.01) г количественно перенесли в коническую колбу. К образцу добавили 25 мл 96% этанола (спирта этилового). Экстракцию проводили в течение 30 минут на ультразвуковой бане при температуре 40 °С. Полученную смесь фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Фильтрат (испытуемый раствор) использовали для последующего хроматографического анализа.

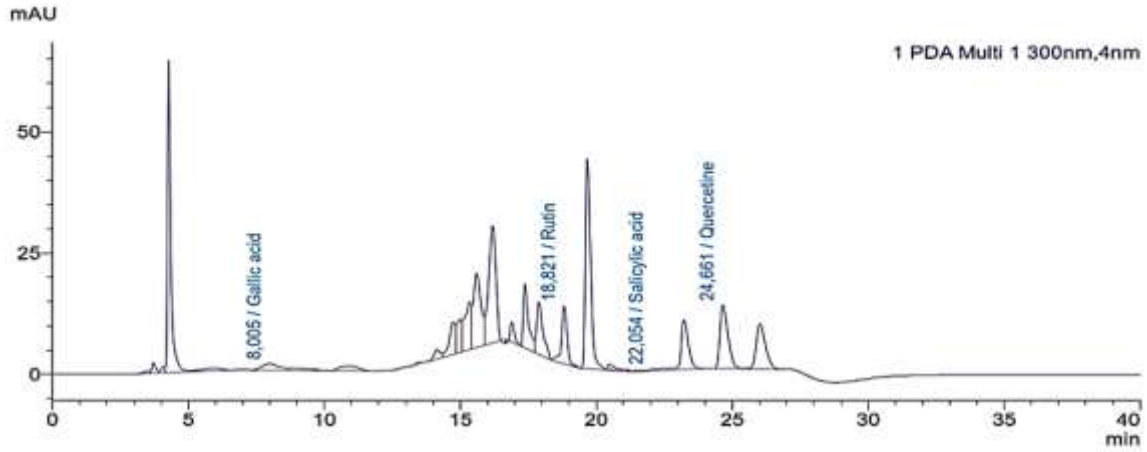


Рисунок 6 – Хроматограмма определения полифенолов в мази на экстрактной основе.

Таблица 7 – Количество и время удерживания полифенолов

Название фенольного соединения	**Время удерживания фенолов в мази, сек**	**Концентрация мази мг/л**	**Количество мази в 100 г пробы, мг**
Галловая кислота	8,005	6,8975	3,449
Рутин	18,821	31,91	15,955
Салициловая кислота	22,054	0,45	0,225
Кверцитин	24,661	20,4175	10,209

В составе 100 г мази наиболее высокими по содержанию фенольными соединениями в порядке убывания оказались рутин, галловая кислота, салициловая кислота и кверцетин (Таблица 7).

Для оценки структурно-механических свойств мазей было проведено определение их вязкости в зависимости от скорости сдвига (градиента скорости).

Все изученные образцы проявили характерное для мягких лекарственных форм неньютоновское поведение: наблюдалось снижение эффективной вязкости с увеличением скорости вращения шпинделя (градиента сдвига) (Рисунок 5). Эта закономерность является признаком псевдопластичного (сдвигоразжижающего) течения. Значения эффективной вязкости варьировали в диапазоне от 20 000 до 140 000 сПз в зависимости от состава основы и скорости сдвига. Значение 140 000 сПз, зафиксированное при минимальных скоростях, соответствует определению «густая консистенция», что приемлемо для мазей, предназначенных для формирования окклюзионного или защитного слоя на коже (Рисунок 7).

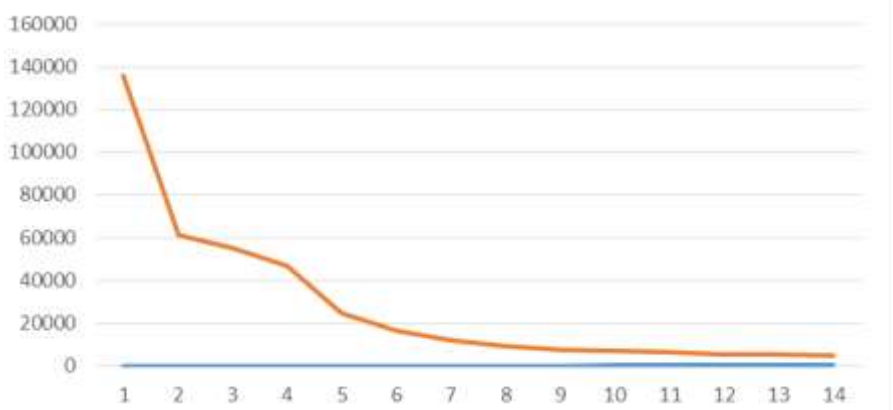


Рисунок 7 – Зависимость вязкости мази от градиента деформации

Для оценки тиксотропии (способности структуры разрушаться под сдвигом и восстанавливаться в покое) был проведен цикл «вверх-вниз» с последовательным увеличением и уменьшением скорости сдвига. Анализ полученных кривых (Рисунок 8) показал близкое совпадение ветвей «вверх» (разрушение) и «вниз» (восстановление). Минимальная площадь образующейся петли гистерезиса свидетельствует о незначительных тиксотропных свойствах и, как следствие, о высокой скорости и полноте восстановления пространственной структуры мази после прекращения механического воздействия. Данный факт указывает на стабильность и однородность внутренней структуры продукта, что является важным критерием его физической стабильности при хранении и транспортировке.

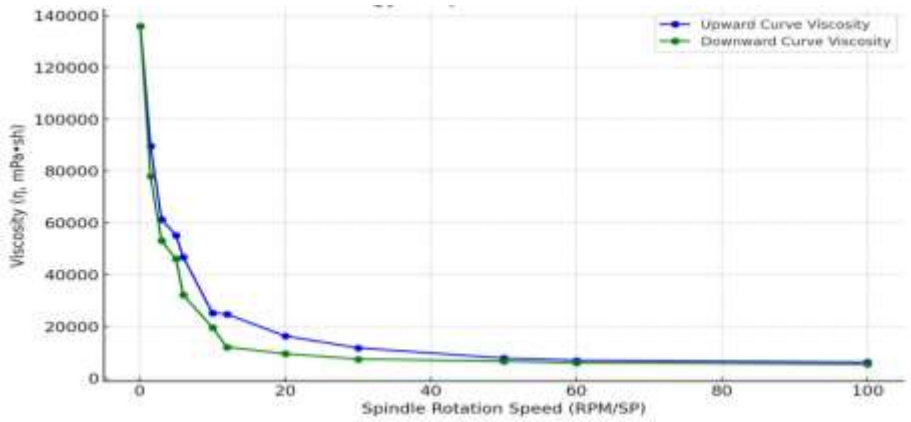


Рисунок 8 – Зависимость касательного напряжения от градиента деформации

Для производства мази по рецептуре образца №5 была разработана технологическая схема, основанная на принципах технологии эмульсионных мазей. Рассматриваемый технологический процесс включает несколько ключевых стадий: подготовка сырья, приготовление масляной фазы, приготовление раствора консервантов, приготовление водной фазы, получение мази, а также расфасовка и упаковка готового продукта.

Предварительные условия: Перед началом производственного процесса были выполнены все подготовительные операции: санитарная обработка помещений, валидация оборудования, входной контроль сырья и материалов. Вспомогательные вещества и сырье, необходимые для технологического процесса, были отмерены в соответствии с производственной рецептурой с учетом рассчитанных по материальному балансу расходов.

Детализированное постадийное описание и обоснование технологического процесса:

Стадия 1: Подготовка сырья.

Все поступающие субстанции подвергались входному контролю на соответствие спецификациям качества: проверялась однородность партии, целостность упаковки, срок годности и др. После приемки твердые компоненты взвешивались на аналитических весах, а жидкие отмерялись с помощью градуированных цилиндров. Данный этап является критической контрольной точкой для обеспечения воспроизводимости состава и безопасности готового продукта.

Стадия 2: Приготовление масляной (липофильной) фазы.

Для обеспечения образования гомогенной липофильной матрицы компоненты вводились в реактор-плавитель в строгой последовательности, определяемой их температурой плавления, по принципу «от высшей к низшей»: Olivem 1000 (эмульгатор) > глицерил моностеарат (со-эмульгатор/загуститель) > вазелин (липофильная основа) > цетиловый спирт (эмульгатор/консистентообразователь) > подсолнечное масло (масляная фаза, пластификатор).

Технологический реактор нагревали до температуры 70±2°C при постоянном перемешивании. Данная температура является оптимальной, так как превышает температуру плавления всех липофильных компонентов (особенно Olivem 1000 и глицерил моностеарата), но не приводит к их термической деградации. Перемешивание продолжали до образования оптически однородной, прозрачной или полупрозрачной расплавленной массы, что свидетельствует о полном расплавлении и взаимном растворении компонентов. Olivem 1000 был выбран в качестве основного эмульгатора,

так как он образует термостабильные и коллоидно стабильные эмульсии типа "масло в воде" (М/В), что соответствует целевой структуре мази.

Стадия 3: Приготовление раствора консерванта.

Консервант Euxyl® PE растворяли в части очищенной воды, предварительно подогретой до 25±5°С. Выбор данной температуры обусловлен хорошей растворимостью консерванта в воде без нагрева и его термостабильностью, что исключает необходимость высокотемпературной обработки и минимизирует риски испарения летучих компонентов.

Стадия 4: Приготовление водной (гидрофильной) фазы.

В качестве растворителя для гидрофильного экстракта *Filipendula vulgaris* М., богатого полярными фенольными соединениями, использовали основную часть очищенной воды. Экстракт вводили в воду при умеренном перемешивании до полного растворения. Для предотвращения микробиологической контаминации на данной стадии рекомендовано поддерживать температуру фазы не ниже 60-70°С перед смешиванием с масляной фазой или проводить процесс в закрытой системе.

Стадия 5: Получение мази (эмульгирование и гомогенизация).

Это ключевая технологическая стадия, определяющая дисперсность, стабильность и реологию готового продукта. Приготовленную водную фазу (с экстрактом) и раствор консерванта постепенно, тонкой струей при интенсивном перемешивании (около 500-550 об/мин) вводили в подготовленную масляную фазу, поддерживаемую при температуре 65-70°С. Такая последовательность (добавление водной фазы в масляную) является классической для формирования первичной эмульсии типа М/В при использовании выбранных эмульгаторов.

После полного смешивания фаз проводили гомогенизацию полученной эмульсии в течение 30 минут при поддержании температуры выше температуры плавления жировой фазы. Это необходимо для уменьшения размера глобул дисперсной фазы, обеспечения кинетической и коллоидной стабильности эмульсии и достижения однородной, гладкой консистенции без крупинок. Далее массу охлаждали при непрерывном, но менее интенсивном перемешивании (200-300 об/мин) до комнатной температуры, что способствует структурообразованию и кристаллизации тугоплавких компонентов, формирующих каркас мази.

Стадия 6: Фасовка в тубы.

Охлажденную до комнатной температуры мазь направляли на фасовку. Использовалась автоматическая тубонаполнительная машина, настроенная на номинальный объем заполнения 30 г. Производительность типового оборудования данного класса составляет 40-60 туб/мин. Герметичность запайки шва тубы является критическим параметром для сохранения стабильности и консистенции мази.

Стадия 7: Упаковка (в картонные пачки).

Заполненные тубы вместе с инструкцией по медицинскому применению на государственном (казахском) и русском языках помещались в индивидуальные картонные пачки.

Стадия 8: Групповая упаковка, маркировка и оформление.

Готовый продукт укладывался в групповые транспортные тары (ящики). На каждую первичную и вторичную упаковку наносилась маркировка, содержащая: торговое название лекарственного средства на русском и казахском языках, состав, способ применения, условия хранения и срок годности.

Мазь на основе экстракта Filipendula vulgaris М. стандартизована и соответствует требованиям качества в соответствии с Приказом Министерства здравоохранения РК № 20 от 16 февраля 2021 г. «Об утверждении порядка согласования разработчиком лекарственного средства нормативного документа о качестве лекарственных средств при проведении государственной экспертизы» и Фармакопейными требованиями РК, статья «Мягкие лекарственные формы» (Таблица 8).

Таблица 8 – Оценка качества мази, полученной с экстрактом лабазника обыкновенного

Показатели качества	**Характеристика и норма**	**Нормативные документы**
Внешний вид	Мазь желтовато-белого цвета	Фармакопейные требования РК, т. I, «Мягкие лекарственные формы для местного применения»
Идентификация – фенолы	1,0 г мази растворяли в 10 мл очищенной воды. К 1 мл приготовленного раствора добавляли 1 мл раствора хлорида железа. Раствор окрашивался в тёмно-синий цвет.	НД
pH	5,67	Фармакопейные требования РК, т. I, 2.2.3
Кислотное число	1,375	Фармакопейные требования РК, т. I, 2.5.1
Вязкость	20 000–140 000 сПз	Фармакопейные требования РК, т. I, 2.2.10.
Микробиологическая чистота	- Общее количество жизнеспособных аэробных микроорганизмов <10 КОЕ/г- Дрожжи и грибы <10 КОЕ/г- E. coli отсутствует	Фармакопейные требования РК, т. I, 5.1.4.
Количественное определение	Не менее 0,1 %	
Маркировка	Информация на государственном и русском языках, включая: производителя, торговую марку, адрес, название продукта, массу, условия хранения, дату изготовления и срок годности	Приказ МЗ РК № 11 от 27.01.2021
Упаковка	Для предотвращения контакта с окружающей средой: воздухонепроницаемая, прочная, лёгкая. 1 тюбик помещается в картонную коробку с инструкцией на государственном и русском языках	Приказ МЗ РК № 11 от 27.01.2021
Хранение	При температуре 15–25 °C	Приказ МЗ РК № 19 от 16.02.2021
Основное фармакологическое действие	Противовоспалительное	

Исследование острой и хронической токсичности мази с экстрактом *Filipendula vulgaris* M.

Исследование острой токсичности образцов проводилось по методике, рекомендованной в предклинических исследованиях (Хабриев Р. У., Миронов А. Н.) [134, с. 45; 136, с. 15].

В эксперименте использовались мази на основе экстракта обыкновенной лабазники концентрации 2,5 % и 5 %.

Острая токсичность оценивалась у бесхвостых белых мышей массой 18–25 г, каждой из которых мазь применялась однократно. Для достижения необходимой дозы мазь наносили на ~70 % поверхности тела животных:

1-я группа – 500 мг/кг;

2-я группа – 1000 мг/кг;

3-я группа – 1500 мг/кг;

4-я группа (контроль) – контрольная (плацебо).

В каждом эксперименте участвовали 6 мышей одновременно.

Наблюдение за интоксикацией проводилось:непрерывно в течение первых 2 часов после применения препарата, повторно примерно через 3 часа, последующие наблюдения проводились на протяжении 14 дней.

В ходе наблюдений оценивались: общее состояние животных, частота и глубина дыхания, скорость движения и координация, наличие цианоза на ушах и слизистых, доступ к воде и пище, динамика массы тела, частота мочеиспускания и характеристики кала (объём и консистенция), реакция на пресную воду и сенсорные раздражители (слух, зрение, внешние стимулы) [12].

Таблица 9 – Острая токсичность мази, полученной из экстракта *Filipendula vulgaris* М

Группа	Количество умерших животных	Доза препарата	Средняя масса мышей до введения, г	Средняя масса через 7 дней, г	Средняя масса через 14 дней, г
1-я группа	0/2	500 мг/кг	28,5 ± 0,1	30 ± 0,3	30 ± 0,3
2-я группа	0/2	1000 мг/кг	26 ± 0,1	26 ± 0,1	28 ± 0,2
3-я группа	0/2	1500 мг/кг	25 ± 0,2	27 ± 0,2	29 ± 0,1
4-я группа (контроль)	0/2	–	27 ± 0,4	28 ± 0,5	31 ± 0,3



Рисунок 7 – Образец мыши, использованный для определения острой токсичности мази

Для оценки острой токсичности мази были использованы 3 контрольные группы, каждая из которых включала 6 мышей.

В ходе исследования животные сохраняли активность, имели хороший аппетит, адекватно реагировали на звуковые и световые раздражители. Процессы мочеиспускания и дефекации проходили нормально, судороги, нарушения дыхания или другие признаки токсического воздействия не наблюдались.

Динамика изменения массы тела животных в эксперименте свидетельствует об отсутствии токсического эффекта препарата.

При оценке острой токсичности мази учитывались:

- общее состояние животных;
- дерматологические особенности обработанной зоны;
- частота мочеиспускания и дефекации;
- масса тела.

По результатам исследования установлено, что мазь не обладает токсическим действием.

Определение местного раздражающего действия мази.

В качестве лабораторных животных использовались морские свинки массой 280–300 г, разделённые на 2 группы по 12 животных. Животные первой группы использовали испытуемую мазь, контрольная группа 2 – очищенную воду. Испытания проводились открытым способом дозой 0,02 г (см²), когда испытуемая зона размером 1 см полностью покрывалась мазью. В «кожное окно» наносилось одинаковое количество очищенной воды. Для изучения раздражающего действия на

кожу животных на боковую поверхность тела ежедневно в течение 0,5 дня наносился тонкий слой мази массой 14 г. Пробы кожи ежедневно оценивались с учётом реакции кожи, времени проявления изменений, характера и скорости изменений.



Рисунок 9 – Морская свинка, на которую нанесена мазь с 2,5% экстрактом.

Мазь наносилась на область бедра морской свинки, куда не доставала голова животного. Оценивалось общее состояние животного.



Рисунок 10 – Морская свинка, на которую нанесена мазь с 5% экстрактом.

Как показано на рисунках, двум группам морских свинок наносились мази с экстрактом в разных концентрациях. В результате исследований изменений в слоях кожи морских свинок не выявлено. Кожный покров был увлажнённым и питанным.

Определение выраженного фармакологического действия, противовоспалительного эффекта.

Девять белых самцов крыс возрастом 200–220 дней были разделены на три группы по три крысы. На задние лапы каждой группы для вызова острого экссудативного воспаления наносили 0,1 мл 2% раствора формалина. Для определения признаков воспаления на задней поверхности измеряли толщину лапы микрометром до введения формалина и через 3, 6 и 24 часа после его введения. На задние лапы крыс наносили мазь с экстрактом в концентрации 500 мг/кг и 1500 мг/кг в формалиновой суспензии.



Рисунок 11 – Опухоль лапы крысы через 2 часа после введения раствора формалина.

Формалиновая суспензия вызвала выраженное воспаление плантарных мышц у крыс, что проявлялось увеличением объёма. Через 24 часа после введения формалина как в опытной, так и в контрольной группах наблюдалось восстановление покоя в плантарной области.



Рисунок 12 – Лапа крысы после 14 дней нанесения мази с 5% экстрактом.

На 14-й день исследования было установлено, что 5% мазь с экстрактом обладает более выраженным противоотёчным действием по сравнению с сравнительным препаратом и мазью с 2,5% экстрактом.

Таблица 10 – Ширина лапы крысы

День	**Интактные крысы**			
	Интактные крысы	**Мазь с 5% экстрактом 1500 мг/кг**	**Мазь с 2,5% экстрактом 1500 мг/кг**	**Сравнительная мазь**
1	65	120	130	120
2	65	100	120	120
3	65	85	105	110
4	65	83	100	105
5	65	83	94	100
6	65	80	90	100
7	65	78	87	97
8	65	75	86	95
9	65	75	85	90
10	65	73	83	86
11	65	70	80	84
12	65	70	79	83
13	65	70	78	82
14	65	70	77	81

Через 14 дней при использовании мази с 5% экстрактом ширина лапы крысы составила 70 мм, при 2,5% экстракте – 77 мм, при сравнительной мази – 81 мм.

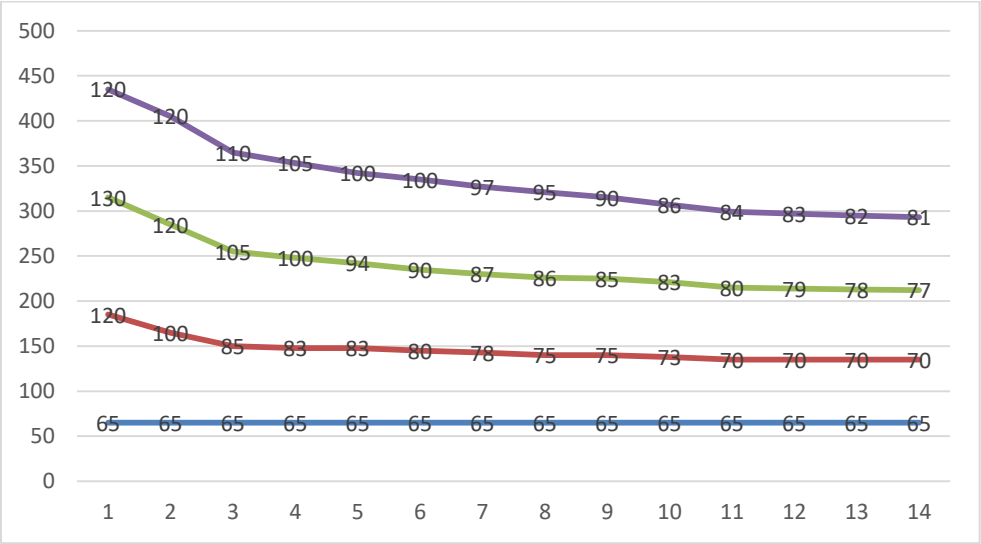


Рисунок 13 – Ширина лапы крысы.
Синий столбцы: Интактные (здоровые) животные. Контрольная группа.
Оранжевые столбцы: Опытная группа, получавшая 5% экстракт в дозе 1500 мг/кг. Серые столбцы: Опытная группа, получавшая 2% экстракт в дозе 1500 мг/кг.
Желтые столбцы: Группа сравнения, получавшая стандартный (эталонный) препарат.

Проведённые исследования показали, что мазь с экстрактом оказывает выраженное противовоспалительное действие на модели острого экссудативного воспаления у крыс.

Местная переносимость: Применение мазей с 2,5% и 5% экстрактом на коже морских свинок не вызвало раздражения, покраснения или иных патологических изменений. Кожный покров оставался увлажнённым и питанным, что подтверждает хорошую местную переносимость препарата.

Противовоспалительное действие: На модели формалин-индуцированного воспаления у крыс отмечено, что мазь с 5% экстрактом более эффективно снижает отёк лапы по сравнению с мазью с 2,5% экстрактом и сравнительной мазью. Так, к 14-му дню ширина лапы у крыс, получавших 5% мазь, составила 70 мм, в то время как при применении 2,5% экстракта – 77 мм, а при сравнительной мази – 81 мм. Мазь с 5% экстрактом обладает выраженным противовоспалительным действием и хорошей местной переносимостью, что делает её перспективной для дальнейшего изучения и возможного применения в терапевтической практике.

Заключение

В рамках проведённого исследования была разработана мазь на основе густого экстракта *Filipendula vulgaris* M., обладающая высокой технологической стабильностью и однородной структурой. Полученный экстракт, выделенный методом ультразвуковой экстракции с оптимизированными параметрами, характеризуется богатым химическим составом биологически активных соединений, подтверждённым методом газовой хромато-масс-спектрометрии.

Физико-химические, органолептические и реологические характеристики мази соответствуют требованиям лекарственных форм для наружного применения, а токсикологическая оценка показала её высокую местную переносимость. Экспериментальные данные свидетельствуют о выраженном противовоспалительном эффекте препарата, причём максимальная активность отмечена при концентрации экстракта 5%, что превышает эффект сравнительных препаратов.

Таким образом, разработанная мазь является безопасной, фармакологически активной лекарственной формой с перспективой дальнейшего изучения и применения в клинической практике.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Литература

1. Matic S, Katanic J et al. In vitro and in vivo assessment of the genotoxicity and antigenotoxicity of the Filipendula hexapetala and Filipendula ulmaria methanol extracts // Journal of ethnopharmacology. V-200, 2017. – P.: 236-236;
2. Samardzic S, Tomic M et al. Antihyperalgesic activity of Filipendula ulmaria (L.) Maxim. and Filipendula vulgaris Moench in a rat model of inflammation // Journal of ethnopharmacology. V-193, 2016. – P.: 652-656;
3. Cebovic T, Maksimovic Z. Hepatoprotective Effect of Filipendula hexapetala Gilib. (Rosaceae) in Carbon Tetrachloride-induced Hepatotoxicity in Rats // Phytotherapy Research, V-26, №7-2012, – P.: 1088-1091;
4. Gurita VG, Pavel IZ et al. Assessment of the Antioxidant Effect of ethanolic extracts obtained from Agrimonia eupatoria L., Filipendula ulmaria (L.) Maxim. and Filipendula vulgaris Moench collected from the Estern part of Romania// Revista de chimie. V-69, – №9, 2018. – P.: 2385-2390;
5. Katanić J, Boroja T. et al. In vitro and in vivo assessment of meadowsweet (Filipendula ulmaria) as anti-inflammatory agent. J Ethnopharmacol 2016; – P.: 627-636.
6. Katanić, J., Mihailović, V. et al. Dropwort (Filipendula hexapetala Gilib.): Potential role as antioxidant and antimicrobial agent // EXCLI J. 2015.14, – P.: 1–20.
7. Katanić, J., Mihailović, V., Matić, S. et al. The ameliorating effect of Filipendula hexapetala extracts on hepatorenal toxicity of cisplatin // J. Funct. Foods. 2015. №18, – P.:198–212
8. Katanić, J., Pferschy-Wenzig, E. et al. Phytochemical analysis and anti-inflammatory effects of Filipendula vulgaris moench extracts // Food and Chemical Toxicology (2018), V. 122, – P.: 151-162.
9. Авдеева Е.Ю., Скороходова М.Г. и др. Сравнительная оценка остеогенной активности и влияния на гемопоэтическую функцию красного костного мозга фракций экстрактов Saussurea controversa и Filipendula ulmaria при экспериментальном остеомиелите // Bulletin of Siberian Medicine. 2019; 18 (3): – P.: 6–14.
10. Nitta Y, Yasukata F et al. Inhibition of Morganella morganii Histidine decarboxylase activity and Histamine accumulation in mackerel muscle derived from Filipendula ulumaria Extracts // Journal of food protection. V-79, – №3, 2016. – P.: 463-467;
11. Nitta Y, Kikuzaki H et al. Inhibitory activity of Filipendula ulmaria constituents on recombinant human histidine decarboxylase// Food Chemistry. V-138, – №2-3, 2013. – P.: 1551-1556;
12. Shilova I.V., Samylina I.A., Suslov N.I. Razrabotka nootropnyh sredstv na osnove rastenij Sibiri. Tomsk: Pechatnaya manufaktura, 2013. – 268 s.
13. Gosudarstvennaya farmakopeya Respubliki Kazahstan. T. 1. – Almaty Izdatelskij dom «Zhibek zholy», 2008. - 592 s
14. Gosudarstvennaya farmakopeya Respubliki Kazahstan. Tom 3. Almaty: Izdatelskij dom «Zhibek zholy», 2014. – 872 s. ISBN 9965-759-96-0.

References

1. Matic S, Katanic J, et al. In vitro and in vivo assessment of the genotoxicity and antigenotoxicity of the *Filipendula hexapetala* and *Filipendula ulmaria* methanol extracts. Journal of Ethnopharmacology. V-200, 2017, p. 236-236.
2. Samardzic S, Tomic M, et al. Antihyperalgesic activity of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. and *Filipendula vulgaris* Moench in a rat model of inflammation. Journal of Ethnopharmacology. V-193, 2016, p. 652-656.
3. Cebovic T, Maksimovic Z. Hepatoprotective Effect of *Filipendula hexapetala* Gilib. (Rosaceae) in Carbon Tetrachloride-induced Hepatotoxicity in Rats. Phytotherapy Research, V-26, №7, 2012, p. 1088-1091.
4. Gurita VG, Pavel IZ, et al. Assessment of the Antioxidant Effect of ethanolic extracts obtained from *Agrimonia eupatoria* L., *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. and *Filipendula vulgaris* Moench collected from the Eastern part of Romania. Revista de Chimie. V-69, №9, 2018, p. 2385-2390.
5. Katanic J, Boroja T, et al. In vitro and in vivo assessment of meadowsweet (*Filipendula ulmaria*) as anti-inflammatory agent. J Ethnopharmacol, 2016, p. 627-636.
6. Katanic J, Mihailovic V, et al. Dropwort (*Filipendula hexapetala* Gilib.): Potential role as antioxidant and antimicrobial agent. EXCLI J. 2015;14, p. 1-20.

7. Katanic J, Mihailovic V, Matic S, et al. The ameliorating effect of *Filipendula hexapetala* extracts on hepatorenal toxicity of cisplatin. J. Funct. Foods. 2015; №18, p. 198-212.
8. Katanic J, Pferschy-Wenzig E, et al. Phytochemical analysis and anti-inflammatory effects of *Filipendula vulgaris* Moench extracts. Food and Chemical Toxicology. 2018; V.122, p. 151-162.
9. Avdeeva EY, Skorokhodova MG, et al. Comparative assessment of osteogenic activity and influence on hematopoietic function of red bone marrow of Saussurea controversa and *Filipendula ulmaria* extract fractions in experimental osteomyelitis. Bulletin of Siberian Medicine. 2019; 18(3): 6-14.
10. Nitta Y, Yasukata F, et al. Inhibition of *Morganella morganii* Histidine decarboxylase activity and Histamine accumulation in mackerel muscle derived from *Filipendula ulmaria* Extracts. Journal of Food Protection. V-79, №3, 2016, p. 463-467.
11. Nitta Y, Kikuzaki H, et al. Inhibitory activity of *Filipendula ulmaria* constituents on recombinant human histidine decarboxylase. Food Chemistry. V-138, №2-3, 2013, p. 1551-1556.
12. Shilova IV, Samylina IA, Suslov NI. Razrabotka nootropnykh sredstv na osnove rastenij Sibiri. Tomsk: Pechatnaya Manufaktura, 2013, 268 p.
13. Gosudarstvennaya Farmakopeya Respubliki Kazakhstan. T. 1. Almaty: Izdatelsky Dom «Zhibek Zholy», 2008, 592 p.
14. Gosudarstvennaya Farmakopeya Respubliki Kazakhstan. Tom 3. Almaty: Izdatelsky Dom «Zhibek Zholy», 2014, 872 p. ISBN 9965-759-96-0.

КӘДІМГІ ҮРКЕГҮЛДІҢ (*FILIPENDULA VULGARIS M.)* ҚОЮ ЭКСТРАКТЫ НЕГІЗІНДЕ ЖАҚПА МАЙ ӘЗІРЛЕУ ЖӘНЕ ЗЕРТТЕУ

Назаров С. Ғ., Жаңабайқызы С.

С.Д. Асфендияров атындағы Қазақ Ұлттық медицина университеті, Алматы қ., Қазақстан Республикасы
*nazarov.s@kaznmu.kz

Аннотация. Ультрадыбыстық экстракция әдісімен алынған кәдімгі үркегүл (*Filipendula vulgaris* M.) қою экстракты негізінде жақпа майды фармацевтикалық әзірлеу жүргізілді. Ультрадыбыстық әсерді қолдану биологиялық белсенді заттарды бөліп алудың тиімділігін арттыруға, экстракция уақытын қысқартуға және өсімдік шикізатының термолабильді компоненттерін сақтауға мүмкіндік берді.

Қою экстрактың химиялық құрамы газды хромато-масс-спектрометрия (ГХ/МС) әдісімен зерттелді. Талдау нәтижесінде фенолдық табиғатты қосылыстардың, флавоноидтардың, органикалық қышқылдардың, эфирлердің және айқын антиоксиданттық әрі қабынуға қарсы белсенділікке ие басқа да екіншілік метаболиттердің кешені анықталды. Алынған деректер экстрактың фармакологиялық маңыздылығын және оны жұмсақ дәрілік қалыптарды әзірлеуде белсенді ингредиент ретінде қолданудың мақсатқа сай екенін дәлелдейді.

Зерттелген экстракт негізінде жақпа майдың бес модельдік құрамы әзірленді, олар негіз компоненттерінің арақатынасы мен белсенді заттың шоғырлануы бойынша ерекшеленеді. Әрбір модель үшін физика-химиялық, органолептикалық және реологиялық сипаттамаларға бағалау жүргізілді. Жақпа майдың қоймалылығы, қабаттануға тұрақтылығы, pH көрсеткіші, тұтқырлығы, сондай-ақ экстрактың жақпа май массасында біркелкі таралуы анықталды. Алынған деректердің жиынтығы негізінде құрылымдық тұрақтылықты және жұмсақ дәрілік қалыптарға қойылатын талаптарға сай фармакотехнологиялық қасиеттерді қамтамасыз ететін оңтайлы құрам таңдап алынды.

Әзірленген үлгілерге токсикологиялық зерттеулер мен фармакологиялық сынақтар жүргізілді. Сыртқа қолдану кезінде жедел уыттылық белгілері мен тітіркендіргіш әсердің жоқтығы анықталды. Қабынуға қарсы белсенділікті эксперименттік бағалау қабыну реакцияларының сенімді төмендеуін көрсетті, бұл әзірленген жақпа майдың айқын терапиялық әлеуетін дәлелдейді.

Осылайша, зерттеу нәтижелері *Filipendula vulgaris* M. қою экстрактының қабынуға қарсы әсері бар жұмсақ дәрілік қалыптарды жасау үшін биологиялық белсенді заттардың перспективалы өсімдік көзі екенін растайды. Әзірленген жақпа май композициясы тұрақтылығымен, қауіпсіздігімен және фармакологиялық тиімділігімен ерекшеленеді, бұл оны фармацевтикалық

практикаға енгізу мақсатында әрі қарай клиникаға дейінгі және технологиялық зерттеулер жүргізуге негіз ретінде қарастыруға мүмкіндік береді.

Түйін сөздер: кәдімгі үркегүл, *Filipendula vulgaris* M., ультрадыбыстық экстракция, қою экстракт, жақпа май, фармацевтикалық әзірлеу, қабынуға қарсы белсенділік, токсикологиялық бағалау.

DEVELOPMENT AND INVESTIGATION OF AN OINTMENT BASED ON A THICK EXTRACT OF MEADOWSWEET (*FILIPENDULA VULGARIS M.)*

Nazarov S.G., Zhanabaikyzy S.

Asfendiyarov Kazakh National Medical University, Almaty, Republic of Kazakhstan
*nazarov.s@kaznmu.kz

Abstract. A pharmaceutical development of an ointment based on a thick extract of *Filipendula vulgaris* M. obtained by ultrasonic extraction has been carried out. The use of ultrasonic treatment made it possible to increase the efficiency of extracting biologically active substances, reduce extraction time, and preserve thermolabile components of the plant material.

The chemical composition of the thick extract was studied using gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS). The analysis revealed the presence of a complex of phenolic compounds, flavonoids, organic acids, esters, and other secondary metabolites with pronounced antioxidant and anti-inflammatory activity. The obtained data confirm the pharmacological significance of the extract and the feasibility of its use as an active ingredient in the development of soft dosage forms.

Based on the studied extract, five model compositions of the ointment were developed, differing in the ratio of base components and the concentration of the active substance. Each model was evaluated for physicochemical, organoleptic, and rheological characteristics. Parameters such as consistency, resistance to delamination, pH, viscosity, and uniformity of extract distribution in the ointment mass were determined. According to the totality of the obtained data, the optimal composition was identified, providing structural stability and pharmaco-technological properties that meet the requirements for soft dosage forms.

Toxicological studies and pharmacological tests of the developed samples were carried out. No signs of acute toxicity or irritating effects were observed during topical application. Experimental evaluation of anti-inflammatory activity demonstrated a significant reduction of inflammatory reactions, indicating a pronounced therapeutic potential of the developed ointment.

Thus, the study results confirm that the thick extract of *Filipendula vulgaris* M. is a promising herbal source of biologically active substances for the development of soft dosage forms with anti-inflammatory properties. The developed ointment composition is characterized by stability, safety, and pharmacological efficacy, making it a potential basis for further preclinical and technological studies aimed at pharmaceutical implementation.

Key words: *Filipendula vulgaris* M., meadowsweet, ultrasonic extraction, thick extract, ointment, pharmaceutical development, anti-inflammatory activity, toxicological evaluation.

МРНТИ 76.29.49 DOI: 10.58318/2957-5702-2025-23-50-84
Обзорная статья

КЛЕТОЧНЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ В МОДЕЛИРОВАНИИ КАНЦЕРОГЕНЕЗА И ИХ ПОТЕНЦИАЛ В ПРЕЦИЗИОННОЙ МЕДИЦИНЕ

А.К. Наханов, С.К. Коканов, А.А. Теребай*, Л.Г. Мараховская

ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», Национальный холдинг «QazBioPharm», Гвардейский, Республика Казахстан
* s.kokanov@biosafety.kz

Аннотация. Онкологические заболевания являются одной из самых актуальных проблем человечества. К сожалению, современные методы профилактики и лечения рака не поспевают за тенденцией увеличения смертности и появления новых случаев данных заболеваний. Одной из причин этого является отсутствие доклинических моделей *in vitro*, которые бы точно имитировали человеческие опухоли, их разнообразную морфологию, молекулярные характеристики и микроокружение. Исследования опухолей, их морфологические характеристики, прогноз лечения, терапевтические подходы до сих пор проводятся на двухмерных моделях культур клеток и животных. Однако двухмерные модели культур клеток имеют ограничения из-за отсутствия тканеспецифической архитектуры, биохимических сигналов и взаимодействия между клетками и окружающей матрицей, поэтому они не могут точно отображать и моделировать сложные процессы *in vivo*. В свою очередь использование животных для моделирования опухолевых заболеваний и тестирования на них лекарственных препаратов не только дорогостоящее и трудоемкое занятие, но также данные модели не могут имитировать биологические реакции людей из-за видовых различий. Трехмерные модели ткани более подходящие в плане морфологии, миграции, пролиферации, реакции на лекарственное лечение, а также экспрессии генов и белков, более точно имитируют рост тканей *in vivo*. В данном обзоре приведены современные научные данные по использованию клеточных биотехнологий для изучения канцерогенеза и их потенциал в прецизионной медицине.

Ключевые слова: культура клеток, органоиды, онкология, in vitro - модели, канцерогенез, прецизионная медицина.

Введение

Онкологические заболевания являются одной из наиболее актуальных проблем современной медицины. По данным пресс-релиза Всемирной организации здравоохранения, от 1 февраля 2024 г., в 2022 г. во всем мире было зарегистрировано 20 млн новых случаев рака и 9,7 млн случаев смерти от онкологических заболеваний, при этом прогнозируется, что к 2050 г. эта цифра вырастет на 77% и достигнет 35 млн. Быстрый рост глобального бремени рака является следствием как старения населения и демографического роста, так и изменения в подверженности людей воздействию факторов риска, некоторые из которых связаны с уровнем социально-экономического развития [1].

В Казахстане проблема онкологических заболеваний также стоит остро, что привело к принятию Комплексного плана по борьбе с онкологическими заболеваниями в Республике на 2023-2027 годы. Согласно официальной статистике в нашей стране ежегодно регистрируется более 37 тысяч новых случаев онкологических заболеваний, от которых умирают более 13 тыс. человек. На учете состоят более 205 тыс. человек с онкопатологией. Особую тревогу вызывает тот факт, что 56% заболевших – это граждане трудоспособного возраста от 18 до 64 лет. По статистике на первом месте среди онкологических заболеваний находится рак молочной железы (13,2%), на втором месте – рак легкого (10%), на третьем месте – колоректальный рак (9,3%).

Несмотря на значительные достижения современной медицины отсутствие глубокого понимания биологии рака является ключевым препятствием для исследования патогенеза, инвазивности и отслеживания метастазов опухолей, а также новых терапевтических подходов и лекарственных препаратов [2, 3]. Как и в других отраслях медицины, исследования в онкологии, , глубоко опираются на надежную и репрезентативную модельную структуру. Выбор наиболее подходящей модели, которая наилучшим образом отражает ту или иную опухолевую систему, является одной из реальных трудностей для исследования рака [4]. Модели рака, как естественного, так и искусственного происхождения, должны иметь черты, наиболее сходные с раковыми

заболеваниями. Однако неспособность in vitro моделей имитировать гетерогенность человеческих раковых клеток, их микросреду и стромальный компартмент препятствуют глубокому пониманию патогенеза опухоли, терапевтических эффектов и побочных реакций [5].

Современные экспериментальные системы для изучения рака человека включают: двумерные линии раковых клеток, 3D-модели органоидов, живые организмы, такие как *Drosophila melanogaster, Danio rerio* (зебрафиш), генетически модифицированные мышиные модели, свиней, ксенотрансплантаты, полученные от пациентов (PDX), а также вычислительные биоинформационные модели рака.

Типы органоидных культур

В течение десятилетий, благодаря своей относительной простоте использования, масштабируемости и низкой стоимости, двумерные клеточные культуры служили краеугольным камнем для изучения биологии раковых клеток и открытия лекарств. Эти модели позволили провести значительную исследовательскую работу над молекулярными механизмами, лежащими в основе опухолеобразования и помогли идентифицировать биомаркеры и лекарственные мишени для терапии пациентов. Вместе с тем, двумерные линии раковых клеток, растущих в культуральной среде или ксенотрансплантаты не способны в полной мере воспроизводить сложность человеческих раковых заболеваний. Ограничения связаны с дефицитом клеток, инициирующих опухоли, отсутствием специфического для человека опухолевого микроокружения (TME) и внеклеточного матрикса (ECM), а также генетической изменчивости, возникающей в результате длительного культивирования и пассажей in vitro. Для моделей ксенотрансплантатов, полученных от пациентов (PDX), доступность образцов, логистические и экономические проблемы, а также этические соображения препятствуют их широкому и всестороннему применению в фундаментальных исследованиях и персонализированной медицине.

Появление трёхмерных органоидныхкультур предложило альтернативный подход, который может преодолеть разрыв между *in vitro* 2D-клеточными линиями и *in vivo*-мышиными моделями для исследования рака. Органоиды могут быть получены из двух типов стволовых клеток: взрослых стволовых клеток (ASC), которые являются тканеспецифичными, или плюрипотентных стволовых клеток (PSC), которые могут быть либо индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (iPSC), либо эмбриональными. В этом обзоре мы специально сосредоточимся на использовании этих органоидных моделей для изучения рака, описывая и сравнивая различные органоидные модели рака, которые представляют различные стадии опухолегенеза, и обсуждая их вклад в исследование рака, а также их ограничения.

Протоколы получения органоидов ASC и PSC принципиально различны. Органоиды ASC поддерживаются различными факторами роста в среде, имитирующими нормальный гомеостаз стволовых клеток. Создание органоидов PSC включает в себя пошаговую дифференциацию посредством добавления факторов роста последовательным образом, который имитирует клеточную сигнализацию во время развития эмбриона. Полученные модели рака также имеют явные преимущества и недостатки, которые следует учитывать при выборе подходящей модели для исследования. Тем не менее, органоиды ASC и PSC являются взаимодополняющими подходами и вместе они дают возможность изучить весь процесс развития опухоли почти во всех видах рака у человека.

В 2009 году было проведено знаковое исследование, показавшее что трехмерные кишечные органоиды можно создать из кишечных стволовых клеток Lgr5+ мыши [6]. Клетки культивировались в матригеле и поддерживались в долгосрочной культуре с добавлением факторов, регулирующих нишу стволовых клеток (ноггин, R-спондин1 и эпидермальный фактор роста [EGF]). По сути, эта система была разработана для имитации аспектов ниши, в которой обычно находятся кишечные стволовые клетки (ISC). *In vivo* кишечный эпителий организован в миллионы структур крипта-ворсинка, при этом ISC расположены у основания крипт. Кроме того, EGF усиливает пролиферацию крипт посредством активации сигнального пути Ras [7]. Ингибирование передачи сигналов костного морфогенетического белка (BMP) в ворсинках ноггином приводит к образованию многочисленных эктопических криптовых единиц [8]. Примечательно, что для воспроизведения этого в культуре для успешного формирования органоида потребовалось только добавление R-спондина1, EGF и ноггина. Последующее исследование показало, что клетки Панета, находящиеся между стволовыми клетками Lgr5+, поставляли источник Wnt [9]. Матригель предоставил матричный компонент для прикрепления с целью

формирования трехмерных органоидов, поскольку он напоминал богатую ламинином основу кишечных крипт [10]. Эти органоиды имели кишечные крипто-ворсинчатые структуры, содержащие все типы кишечных клеток, повторяющие физиологические кишечные структуры исходной ткани.

Параллельно другая группа разработала альтернативный метод культивирования кишечных органоидов: модель интерфейса «воздух-жидкость» (ALI), которая включала культивирование фрагментов кишечной ткани мыши, содержащих как эпителиальные, так и мезенхимальные клетки в коллагеновой матрице, частично подвергавшейся воздействию воздуха [11]. После этих двух прорывных исследований протоколы были успешно адаптированы для культивирования человеческих органоидов, полученных из ASC, из ряда нормальных тканей, а также соответствующих им раковых опухолей. Улучшения протоколов повысили эффективность формирования органоидов, что позволило создавать опухолевые органоиды из небольших биопсий, мочи, цервикальных мазков и даже циркулирующих опухолевых клеток (CTC). В результате стало возможным создание больших живых биобанков человеческих опухолевых органоидов [12-55].

В последние годы число органоидных биобанков резко возросло, выступая в качестве ценных ресурсов как для фундаментальных и клинических исследований. Органоидные модели стали коммерчески доступными через различные каналы, такие как Human Cancer Models Initiative, American Type Culture Collection или MilliporeSigma. Эти биобанки охватывают широкий спектр моделей опухолей, воспроизводя морфологическую и молекулярную гетерогенность опухолей пациентов. Напротив, многие молекулярные подтипы не имеют репрезентативных 2D линий раковых клеток. Кроме того, были созданы клеточные модели предраковых поражений из органов, таких как кишечные гиперпластические полипы, сидячие зубчатые аденомы (SSA) полипы, тубуловиллезные аденомы, обычные тубулярные аденомы [24, 27, 56], предраковый эндометриоз, гиперплазия эндометрия [18], плоскоклеточная метаплазия шейки матки [57, 58], желудочно-кишечная метаплазия [45, 46], дисплазия желудка [47, 59], эпителий Барретта [55, 60], интраэпителиальная неоплазия поджелудочной железы (PanIN) [41], и ряд предраковых заболеваний печени [61]. Дополнительные органоиды ASC были получены от пациентов, имеющих гетерозиготные мутации генов предрасположенности к раку зародышевой линии [56, 62, 63]. Сравнение органоидов, полученных из опухоли, и исходной опухолевой ткани с использованием анализов на основе мультиомики подтверждает, что органоиды стабильно сохраняют молекулярный спектр родительской опухоли в долгосрочной культуре [27, 47, 64-67].

Проблемы получения органоидов

В работах [68, 69]. подробно изложены современные протоколы создания раковых органоидов. Каждый из них был разработан с учетом глубоких биологических знаний органа/типа рака и обширных исследований методом проб и ошибок для повышения эффективности. Условия культивирования нормальных и опухолевых органоидных культур описаны в других работах [13-21, 24, 27, 30-47, 50, 55, 70-78]. Для каждого типа рака были сделаны определенные изменения, чтобы помочь избежать заражения нормальных клеток, а также повысить жизнеспособность раковых стволовых клеток.

Тем не менее, нормальные органоиды в исходной объединенной смеси могут вытеснять опухолевые органоиды и в конечном итоге доминировать в культуре, особенно когда условия культивирования не могут специально благоприятствовать опухолевым клеткам. Поэтому проверка чистоты опухоли с помощью секвенирования всего экзома (WES) или секвенирования панели захвата мишени имеет важное значение, поскольку морфология раковых органоидов часто может быть неотличима от нормальных органоидов. Стратегии по смягчению загрязнения нормальных клеток и повышению эффективности протокола включают изъятие факторов ниши, которые больше не требуются при некоторых видах рака из-за распространенных онкогенных мутаций. Например, изъятие Wnt3a и R-spondin1 значительно улучшило формирование органоидов колоректального рака (КРР) [22], тогда как отмена EGF была эффективна при создании органоидов панкреатической протоковой аденокарциномы (PDAC) [39], поскольку >80% КРР и >90% PDAC несут мутации *APC* и *KRAS* соответственно. При раке желудка добавление nutlin3a при удалении Y-27632, A8301, EGF и FGF10 из культуральной среды также улучшило показатели [45], Аналогичное влияние может оказать и изменение способа получения образцов. Например, отбор проб вдоль серозной стороны желудочно-кишечного тракта повышает чистоту опухоли [47], и ручной сбор опухолевых органоидов во время пассирования может помочь устранить загрязнение нормальными клетками.

Другие методы повышения жизнеспособности опухолевых органоидов включали добавление Y-27632 во время изоляции клеток при культивировании рабдоидных опухолевых органоидов и удаление ингибитора p38 при культивировании органоидов эндометриального рака [18]. Использование бессывороточного, стабилизированного афамином Wnt3a обеспечивает стабильную культуру органоидов PDAC, поскольку сыворотка в стандартной кондиционированной среде Wnt3a запускает клеточное старение органоидов поджелудочной железы [39]. Большинство типов органоидов культивировались в базовой среде, содержащей AdDMEM/F12, HEPES, GlutaMAX и пенициллин/стрептомицин, но с некоторыми исключениями. Даже с модификациями протокола некоторые распространенные типы рака по-прежнему остаются трудно имитируемыми с помощью органоидов, что указывает на необходимость дальнейшей оптимизации протокола. Интересно, что альтернативный метод, называемый условным перепрограммированием, включающий совместное культивирование облученных фибробластных питающих клеток мыши и переваренных первичных здоровых или раковых клеток в присутствии ингибитора ассоциированного белка киназы (ROCK) (Y-27632), позволяет осуществлять долгосрочное культивирование первичных эпителиальных клеток практически из любого типа клеток в течение ста дней, не требуя генетических манипуляций [79, 80]. Эта технология успешно применялась для создания клеточных культур, полученных от пациентов с немелкоклеточным раком легких (НМРЛ) [81], рак от простаты [79], и клеточные культуры аденоидно-кистозной карциномы (АКК) [82]. Условно перепрограммированные клетки рака простаты и АКК вызывали опухоли у мышей с ксенотрансплантацией [79, 82], что предполагает потенциальную альтернативу для типов рака с низким уровнем образования органоидов.

Одно из основных различий между органоидами рака ASC и двумерными линиями раковых клеток заключается в том, что органоиды остаются зависимыми от факторов ниши и взаимодействий клетка-клетка/клетка-матрикс для выживания. В результате, глубокая функциональная характеристика может быть выполнена на органоидах опухоли путем систематического изъятия основных факторов ниши, добавления/изъятия ингибиторов или культивирования в условиях без матрикса [39, 45, 46]. В этом процессе выявляются ассоциации генотип-фенотип, которые возникают во время канцерогенеза. Несколько исследований органоидов рака, полученных из ASC без мутаций в генах WNT, таких как *APC* или *CTNNB1*, раскрыли механизмы, обеспечивающие независимость Wnt/R-спондина [39, 45]. Эти исследования дали представление о вкладе сигнализации Wnt в формирование морфологического разнообразия и гетерогенности клеточных состояний в опухолях. Двойной нокаут *CDH1/TP53* в нормальных желудочных органоидах привел к диффузно-подобному фенотипу GC, который был связан с независимостью R-спондина [45]. Аналогичным образом анализы отмены выявили Wnt- и R-спондин-независимые подгруппы органоидов PDAC [39]. Также оценивалась отмена ингибитора Rock и/или условия роста без Matrigel. Одно исследование органоидов GC показало, что независимость клетка-клетка/клетка-матрикс коррелировала с инфильтративным краем опухоли, прогрессирующей стадией опухоли и метастазами, а также транскриптомной сигнатурой, связанной с более короткой общей и безрецидивной выживаемостью в общедоступных наборах данных пациентов с GC [46]. Опухолевые органоиды, выделенные из более глубокой подслизистой оболочки рака желудка на ранней стадии, в меньшей степени зависели от межклеточной адгезии по сравнению с парными опухолевыми органоидами, выделенными из поверхностной слизистой оболочки, что свидетельствует о том, что разные части опухоли у одного и того же пациента могут вести себя по-разному.

Органоиды сохраняют разнообразие линий и пластичность клеток исходной ткани. Например, здоровые органоиды простаты и груди содержат люминальные и базальные клетки-предшественники, которые дают начало как базальным, так и люминальным линиям [62, 76]. Примечательно, что эпителиальные органоиды молочной железы, полученные от носителей мутации BRCA1, показали более высокую долю люминальных предшественников, что отражает увеличение люминальных предшественников, которые служат популяцией, инициирующей рак, у носителей мутации BRCA1. Секвенирование РНК отдельных клеток показало, что органоиды, полученные из опухоли Вильмса, состоят из трех различных типов клеток (эпителиальных, стромальных и бластематических) [30], и органоиды рака толстой кишки дикого типа *APC* со слиянием *RSPO* сохранили свой потенциал дифференциации после отмены Wnt, подобно здоровым органоидам толстой кишки [27]. Добавление или удаление экзогенных Wnt3a и R-спондина

способно регулировать спецификацию гистологического подтипа и клеточную пластичность желудочного рака диффузного типа или нормальных желудочных органоидов с двойным нокаутом *CDH1/TP53* , позволяя им адаптироваться к форме перстневидных или неперстневидных клеток соответственно [49]. Эти наблюдения тесно связаны с ситуацией *in vivo* в человеческом GC, где клетки перстневидного типа видны в областях с низким RSPO3, а диффузная морфология клеток без перстневидного типа связана со стромальной экспрессией RSPO3.

Аналогично, PDAC можно транскрипционно разделить на два состояния клеток: более агрессивное базальноподобное и классическое. Используя секвенирование РНК отдельных клеток, исследование выявило промежуточное состояние клеток, через которое могут проходить раковые клетки при переходе между классическим и базальноподобным состояниями [83]. Примечательно, что исследование с использованием биопсий пациентов и соответствующих органоидов показало, что органоиды имели тенденцию к потере базального состояния *in vitro*, которое затем можно было восстановить путем изъятия основных факторов ниши в культуральной среде. Органоиды, обработанные TGF-β, были направлены в сторону более агрессивного, базальноподобного состояния, тогда как изъятие TGF-β приводило к тому, что органоиды возвращались в классическое состояние. Эти результаты предполагают, что условия роста или микросреда могут модулировать пластичность клеток и состояния клеток. Различные состояния клеток затем приводят к различной чувствительности к противораковым препаратам. Эти данные согласуются с другим исследованием по отслеживанию линий, в котором органоиды PDAC, экспрессирующие многоцветные флуоресцентные белки, были трансплантированы мышам. Эксперимент показал, что классические и базальные фенотипы могут быть получены из одной привитой клетки [84]. Таким образом, подтип опухоли в большей степени определялся микроокружением, а не только генетикой.

Эта работа ясно показывает, что органоиды имеют большие перспективы для будущих исследований механизмов пластичности опухолей и переходов состояний клеток при раке человека, двух процессов, которые невозможно изучить в клеточных линиях из-за их ограниченной гетерогенности. В сочетании с редактированием CRISPR-Cas9 для включения репортеров, отслеживанием линий и кассетами абляции в раковые органоиды с последующей ксенотрансплантацией мышам, технология органоидов может быть дополнительно использована для оценки субпопуляций опухолевых клеток, включая раковые стволовые клетки, а также во время инициации рака, метастазирования и переносимости лекарств. Например, *EGFP* и кассеты отслеживания линий, включенные в локус *LGR5* в органоидах CRC, полученных от пациентов, подтвердили, что раковые стволовые клетки EGFP-LGR5+ инициируют опухолевые ксенотрансплантаты с высокой эффективностью и что опухолевые клетки принимают иерархическую организацию, напоминающую организацию нормального эпителия толстой кишки [85]. В двух других исследованиях проводилась ксенотрансплантация органоидов CRISPR-инженерии колоректального рака с использованием кассет абляции, специфичных к *LGR5,* для наблюдения за эффектом уничтожения стволовых клеток рака LGR5+ в опухолях [86, 87]. В обоих исследованиях устранение клеток LGR5+ изначально блокировало рост опухоли, но после того, как специфическая абляция *LGR5* была отключена, повторный рост опухоли был вызван популяцией клеток Lgr5− из дифференцированных линий, которые регенерировали клетки Lgr5+. Метастазы в печень были отложены до повторного появления этих клеток Lgr5+.[85]Ксенотрансплантированные органоиды, несущие индуцируемый репортер Lgr5-EGFP-Confetti, продемонстрировали, что метастазы в печени засеиваются клетками Lgr5−, но метастатический рост зависит от повторного появления клеток Lgr5+ [88]. Система отслеживания генетической линии в ксенотрансплантированных органоидах человеческого рака колоректального рака выявила спящие клетки LGR5+p27+, которые обеспечивали обратимое состояние лекарственной устойчивости, зависящее от адгезии к *COL17A1* на границе раздела, клетка-матрица [89]. Аналогичным образом, другое исследование по отслеживанию происхождения выявило отдельную популяцию стволовых клеток КРР, состоящую из латентных клеток Lgr5+ с высокой экспрессией Mex3a, которые могли подавлять программу генов Wnt/стволовых клеток, чтобы защитить себя от химиотерапии, и стали преобладающей остаточной популяцией опухоли после лечения [90]. В то же время другое исследование показало, что остаточные опухолевые клетки, ответственные за рецидив колоректального рака, характеризовались высокой экспрессией EMP1, а абляция клеток EMP1+ с помощью CRISPR предотвратила рецидив метастазов у мышей с ксенотрансплантацией [91].

Способность сохранять внутриопухолевую гетерогенность и субклональную архитектуру

первичной опухоли является еще одной уникальной особенностью раковых органоидов. В когорте органоидов GC несколько случаев показали субпопуляции клеток с онкогенной амплификацией *ERBB2* или *FGFR2* и без нее, имитируя региональную гетерогенность, наблюдаемую в опухолевой ткани *in vivo*. Поразительно, но эта гетерогенность сохранялась в долгосрочной культуре. Также было показано, что раковые органоиды сохраняют вирусные геномы в долгосрочной культуре, что позволяет проводить исследования инфекционно-ассоциированных видов рака. Органоиды, полученные из карцином желудка или носоглотки (НПК), ассоциированных с вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ), смогли сохранить вирусный геном ВЭБ и вирусную латентность [35, 47], в отличие от большинства клеточных линий 2D NPC, которые уже утратили свои геномы EBV. Таким образом, раковые органоиды более точно воспроизводят первичную опухоль по сравнению с клеточными линиями 2D, предлагая мощный инструмент для исследования сигнальных путей, внутриопухолевой гетерогенности и инфекционно-ассоциированного опухолеобразования.

Возможность культивировать здоровые эпителиальные клетки из самых разных органов открывает перспективы для изучения поэтапного развития рака и понимания последствий воздействия канцерогенов окружающей среды. Рак эпителиальных органов является наиболее распространенным злокачественным новообразованием, связанным со старением населения, но факторы, вызывающие накопление соматических мутаций в ASC, и то, как они способствуют злокачественной трансформации, не до конца изучено.

Кишечная крипта предлагает уникальную модель для изучения соматических мутаций и клональной экспансии. Объединенные органоидные культуры, полученные из слизистой оболочки кишечника , как правило, являются поликлональными и получены из набора многих желез, причем каждая отдельная крипта характеризуется субклональными соматическими мутациями, которые в основном состоят из мутаций-пассажиров. ISC конкурируют в пределах отдельных крипт, в конечном итоге дрейфуя в сторону моноклональности. Таким образом, клонированные органоиды из отдельных нормальных клеток позволяют проводить функциональные исследования, которые могут быть бесценны для понимания процессов, связанных с раком. Например, клонированные органоиды, выделенные от пациентов с язвенным колитом, показали повторяющиеся мутации усечения, которые часто были биаллельными и включали путь IL-17-NF-κB, что согласуется с клональной экспансией, наблюдаемой в тканях язвенного колита [92-94]. Хотя эти мутации не были обогащены при раке, они придавали устойчивость к апоптозу, вызванному ИЛ-17А, в клонированных органоидах, улучшая выживаемость клеток в воспалительной среде.

Клонированные здоровые органоиды также можно подвергать длительному культивированию в отсутствие или в присутствии лекарственных препаратов, инфекционных агентов или с использованием редактирования генов CRISPR-Cas9 для выявления врожденной генетической нестабильности, характеристики мутационных сигнатур и идентификации мутагенных агентов. В конечной точке культивирования может быть выполнен последний этап клонирования для расширения отдельных клонированных клеток для секвенирования. Впоследствии мутации из родительского клона отфильтровываются для выявления мутаций, которые были приобретены *in vitro*.

В одном исследовании CRISPR-Cas9 использовался для удаления генов репарации ДНК, *MLH1* и *NTHL1*, с последующим субклонированием и WGS. Они обнаружили, что органоиды с дефицитом *MLH1* имели мутационный профиль, соответствующий CRC с дефицитом репарации несоответствий, тогда как органоиды с дефицитом *NTHL1* имели профиль, связанный с мутационной сигнатурой, которая ранее была выявлена у одной пациентки с раком молочной железы с бессмысленной мутацией зародышевой линии в *NTHL1* [95]. Кроме того, воздействие на кишечные органоиды комбинации двух препаратов, ганцикловира (GCV) и микофенолата мофетила (MMF), воссоздало мутационную сигнатуру, наблюдаемую у пациента с колоректальным раком, который ранее получал эти два препарата для лечения цитомегаловирусной инфекции и реакции «трансплантат против хозяина», что позволяет предположить, что мутационная сигнатура в органоидах была вызвана GCV и дополнительно усилена MMF [96]. Напротив, нормальные желудочные или кишечные органоиды пациентов с синдромом Линча, имеющих гетерозиготную мутацию зародышевой линии , не демонстрировали повышенных показателей мутаций , что указывает на отсутствие гаплонедостаточности до установления второй инактивирующей мутации [63].

Повторение мутационных сигнатур в органоидах может быть достигнуто путем

инфицирования микробами. Так, кишечные органоиды, подвергавшиеся в течение 5 месяцев повторным люминальным инъекциям генотоксичных *pks* $^{+}$ *Escherichia coli*, патогена, известного тем, что он вызывает двухцепочечные разрывы ДНК в культивируемых клетках, продемонстрировали мутационную сигнатуру, также наблюдаемую в подгруппе пациентов с КРР, но не при других типах рака. Это открытие подразумевает прошлое воздействие pks+ *E. coli* как потенциальный канцерогенный фактор у этих пациентов [97]. Здоровые человеческие органоиды также были инфицированы другими типами микробов, включая бактерии и вирусы, которые, как известно, связаны с развитием рака. Примерами являются инфицирование человеческих желудочных органоидов *Helicobacter pylori*, патогеном, вызывающим язву желудка и GC, что приводит к воспалительной реакции, обычно наблюдаемой *in vivo* [50] и увеличение пролиферации эпителия [98]. В другом исследовании были получены органоиды из нормальной ткани слизистой оболочки полости рта человека и подвергнуты отдельному инфицированию вирусами простого герпеса и папилломавируса человека [21]. Обе органоидные линии показали увеличение вирусной ДНК, которое сохранялось даже после пассирования, что подразумевает длительную инфекцию. Кроме того, модель iPSC и ASC подчеркивает потенциал моделей органоидов печени человека для изучения инфекции вируса гепатита B (HBV) и репликации *in vitro*, с возможным будущим применением для исследования прогрессирования HBV в HCC [99, 100]. Эти исследования способствовали разработке методологий для изучения участия микробиома в развитии опухолей, которое ранее было плохо изучено из-за отсутствия надлежащих моделей *in vitro* и на животных.

Создание опухолевых органоидов непосредственно из образцов пациентов остается сложной задачей. В качестве альтернативы органоиды ASC могут быть получены из генетически модифицированных мышиных моделей (GEMM) и быстро расширены *in vitro* для создания биобанков [101, 102]. Нормальные или ранние неопластические органоиды человека или GEMM служат хорошим инструментом для изучения ранних путей эволюции рака. Исследование совместного культивирования показало, что органоиды мыши с мутацией Apc секретируют Notum. Когда эти органоиды с мутацией Apc были совместно культивированы с кишечными органоидами мыши дикого типа, Notum подавлял рост органоиды дикого типа, заставляя ISC дикого типа дифференцироваться и вызывая клональную фиксацию ISC с мутацией Apc [103, 104]. В соответствии с этими результатами лечение ингибитором Notum до индукции мутации Apc у мышей снижало образование аденом. Эти исследования подчеркивают, как генетические мышиные модели и органоиды могут работать в синергии и использоваться для существенного ускорения научных открытий. Органоиды мышей легко геномно редактировать, чтобы вызвать мутации драйверов, и их можно привить сингенным и иммунокомпетентным мышам для моделирования опухолегенеза и метастазирования. Например, для моделирования развития CRC органоиды мышей, несущие различные комбинации мутаций драйверов, полученные либо из опухолей/метастазов GEMM, либо посредством редактирования генов *ex vivo* , были трансплантированы в стенку слепой кишки сингенных мышей для аутохтонного образования опухолей и развития метастазов [102, 105, 106]. Подобные модели подтвердили роль сигнализации TGF-β в микросреде опухоли в стимуляции уклонения от иммунного ответа и опосредовании метастазов рака. В другом исследовании была создана мышиная модель рака толстой кишки, подобная человеческой, и были идентифицированы клетки EMP1 $^{+}$ как клетки, вызывающие метастатический рецидив [91]. Аналогичным образом органоиды опухолей молочной железы можно получить из опухолей GEMM в течение 2-3 недель и ортотопически трансплантировать для формирования опухолей, которые повторяют эпителиальную морфологию и реакцию на лекарственные препараты исходной опухоли [101]. Также были разработаны иммунокомпетентные органоидные мышиные модели рака яичников [107] и аденокарцинома легких [108], которые представляют более надёжную платформу для изучения патогенеза рака по сравнению с GEMM, создание которых является трудоёмким и технически сложным процессом.

CRISPR-Cas9 использовался для создания здоровых органоидов с комбинацией драйверных мутаций для воссоздания рака. Два основополагающих исследования одновременно продемонстрировали, что сочетание сконструированных мутаций *APC , TP53 , KRAS* или *PIK3CA* и *SMAD4* привело к образованию человеческих кишечных органоидов с ростом, независимым от всех факторов ниши стволовых клеток, и способностью формировать опухолевые трансплантаты с признаками инвазивной карциномы у мышей [109, 110]. Ортотопическая трансплантация этих четверных мутантных органоидов в слепую кишку мыши вызвала макроскопические метастазы в

легкие и печень [111]. Сверхэкспрессия Noggin в человеческих органоидах с тройным нокаутом (*APC* $^{-/-}$, *TP53* $^{-/-}$ и *KRAS* ^{G12D}), которая имела ограниченный потенциал роста *in vivo*, когда Noggin не был сверхэкспрессирован, привела к метастазам в печени, аналогичным органоидам с четверным мутантом. Поскольку эти органоиды могли расти независимо от всех факторов ниши, результаты повышают вероятность того, что независимость ниши может опосредовать метастазирование. Однако нельзя исключать и другие, пока неизвестные факторы. Например, первичный CRC, полученный от пациента, и парные метастатические органоиды всегда демонстрировали конкордантную зависимость от фактора ниши, а некоторые метастатические органоиды печени, полученные от пациента, оставались в высокой степени зависимыми от них [24]. Нестабильность хромосом также может быть способствующим фактором [110-116].

Опубликовано несколько моделей, описывающих путь зубчатой неоплазии CRC. В одном исследовании были сконструированы крупные хромосомные перестройки для генерации генов слияния R-спондина вместе с мутациями *BRAFV*^{600E} и *TP53* в органоидах толстой кишки человека [117-120]. Ксенотрансплантация этих органоидов в толстую кишку мыши привела к образованию зубчатых поражений, воспроизводящих морфологию человеческих SSA. Сверхэкспрессия *GREM1* в дополнение к *BRAFV* ^{600E}, нокауту *TP53* и слиянию R-спондина в органоидах привела к образованию ксенотрансплантатов, которые образовывали полиповидные опухоли у мышей с гистологическими признаками, похожими на традиционные зубчатые аденомы. Интересно, что человеческие SSA-органоиды RNF43 $^{-/-}$ были менее зависимы от R-спондина по сравнению с нормальными толстокишечными органоидами, что обеспечивает функциональную поддержку патогенной роли мутации RNF43 в пути зубчатой неоплазии [56]. В другом исследовании нормальные органоиды толстой кишки, сконструированные с мутацией *BRAF* ^{V600E}, подвергались лечению TGF-β. TGF-β и вызывали апоптоз в нормальных органоидах, но не в мутантных органоидах *BRAF* ^{V600E}, которые вместо этого вызывали эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) и транскрипционный профиль, имитирующий те, которые наблюдаются в зубчатых неоплазиях человека [121]. Помимо генетических поражений, вызванных мутациями генов-драйверов рака, роль нестабильности хромосом во время прогрессирования опухоли также может быть изучена с использованием органоидов. В частности, нормальные органоиды толстой кишки, сконструированные с пятью мутациями-драйверами опухоли (*APC, SMAD4, TP53, KRAS* ^{G12V} и *PIK3CA* ^{E545K}), были способны образовывать микрометастазы в печени после инъекции в селезенку мышей [110]. Напротив, хромосомно нестабильные аденомные органоиды, сконструированные с тремя драйверами (*SMAD4, TP53, KRAS* ^{G12V} или *PIK3CA* ^{E545K}), индуцировали макрометастазы в печени, образуя крупные метастатические опухоли, демонстрирующие гистологическую злокачественность. С постоянно растущей доступностью пренеопластических или ранних неопластических органоидных моделей, которые охватывают различные формы генетических или эпигенетических аберраций, исследователи теперь имеют беспрецедентные возможности для уточненного изучения факторов, способствующих возникновению опухолей.

Геномные скрининги CRISPR также использовались в нормальных органоидах для выявления целей онкогенеза. Два исследования проводили скрининг CRISPR-Cas9 в кишечных органоидах человека и выявили основные мишени, которые обеспечивают устойчивость к ингибированию роста, опосредованному TGF-β, что необходимо для развития CRC [122, 123]. Аналогичный скрининг был проведен на органоидах желудка мышей, подвергнутых отмене Wnt3a в культуре, для выявления ранее неучтенных факторов, способствующих активации Wnt [124]. В целом, эти исследования в нормальных или ранних неопластических органоидах показали, что редактирование генома нескольких генов-драйверов рака, в последовательности или в комбинации, может моделировать патогенез рака *in vivo*, предоставляя ценную информацию о функциях этих генов в прогрессировании рака. Более того, успех применения скрининга CRISPR по всему геному в нормальных органоидах служит доказательством концепции для ее будущего применения в опухолевых органоидах в качестве средства выявления генетических уязвимостей для ответа на лечение или резистентности.

Органоиды также могут быть получены из PSC, как эмбриональных, так и индуцированных. Человеческие эмбриональные стволовые клетки подчиняются этическим нормам, которые не позволяют их широко использовать. Напротив, iPSC включают перепрограммирование соматических клеток обратно в плюрипотентность. Первый шаг включает направленную дифференциацию iPSC в три зародышевых слоя (энтодерму, эктодерму и мезодерму). Затем клетки культивируются в

трехмерной матрице со специфическими факторами роста и сигнализации, которые направляют их к линиям желаемого органа [125]. Одной из основных задач этой модели является точная имитация in vitro всех биохимических сигналов in vivo , которые управляют дифференциацией клеток и трехмерной организацией тканей в точно правильные моменты времени, в нужных местах и концентрациях, которые будут иметь место во время эмбрионального развития. Органоиды, полученные из PSC, были созданы путем первоначальной обработки человеческих PSC активином А для управления энтодермальной идентичностью, а затем инкубации с FGF4 и Wnt3a для содействия спецификации прямой кишки. Этот протокол в конечном итоге привел к появлению кишечных органоидов, которые экспрессировали специфические кишечные маркеры, такие как CDX2 и KLF5 [126]. С тех пор технология органоидов PSC широко используется для моделирования заболеваний [127, 128]. На сегодняшний день успешно создано множество органоидов, полученных из PSC, в том числе для мозга [129], желудка [98], легких [130], поджелудочной железы [131], пищевода [132], почек [133], печени [134]. Все эти модели дали важные знания о биологии стволовых клеток и развитии органов [135].

Однако одним важным предостережением для использования органоидов, полученных из PSC, для исследования рака является то, что у них отсутствуют приобретенные мутации генов рака , которые органоиды ASC получили непосредственно из опухолевой ткани, сохраненной в культуре. Чтобы обойти эту проблему, были предприняты попытки напрямую перепрограммировать раковые клетки в PSC, чтобы понять неопластические процессы. Однако было относительно мало успешных результатов, большая часть которых в основном касается рака крови, включая PSC, полученных из острого миелоидного лейкоза [136], хронического миелоидного лейкоза [137, 138] и ювенильного миеломоноцитарного лейкоза [139]. Несмотря на то, что iPSC, полученные из лейкозных клеток, несли те же генетические аберрации, они, как правило, не обладали лейкемогенным потенциалом. Однако, когда их индуцировали для дифференциации в гемопоэтические стволовые клетки, их лейкозный фенотип снова проявился [136]. Тем не менее, этот подход дает возможность банкировать лейкозные образцы и изучать взаимодействие между мутациями, специфичными для пациента, и фенотипами заболевания. Альтернативной стратегией является инженерия онкогенных мутаций в клетках PSC, с последующей индуцированной дифференциацией в определенные органы для моделирования рака поджелудочной железы, легких, желудка, сетчатки и мозга.. Особенно успешным оказался метод создания мозговых органоидов из PSC, где редактирование CRISPR-Cas9 использовалось для создания мозговых органоидов с большим количеством наиболее частых одиночных и комбинированных мутаций, наблюдаемых в опухолях мозга. Полученные неопластические церебральные органоиды представляли собой различные типы опухолей мозга, включая примитивные нейроэктодермальные опухоли центральной нервной системы и глиобластому.

Кроме того, дифференцированные церебральные органоиды, полученные из PSC , использовались в качестве здоровых суррогатов мозга для изучения взаимодействия опухолевых и глиальных клеток. Совместное культивирование церебральных органоидов со стволовыми клетками глиомы или традиционные линии клеток рака легких, можно было моделировать среду мозга и анализировать миграцию клеток и взаимодействие клеток, имитируя вторжение глиобластомы или эпителиальную злокачественную опухоль, которая метастазировала в мозг [140, 141].

Наконец, перепрограммирование нормальных соматических клеток от пациентов с синдромом предрасположенности к раку в PSC использовалось для моделирования различных типов рака у пациентов с мутациями генов APC , GNAS или BRCA1 зародышевой линии.

Тестирование лекарственных препаратов на органоидных моделях

Одним из преимуществ *in vitro* систем по сравнению с животными моделями является их способность к высокопроизводительным скринингам чувствительности к препаратам. В частности, линии раковых клеток десятилетиями использовались для оценки эффективности препаратов перед применением в моделях *in vivo*. Об этом свидетельствуют исследования, проведенные The Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) [142] и The Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (GDSC) [143], целью которых является создание ресурсной базы данных для выявления коррелятивных связей между ответами на лекарства и геномами рака и, в свою очередь, для руководства персонализированным лечением. Аналогичным образом, органоиды, полученные от пациентов с раком, могут быть адаптированы для крупномасштабного роботизированного скрининга лекарств [22]. Исследование, подтверждающее концепцию, с использованием органоидов колоректального рака, полученных от пациентов, проиллюстрировало эффективность цетуксимаба и Нутлина-3а в

отношении ингибирования роста органоидов рака дикого типа *KRAS* и *TP53* [22]. Было проведено множество других анализов скрининга лекарственных препаратов в раковых органоидах, включая молочную железу, мочевой пузырь, печень [31, 32, 144], яичники [36, 51, 145], поджелудочную железу, простату [14, 146], и желудок. Некоторые из полученных *in vitro* реакций на лекарства были дополнительно подтверждены в экспериментах *in vivo* с использованием ксенотрансплантатов. Недавние усовершенствования протоколов позволили проводить скрининг нормальных, прекурсорных и опухолевых органоидов, повысили масштабируемость и расширили область считывания данных от анализов жизнеспособности клеток до высокосодержательного фенотипирования на основе изображений [147, 148]. Были также описаны благоприятные корреляции между генами и лекарственными препаратами:

- органоиды рака молочной железы с повышенной экспрессией *HER2,* которые были чувствительны к афатинибу;

- мутантные желудочные органоидых ARID1A, - чувствительны к атаксии-телеангиэктазии и ингибиторам Rad3-связанной киназы (ATR);

- органоиды рака поджелудочной железы с мутацией *MTAP* - отреагировали на ингибитор PRMT5;

- органоиды рака толстой кишки с эпигенетическим подавлением *CHFR* , которые демонстрировали чувствительность к паклитакселу [148].

Помимо использования раковых органоидов для подтверждения известных ассоциаций генов и лекарств, была тщательно протестирована способность органоидных моделей предсказывать клинические ответы на стандартные терапии. Биобанк метастатического КРР и гастроэзофагеальных органоидов продемонстрировал согласованные ответы между пациентами и раковыми органоидами на стандартное лечение, паклитакселом и 5-фторурацилом [64]. Исследования с другими типами раковых органоидов также продемонстрировали их надежность в прогнозировании терапевтического ответа пациентов [16, 21, 37, 47, 51, 149].

Более того, продольные органоиды PDAC, полученные от одного и того же пациента, отражали постепенное приобретение устойчивости к химиотерапевтическому лечению. Помимо прогнозирования реакции на лекарственные препараты, несколько современных органоидных моделей рака прямой кишки продемонстрировали потенциал для прогнозирования реакции на химиолучевую терапию *in vitro*, а также *in vivo* при приживлении в прямую кишку мыши посредством эндолюминальных инъекций [26, 28]. Примечательно, что в большинстве этих исследований участвовало лишь небольшое количество пациентов, что потребовало проведения более масштабных корреляционных исследований и более длительного наблюдения за пациентами для подтверждения истинного прогностического потенциала этих органоидов, полученных от пациентов.

Еще одной важной задачей скрининга лекарственных средств на основе органоидов является выявление новых терапевтических мишеней. Предварительные исследования скрининга лекарственных средств на различных когортах органоидов показали обнадеживающие данные, предлагающие несколько стратегий лечения онкологических больных, несмотря на необходимость дальнейшей проверки в более крупной когорте раковых органоидов. Например, подгруппа первичных органоидов рака печени показала ингибирование роста при лечении ингибитором внеклеточной сигнально-регулируемой киназы (ERK) (SCH772984), но они были устойчивы к большинству других клинически значимых соединений, которые были протестированы, с результатами, подтвержденными на мышах с ксенотрансплантатами [31]. Кроме того, модель органоида рабдоидного рака у детей и соответствующая модель PDX выявили неддиляцию как привлекательную терапевтическую цель [150]. Что еще более важно, это исследование оценило токсичность ингибитора неддиляции, MLN4924, на здоровых тканях, включая почки, гепатоциты и органоиды тонкого кишечника, подчеркнув возможность использования нормальных органоидов для тестирования токсичности.

В другом исследовании была создана панель биспецифических антител двойного нацеливания против раковых стволовых клеток, а биобанк органоидов CRC, полученных от пациентов, использовался для функционального скрининга [29]. При этом парные здоровые органоиды применялись для оценки токсичности терапевтических антител на ранней стадии разработки. Исследование успешно идентифицировало потенциальное терапевтическое биспецифическое антитело с плечом EGFR и LGR5 , MCLA-158, против нескольких типов эпителиального рака,

экспрессирующих LGR5. Хотя органоиды рака ASC являются исследовательской моделью для выявления взаимодействий между лекарственными средствами и генами, органоиды, полученные из ASC или PSC с онкогенными мутациями, созданными с помощью CRISPR, имея низкий фон соматических мутаций, могут точно идентифицировать синтетических летальных партнеров или препараты (отдельно или в комбинации), которые могут воздействовать на определенные гены или пути. Например, высокопроизводительный скрининг >2000 малых молекул в желудочных органоидах с нокаутом ARID1a/TP53 идентифицировал чувствительность мутантных клеток ARID1a к ингибиторам гистондеацетилазы и сурвивина [118]. Аналогичным образом был проведен скрининг малых молекул для эпигенетических препаратов на органоидах рака мочевого пузыря, полученных от мышей, несущих мутации *Trp53, Rb1* и *Pten*, а также сверхэкспрессию *Kras* и *c-Myc,* что позволило идентифицировать *Sirt1* как терапевтическую мишень [151]. Кроме того, был успешно проведен скрининг лекарственных препаратов, содержащих небольшую панель ингибиторов EGFR, на неопластических церебральных органоидах, полученных изPSC [115]. Несмотря на то, что для лечения требовался длительный период в 40 дней, это исследование продемонстрировало ингибирующий рост афатиниба на подгруппе органоидов GBM с повышенной активацией EGFR. По сравнению с нормальными органоидами сетчатки, лечение карбоплатином, рапамицином или двумя ингибиторами селезеночной тирозинкиназы (SYK) вызывало апоптоз клеток в моделях органоидов ретинобластомы, полученных из PSC, с дефектом RB1 , что предоставило альтернативную модель, помимо клеточных линий ретинобластомы человека , для дальнейшей проверки их эффективности [120]. Наконец, органоиды, полученные из ASC из проверенных моделей трансгенных мышей, позволяют быстро охарактеризовать реакции на лекарственные препараты и их клеточные, механистические, функциональные и фармакологические эффекты. Желудочные органоиды, полученные из образцов опухолей моделей трансгенных мышей с определенными мутациями, представляющими различные подтипы GC, показали различные реакции на лекарственную терапию *in vitro* [152]. Другое исследование показало, что линии диффузных клеток рака желудка, а также желудочные органоиды, полученные из трансгенной мышиной модели рака желудка диффузного типа, экспрессирующие $RhoA^{Y42C/+}$ в сочетании с потерей *Cdh1*, были чувствительны к ингибиторам фокальной адгезивной киназы (FAK), что подтверждает актуальность FAK в качестве терапевтической мишени при этом типе рака [153].

Таким образом, парные модели органоид-мышь позволяют эффективно, и параллельно тестировать реакцию на лекарственные препараты, обусловленные конкретным набором геномных аберраций, обеспечивая беспристрастный и воспроизводимый анализ.

Хотя модели PDX считаются надёжным представлением опухолей *in vivo*, они характеризуются высокой стоимостью, имеют низкий процент успеха трансплантации и требуют длительного времени культивирования. Модели органоидных ксенотрансплантатов, полученные от пациентов, выглядят более предпочтительно. Наиболее простой метод заключается в подкожной инъекции здоровых, раковых или генетически модифицированных органоидов совместно с матригелем в мышей [109, 119, 153], которая не требует продвинутых хирургических навыков для выполнения и дает легко наблюдаемые показания. Однако подкожная трансплантация органоидов может иметь низкие показатели приживления и не воспроизводит естественную микросреду опухоли, поскольку отсутствие сосудистой сети препятствует поставке нишевых факторов, необходимых для роста опухоли. Для преодоления этого ограничения нескольким группам несколько групп вводили раковые/сконструированные органоиды в почечную субкапсулу или селезенку голых мышей, обе из которых являются высоковаскулярными средами, которые обеспечивают обильное снабжение пересаженных органоидов питательными веществами, гормонами, факторами роста и кислородом, значительно увеличивая скорость приживления [21, 110]. Трансплантированные клетки могут напрямую попадать в кровоток и метастазировать в печень, где они размножаются в направлении вторичных поражений, что делает ее идеальной платформой для изучения метастазов в печени человеческих опухолей. Тем не менее, эта модель все еще не может воспроизвести естественную микросреду опухоли рака. Это ограничение проиллюстрировано исследованием, в котором Wnt и R-спондин-зависимые GC-органоиды не смогли прижиться в почечной субкапсуле, если они не были совместно введены с Wnt и R-спондин-продуцирующими фибробластами, полученными из кишечных органоидов [45].

Было разработано несколько моделей ортотопических ксенотрансплантатов, предлагающих более физиологически релевантную микросреду для формирования ксенотрансплантата. Однако

они предполагают сложные и инвазивные хирургические процедуры. По сравнению с почечной капсулой или подкожным пространством, среда нативной ткани обеспечивает факторы роста, которые поддерживают приживление органоида, о чем свидетельствует повышенная эффективность ксенотрансплантата органоидов GC диффузного типа в толстой кишке, скорее всего, из-за наличия Wnt и R-спондина в этой среде [49]. До настоящего времени раковые органоиды вводились непосредственно в хвостовую часть поджелудочной железы, серозную оболочку желудка, и яичниковую сумку мышей NGS, причем каждое из этих исследований демонстрировало способность органоида воспроизводить опухолеобразующий процесс. В нескольких исследованиях также была успешно выполнена ортотопическая трансплантация органоидов мыши в слизистую оболочку слепой кишки, что не требовало хирургических разрезов [102, 105, 106]. Этот метод впоследствии был адаптирован для трансплантации органоидов колоректального рака полученных из толстой кишки человека в толстую кишку мышей [154]. Такие методы позволяют проводить эндоскопический мониторинг формирования ксенотрансплантата и могут применяться к нормальным человеческим органоидам для отслеживания клеточных линий *in vivo*. В другом исследовании сообщалось, что чувствительность к препаратам *in vitro* может быть воспроизведена в их ортотопической модели *in vivo* [37]. В целом эти работы подчеркивают высокую ценность моделей ортотопических ксенотрансплантатов на основе органоидов для углубления нашего понимания опухолеобразования в соответствующем физиологическом контексте.

Проблемы и перспективы применения органоидных технологий

Несмотря на то, что технология органоидов произвела революцию в исследовании рака и имеет широкий спектр потенциальных применений, она все еще сталкивается с техническими ограничениями. Хотя органоиды, полученные из опухолей ASC, как правило, геномно стабильны [13, 31, 32, 47], существуют исключения. Как обсуждалось выше, нормальные органоиды, полученные из объединенных кишечных желез, могут дрейфовать в сторону клонального доминирования при длительном культивировании [27], что ограничивает их использование для полногеномных скринингов CRISPR. Органоиды также могут получать новые мутации в долгосрочной культуре, хотя такие мутации, как правило, субклональные, случайные и в основном затрагивают некодирующие области. Органоиды с присущей им геномной нестабильностью могут приобретать мутации быстрее, как показано в исследовании с микросателлитным нестабильным опухолевым органоидом [17]. Интересно, что такая присущая нестабильность была использована для моделирования ранних стадий эволюции опухолей. Например, одно исследование отслеживало изменения числа копий хромосом в желудочных органоидах, сконструированных с мутацией *TP53*, и отметило прогрессирующую анеуплоидию в течение 2 лет [155]. Даже когда геномные и мутационные профили органоидов стабильны, фенотипическая нестабильность может быть результатом изменений условий роста. Подгруппа органоидов уротелиального рака продемонстрировала люминальный подтип в родительской опухоли, но затем перешла в базальный подтип как органоиды, несмотря на отсутствие обнаруживаемых изменений в частоте субклональных мутаций. Эти базальные органоиды затем вернулись к люминальному фенотипу при выращивании в качестве ксенотрансплантатов, что предполагает, что условия культивирования органоидов по сравнению со средой ксенотрансплантата были ответственны за эту фенотипическую пластичность. Очевидно, что лучшее понимание факторов, которые модулируют фенотипы, приведет к улучшению моделей органоидов. Уже сейчас модификация факторов роста привела к улучшению спецификации секреторной линии в кишечных органоидах и спецификация гепатоцитов в органоидах печени. Культивирование в гипоксических или независимых от прикрепления условиях также может обеспечить преимущество отбора опухолевых органоидов по сравнению с нормальными [20, 24, 46].

В настоящее время высокопроизводительные скрининги лекарств с использованием органоидов в основном включают препараты, которые оказывают прямое воздействие на опухолевые клетки. Если не использовать более сложные модели совместного культивирования, органоиды сами по себе не дадут полезных результатов при скрининге лекарств, которые блокируют взаимодействия опухоль-строма или опухоль-иммунитет. Наличие нишевых факторов может еще больше ограничить типы малых молекулярных ингибиторов, используемых в скринингах. Например, ингибиторы BMP и TGF-β требуются во время рутинного культивирования органоидов, что предотвращает использование связанных агонистов из списка лекарств. Скрининг

ингибиторов Wnt возможен только при наличии аутокринной продукции Wnt опухолевым органоидом, но он не сможет смоделировать блокировку источника Wnt из опухолевой стромы. Преобладание пролиферативных стволовых клеток в культурах органоидов может преувеличивать их реакцию на препараты, нацеленные на клеточный цикл. Наконец, было показано, что условия культивирования и размер органоида изменяют пластичность клеток, как показано в органоидах PDAC и CRC, что, в свою очередь, может влиять на реакцию на лекарства [83, 156]. По этой причине открытия, основанные на скрининге органоидных препаратов, потребуют обширной проверки посредством доклинических исследований и клинических испытаний.

Современные подходы культивирования органоидов включают некоторые компоненты микросреды, такие как стромальные клетки , сосудистую сеть и иммунные клетки, в органоиды, чтобы сделать их более физиологически значимыми. Органоиды опухоли поджелудочной железы, совместно культивируемые с ассоциированными с раком фибробластами, показали, что экзогенное поступление Wnt из стромы может увеличить опухолеобразующий потенциал Wnt-зависимых клеток PDAC. Кроме того, совместное культивирование опухолевых органоидов и аутологичных Т-клеток привело к увеличению количества Т-клеток, специфичных для опухоли, реактивных у пациента, что является потенциальной клинической стратегией для адаптивного переноса Т-клеток [157].

Другой подход включал модель на основе 3D-биопечати, которая состояла из воссоздания органоидов рака мочевого пузыря в 3D с ключевыми компонентами тканевой стромы, включая ассоциированные с раком фибробласты, эндотелиальные клетки и гладкомышечные клетки, создавая многослойный «ассемблеоид» [11]. Эндотелиальные клетки способны формировать функциональные сосудистые сети, которые могли поддерживать рост опухоли. Анализ ассемблеоида выявил паракринную петлю, посредством которой секретируемый фибробластами BMP индуцировал экспрессию *FOXA1* в опухоли, что, в свою очередь, приводило к перепрограммированию энхансера для придания пластичности подтипа опухоли. Ассемблеоиды также были менее чувствительны к химиотерапевтическим препаратам по сравнению с обычными органоидами опухоли мочевого пузыря. Кроме того, была описана модель «Organ-On-VascularNet», которая включала совместное культивирование человеческого CRC или нормальных кишечных органоидов с модифицированной формой эндотелиальных клеток, которые сверхэкспрессируют эмбрионально-ограниченный фактор транскрипции 2 (ETV2) E26, специфичный для трансформации (ETS), что приводило к образованию проницаемой сосудистой сети [158]. Эта модель совместного культивирования показала, что повышение регуляции генов связано с плохим прогнозом и метастазами в органоидах CRC. Метод ALI был успешно адаптирован для создания 100 опухолевых органоидов ALI из 28 различных типов рака [159]. Другой метод генерировал микроорганосферы из игольчатых биопсий опухолей пациентов. Опухоли были переварены в суспензионные клетки в матригеле, затем смешаны с маслом для создания капель на основе микрофлюидики для последующего культивирования и скрининга лекарств, что позволило считывать данные через 14 дней [160]. Эти модели открывают перспективы для иммуноонкологических исследований. Отдельной задачей остаётся моделирование предраковой микросреды. Взаимодействие между предраковыми клетками и стромальными компонентами играет важную роль в онкогенезе. Действительно, органоиды пищевода Барретта у мышей , совместно культивируемые с нейтрофилами от мышей L2-IL-1B, увеличивают пролиферацию и рост органоидов дозозависимым образом, что предполагает прямое стимулирующее действие нейтрофилов на эпителиальные клетки BE [161]. В дальнейшем перспективным направлением станет разработка методов включения предраковой микросреды в органоидные модели.

Реагенты и протоколы, используемые для органоидной культуры, будь то для пренеопластических исследований или в более общем плане, необходимо будет улучшить и стандартизировать, если органоиды будут использоваться в клинических приложениях. В настоящее время матригель является наиболее широко используемым каркасом в протоколах органоидной культуры. Однако он имеет ряд существенных ограничений, так как он получен от животных, обладает неопределенным составом, нестабилен и варьируется от партии к партии и несет риск переноса иммуногенных компанентов. Все эти факторы препятствуют его использованию в клинической практике. Потенциальным решением могут стать методы суспензионного культивирования в условиях низкого процентного содержания матрицы [147, 162, 164] или использование матриц нового поколения [165] что позволит расширить применимость

органоидов в клинических условиях. Важно отметить, что линии органоидов в настоящее время преимущественно генерируются вручную и каждая лаборатория использует собственные модифицированные протоколы. Для повышения воспроизводимости и масштабируемости необходимо разработать единые стандартизированые и автоматизированые протоколы получения и пролиферации органоидов.

Заключение

Учитывая огромное разнообразие здоровых и раковых органоидов, которые были успешно созданы на сегодняшний день, разработка микрофлюидных методов для скрининга лекарственных препаратов и тестирование их на органоидных моделях в качестве дополнения к рецептам на лекарства имеет положительные терапевтические перспективы для пациентов в ближайшем будущем. Более того, органоидные технологии и их синергия с животными моделями имеют огромный потенциал в диагностике ранних стадий развития раковых заболеваний, тем самым предоставляя возможности для раскрытия эффективных стратегий профилактики рака. Таким образом клеточные биотехнологии открывают путь для их использования в трансляционных исследованиях по профилактике и персонализированном лечении онкологических заболеваний.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Всемирная организация здравоохранения. Global cancer burden growing – amidst mounting need for services [Электронный ресурс]. – URL: https://www.who.int/ru/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services (дата обращения: 06.02.2026).
2. Wang C., Tang Z., Zhao Y., Yao R., Li L., Sun W. Three-dimensional in vitro cancer models: a short review // Biofabrication. – 2014. – V. 6, №2. – P. 022001.
3. Vargo-Gogola T., Rosen J.M. Modelling breast cancer: one size does not fit all // Nat Rev Cancer. – 2007. – V. 7, №9. – P. 659-672.
4. Breitenbach M., Hoffmann J. Cancer models // Front Oncol. – 2018. – V. 8. – P. 401.
5. Schachtschneider K.M., Schwind R.M., Newson J., et al. The oncopig cancer model: an innovative large animal translational oncology platform // Front Oncol. – 2017. – V. 7. – P. 190.
6. Sato T., Vries R.G., Snippert H.J., van de Wetering M., Barker N., Stange D.E., van Es J.H., Abo A., Kujala P., Peters P.J., et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche // Nature. – 2009. – V. 459. – P. 262-265. – DOI: 10.1038/nature07935.
7. Kim K.A., Kakitani M., Zhao J., Oshima T., Tang T., Binnerts M., Liu Y., et al. Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium // Science. – 2005. – V. 309. – P. 1256-1259. – DOI: 10.1126/science.1112521.
8. Korinek V., Barker N., Moerer P., van Donselaar E., Huls G., Peters P.J., Clevers H. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4 // Nat Genet. – 1998. – V. 19. – P. 379-383. – DOI: 10.1038/1270.
9. Sato T., van Es J.H., Snippert H.J., Stange D.E., Vries R.G., van den Born M., Barker N., Shroyer N.F., van de Wetering M., Clevers H. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts // Nature. – 2011. – V. 469. – P. 415-418. – DOI: 10.1038/nature09637.
10. Sasaki T., Giltay R., Talts U., Timpl R., Talts J.F. Expression and distribution of laminin alpha1 and alpha2 chains in embryonic and adult mouse tissues: an immunochemical approach // Exp Cell Res. – 2002. – V. 275. – P. 185-199. – DOI: 10.1006/excr.2002.5499.
11. Ootani A., Li X., Sangiorgi E., Ho Q.T., Ueno H., Toda S., Sugihara H., Fujimoto K., Weissman I.L., Capecchi M.R., et al. Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche // Nat Med. – 2009. – V. 15. – P. 701-706. – DOI: 10.1038/nm.1951.
12. Kim E., Choi S., Kang B., Kong J., Kim Y., Yoon W.H., Lee H.R., Kim S., Kim H.M., Lee H., et al. Creation of bladder assembloids mimicking tissue regeneration and cancer // Nature. – 2020. – V. 588. – P. 664-669. – DOI: 10.1038/s41586-020-3034-x.
13. Lee S.H., Hu W., Matulay J.T., Silva M.V., Owczarek T.B., Kim K., Chua C.W., Barlow L.J., Kandoth C., Williams A.B., et al. Tumor evolution and drug response in patient-derived organoid models of bladder cancer // Cell. – 2018. – V. 173. – P. 515-528.e17. – DOI: 10.1016/j.cell.2018.03.017.
14. Mullenders J., de Jongh E., Brousali A., Roosen M., Blom J.P.A., Begthel H., Korving J., Jonges T., Kranenburg O.W., Meijer R., et al. Mouse and human urothelial cancer organoids: A tool for

bladder cancer research // Proc Natl Acad Sci USA. – 2019. – V. 116. – P. 4567-4574. – DOI: 10.1073/pnas.1803595116.

15. Abdullah K.G., Bird C.E., Buehler J.D., Gattie L.C., Savani M.R., Sternisha A.C., Xiao Y., Levitt M.M., Hicks W.H., Li W., et al. Establishment of patient-derived organoid models of lower-grade glioma // Neuro Oncol. – 2022. – V. 24. – P. 612-623. – DOI: 10.1093/neuonc/noab273.

16. Sachs N., de Ligt J., Kopper O., Gogola E., Bounova G., Weeber F., Balgobind A.V., Wind K., Gracanin A., Begthel H., et al. A living biobank of breast cancer organoids captures disease heterogeneity // Cell. – 2018. – V. 172. – P. 373-386. – DOI: 10.1016/j.cell.2017.11.010.

17. Lõhmussaar K., Oka R., Espejo Valle-Inclan J., Smits M.H.H., Wardak H., Korving J., Begthel H., Proost N., van de Ven M., Kranenburg O.W., et al. Patient-derived organoids model cervical tissue dynamics and viral oncogenesis in cervical cancer // Cell Stem Cell. – 2021. – V. 28. – P. 1380-1396. – DOI: 10.1016/j.stem.2021.03.012.

18. Boretto M., Maenhoudt N., Luo X., Hennes A., Boeckx B., Bui B., Heremans R., Perneel L., Kobayashi H., Van Zundert I., et al. Patient-derived organoids from endometrial disease capture clinical heterogeneity and are amenable to drug screening // Nat Cell Biol. – 2019. – V. 21. – P. 1041-1051. – DOI: 10.1038/s41556-019-0360-z.

19. Li X., Francies H.E., Secrier M., Perner J., Miremadi A., Galeano-Dalmau N., Barendt W.J., Letchford L., Leyden G.M., Goffin E.K., et al. Organoid cultures recapitulate esophageal adenocarcinoma heterogeneity providing a model for clonality studies and precision therapeutics // Nat Commun. – 2018. – V. 9. – P. 2983. – DOI: 10.1038/s41467-018-05190-9.

20. Tanaka N., Osman A.A., Takahashi Y., Lindemann A., Patel A.A., Zhao M., Takahashi H., Myers J.N. Head and neck cancer organoids established by modification of the CTOS method can be used to predict in vivo drug sensitivity // Oral Oncol. – 2018. – V. 87. – P. 49-57. – DOI: 10.1016/j.oraloncology.2018.10.018.

21. Driehuis E., Kolders S., Spelier S., Lõhmussaar K., Willems S.M., Devriese L.A., de Bree R., de Ruiter E.J., Korving J., Begthel H., et al. Oral mucosal organoids as a potential platform for personalized cancer therapy // Cancer Discov. – 2019. – V. 9. – P. 852-871. – DOI: 10.1158/2159-8290.CD-18-1522.

22. Van de Wetering M., Francies H.E., Francis J.M., Bounova G., Iorio F., Pronk A., van Houdt W., van Gorp J., Taylor-Weiner A., Kester L., et al. Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients // Cell. – 2015. – V. 161. – P. 933-945. – DOI: 10.1016/j.cell.2015.03.053.

23. Weeber F., van de Wetering M., Hoogstraat M., Dijkstra K.K., Krijgsman O., Kuilman T., Gadellaa-van Hooijdonk C.G., van der Velden D.L., Peeper D.S., Cuppen E.P., et al. Preserved genetic diversity in organoids cultured from biopsies of human colorectal cancer metastases // Proc Natl Acad Sci USA. – 2015. – V. 112. – P. 13308-13311. – DOI: 10.1073/pnas.1516689112.

24. Fujii M., Shimokawa M., Date S., Takano A., Matano M., Nanki K., Ohta Y., Toshimitsu K., Nakazato Y., Kawasaki K., et al. A colorectal tumor organoid library demonstrates progressive loss of niche factor requirements during tumorigenesis // Cell Stem Cell. – 2016. – V. 18. – P. 827-838. – DOI: 10.1016/j.stem.2016.04.003.

25. Schütte M., Risch T., Abdavi-Azar N., Boehnke K., Schumacher D., Keil M., Yildiriman R., Jandrasits C., Borodina T., Amstislavskiy V., et al. Molecular dissection of colorectal cancer in pre-clinical models identifies biomarkers predicting sensitivity to EGFR inhibitors // Nat Commun. – 2017. – V. 8. – P. 14262. – DOI: 10.1038/ncomms14262.

26. Ganesh K., Wu C., O'Rourke K.P., Szeglin B.C., Zheng Y., Sauvé C.G., Adileh M., Wasserman I., Marco M.R., Kim A.S., et al. A rectal cancer organoid platform to study individual responses to chemoradiation // Nat Med. – 2019. – V. 25. – P. 1607-1614. – DOI: 10.1038/s41591-019-0584-2.

27. Yan H.H.N., Siu H.C., Ho S.L., Yue S.S.K., Gao Y., Tsui W.Y., Chan D., Chan A.S., Wong J.W.H., Man A.H.Y., et al. Organoid cultures of early-onset colorectal cancers reveal distinct and rare genetic profiles // Gut. – 2020. – V. 69. – P. 2165-2179. – DOI: 10.1136/gutjnl-2019-320019.

28. Yao Y., Xu X., Yang L., Zhu J., Wan J., Shen L., Xia F., Fu G., Deng Y., Pan M., et al. Patient-derived organoids predict chemoradiation responses of locally advanced rectal cancer // Cell Stem Cell. – 2020. – V. 26. – P. 17-26.e6. – DOI: 10.1016/j.stem.2019.10.010.

29. Herpers B., Eppink B., James M.I., Cortina C., Cañellas-Socias A., Boj S.F., Hernando-Momblona X., Glodzik D., Roovers R.C., van de Wetering M., et al. Functional patient-derived organoid

screenings identify MCLA-158 as a therapeutic EGFR x LGR5 bispecific antibody with efficacy in epithelial tumors // Nat Cancer. – 2022. – V. 3. – P. 418-436. – DOI: 10.1038/s43018-022-00359-0.

30. Calandrini C., Schutgens F., Oka R., Margaritis T., Candelli T., Mathijsen L., Ammerlaan C., van Ineveld R.L., Derakhshan S., de Haan S., et al. An organoid biobank for childhood kidney cancers that captures disease and tissue heterogeneity // Nat Commun. – 2020. – V. 11. – P. 1310. – DOI: 10.1038/s41467-020-15155-6.

31. Broutier L., Mastrogiovanni G., Verstegen M.M., Francies H.E., Gavarró L.M., Bradshaw C.R., Allen G.E., Arnes-Benito R., Sidorova O., Gaspersz M.P., et al. Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening // Nat Med. – 2017. – V. 23. – P. 1424-1435. – DOI: 10.1038/nm.4438.

32. Nuciforo S., Fofana I., Matter M.S., Blumer T., Calabrese D., Boldanova T., Piscuoglio S., Wieland S., Ringnalda F., Schwank G., et al. Organoid models of human liver cancers derived from tumor needle biopsies // Cell Rep. – 2018. – V. 24. – P. 1363-1376. – DOI: 10.1016/j.celrep.2018.07.001.

33. Van Tienderen G.S., Li L., Broutier L., Saito Y., Inacio P., Huch M., Selaru F.M., van der Laan L.J.W., Verstegen M.M.A. Hepatobiliary tumor organoids for personalized medicine: a multicenter view on establishment, limitations, and future directions // Cancer Cell. – 2022. – V. 40. – P. 226-230. – DOI: 10.1016/j.ccell.2022.02.001.

34. Sachs N., Papaspyropoulos A., Zomer-van Ommen D.D., Heo I., Böttinger L., Klay D., Weeber F., Huelsz-Prince G., Iakobachvili N., Amatngalim G.D., et al. Long-term expanding human airway organoids for disease modeling // EMBO J. – 2019. – V. 38. – P. e100300. – DOI: 10.15252/embj.2018100300.

35. Ding R.B., Chen P., Rajendran B.K., Lyu X., Wang H., Bao J., Zeng J., Hao W., Sun H., Wong A.H., et al. Molecular landscape and subtype-specific therapeutic response of nasopharyngeal carcinoma revealed by integrative pharmacogenomics // Nat Commun. – 2021. – V. 12. – P. 3046. – DOI: 10.1038/s41467-021-23379-3.

36. Kawasaki K., Toshimitsu K., Matano M., Fujita M., Fujii M., Togasaki K., Ebisudani T., Shimokawa M., Takano A., Takahashi S., et al. An organoid biobank of neuroendocrine neoplasms enables genotype-phenotype mapping // Cell. – 2020. – V. 183. – P. 1420-1435.e21. – DOI: 10.1016/j.cell.2020.10.023.

37. Kopper O., de Witte C.J., Lõhmussaar K., Valle-Inclan J.E., Hami N., Kester L., Balgobind A.V., Korving J., Proost N., Begthel H., et al. An organoid platform for ovarian cancer captures intra- and interpatient heterogeneity // Nat Med. – 2019. – V. 25. – P. 838-849. – DOI: 10.1038/s41591-019-0422-6.

38. Tiriac H., Belleau P., Engle D.D., Plenker D., Deschênes A., Somerville T.D.D., Froeling F.E.M., Burkhart R.A., Denroche R.E., Jang G.H., et al. Organoid profiling identifies common responders to chemotherapy in pancreatic cancer // Cancer Discov. – 2018. – V. 8. – P. 1112-1129. – DOI: 10.1158/2159-8290.CD-18-0349.

39. Seino T., Kawasaki S., Shimokawa M., Tamagawa H., Toshimitsu K., Fujii M., Ohta Y., Matano M., Nanki K., Kawasaki K., et al. Human pancreatic tumor organoids reveal loss of stem cell niche factor dependence during disease progression // Cell Stem Cell. – 2018. – V. 22. – P. 454-467. – DOI: 10.1016/j.stem.2017.12.009.

40. Boj S.F., Hwang C.I., Baker L.A., Chio I.I., Engle D.D., Corbo V., Jager M., Ponz-Sarvise M., Tiriac H., Spector M.S., et al. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer // Cell. – 2015. – V. 160. – P. 324-338. – DOI: 10.1016/j.cell.2014.12.021.

41. Driehuis E., van Hoeck A., Moore K., Kolders S., Francies H.E., Gulersonmez M.C., Stigter E.C.A., Burgering B., Geurts V., Gracanin A., et al. Pancreatic cancer organoids recapitulate disease and allow personalized drug screening // Proc Natl Acad Sci USA. – 2019. – V. 116. – P. 26580-26590. – DOI: 10.1073/pnas.1911273116.

42. Gao D., Vela I., Sboner A., Iaquinta P.J., Karthaus W.R., Gopalan A., Dowling C., Wanjala J.N., Undvall E.A., Arora V.K., et al. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer // Cell. – 2014. – V. 159. – P. 176-187. – DOI: 10.1016/j.cell.2014.08.016.

43. Mout L., van Dessel L.F., Kraan J., de Jong A.C., Neves R.P.L., Erkens-Schulze S., Beaufort C.M., Sieuwerts A.M., van Riet J., Woo T.L.C., et al. Generating human prostate cancer organoids from leukapheresis enriched circulating tumour cells // Eur J Cancer. – 2021. – V. 150. – P. 179-189. – DOI: 10.1016/j.ejca.2021.03.023.

44. Wang B., Gan J., Liu Z., Hui Z., Wei J., Gu X., Mu Y., Zang G. An organoid library of salivary gland tumors reveals subtype-specific characteristics and biomarkers // J Exp Clin Cancer Res. – 2022. – V. 41. – P. 350. – DOI: 10.1186/s13046-022-02561-5.

45. Nanki K., Toshimitsu K., Takano A., Fujii M., Shimokawa M., Ohta Y., Matano M., Seino T., Nishikori S., Ishikawa K., et al. Divergent routes toward Wnt and R-spondin niche independency during human gastric carcinogenesis // Cell. – 2018. – V. 174. – P. 856-869. – DOI: 10.1016/j.cell.2018.07.027.

46. Tong Y., Cheng P.S.W., Or C.S., Yue S.S.K., Siu H.C., Ho S.L., Law S.Y.K., Tsui W.Y., Chan D., Ma S., et al. Escape from cell-cell and cell-matrix adhesion dependence underscores disease progression in gastric cancer organoid models // Gut. – 2023. – V. 72. – P. 242-255. – DOI: 10.1136/gutjnl-2022-327121.

47. Yan H.H.N., Siu H.C., Law S., Ho S.L., Yue S.S.K., Tsui W.Y., Chan D., Chan A.S., Ma S., Lam K.O., et al. A comprehensive human gastric cancer organoid biobank captures tumor subtype heterogeneity and enables therapeutic screening // Cell Stem Cell. – 2018. – V. 23. – P. 882-897. – DOI: 10.1016/j.stem.2018.09.016.

48. Seidlitz T., Merker S.R., Rothe A., Zakrzewski F., von Neubeck C., Grützmann K., Sommer U., Schweitzer C., Schölch S., Uhlemann H., et al. Human gastric cancer modelling using organoids // Gut. – 2019. – V. 68. – P. 207-217. – DOI: 10.1136/gutjnl-2017-314549.

49. Togasaki K., Sugimoto S., Ohta Y., Nanki K., Matano M., Takahashi S., Fujii M., Kanai T., Sato T. Wnt signaling shapes the histologic variation in diffuse gastric cancer // Gastroenterology. – 2021. – V. 160. – P. 823-830. – DOI: 10.1053/j.gastro.2020.10.047.

50. Bartfeld S., Bayram T., van de Wetering M., Huch M., Begthel H., Kujala P., Vries R., Peters P.J., Clevers H. In vitro expansion of human gastric epithelial stem cells and their responses to bacterial infection // Gastroenterology. – 2015. – V. 148. – P. 126-136. – DOI: 10.1053/j.gastro.2014.09.042.

51. Hill S.J., Decker B., Roberts E.A., Horowitz N.S., Muto M.G., Worley M.J. Jr., Feltmate C.M., Nucci M.R., Swisher E.M., Nguyen H., et al. Prediction of DNA repair inhibitor response in short-term patient-derived ovarian cancer organoids // Cancer Discov. – 2018. – V. 8. – P. 1404-1421. – DOI: 10.1158/2159-8290.CD-18-0474.

52. Huang L., Holtzinger A., Jagan I., BeGora M., Lohse I., Ngai N., Nostro C., Wang R., Muthuswamy L.B., Crawford H.C., et al. Ductal pancreatic cancer modeling and drug screening using human pluripotent stem cell- and patient-derived tumor organoids // Nat Med. – 2015. – V. 21. – P. 1364-1371. – DOI: 10.1038/nm.3973.

53. Maier C.F., Zhu L., Nanduri L.K., Kühn D., Kochall S., Thepkaysone M.L., William D., Grützmann K., Klink B., Betge J., et al. Patient-derived organoids of cholangiocarcinoma // Int J Mol Sci. – 2021. – V. 22. – P. 8675. – DOI: 10.3390/ijms22168675.

54. Saito Y., Muramatsu T., Kanai Y., Ojima H., Sukeda A., Hiraoka N., Arai E., Sugiyama Y., Matsuzaki J., Uchida R., et al. Establishment of patient-derived organoids and drug screening for biliary tract carcinoma // Cell Rep. – 2019. – V. 27. – P. 1265-1276. – DOI: 10.1016/j.celrep.2019.03.088.

55. Sato T., Stange D.E., Ferrante M., Vries R.G., Van Es J.H., Van den Brink S., Van Houdt W.J., Pronk A., Van Gorp J., Siersema P.D., et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium // Gastroenterology. – 2011. – V. 141. – P. 1762-1772. – DOI: 10.1053/j.gastro.2011.07.050.

56. Yan H.H.N., Lai J.C.W., Ho S.L., Leung W.K., Law W.L., Lee J.F.Y., Chan A.K.W., Tsui W.Y., Chan A.S.Y., Lee B.C.H., et al. RNF43 germline and somatic mutation in serrated neoplasia pathway and its association with BRAF mutation // Gut. – 2017. – V. 66. – P. 1645-1656. – DOI: 10.1136/gutjnl-2016-311849.

57. Chumduri C., Gurumurthy R.K., Berger H., Dietrich O., Kumar N., Koster S., Brinkmann V., Hoffmann K., Drabkina M., Arampatzi P., et al. Opposing Wnt signals regulate cervical squamocolumnar homeostasis and emergence of metaplasia // Nat Cell Biol. – 2021. – V. 23. – P. 184-197. – DOI: 10.1038/s41556-020-00619-0.

58. Maru Y., Kawata A., Taguchi A., Ishii Y., Baba S., Mori M., Nagamatsu T., Oda K., Kukimoto I., Osuga Y., et al. Establishment and molecular phenotyping of organoids from the squamocolumnar junction region of the uterine cervix // Cancers (Basel). – 2020. – V. 12. – P. 694. – DOI: 10.3390/cancers12030694.

59. Min J., Zhang C., Bliton R.J., Caldwell B., Caplan L., Presentation K.S., Park D.J., Kong S.H., Lee H.S., Washington M.K., et al. Dysplastic stem cell plasticity functions as a driving force for neoplastic

transformation of precancerous gastric mucosa // Gastroenterology. – 2022. – V. 163. – P. 875-890. – DOI: 10.1053/j.gastro.2022.06.021.

60. Busslinger G.A., de Barbanson B., Oka R., Weusten B.L.A., de Maat M., van Hillegersberg R., Brosens L.A.A., van Boxtel R., van Oudenaarden A., Clevers H. Molecular characterization of Barrett's esophagus at single-cell resolution // Proc Natl Acad Sci USA. – 2021. – V. 118. – DOI: 10.1073/pnas.2113061118.

61. Nguyen L., Jager M., Lieshout R., de Ruiter P.E., Locati M.D., Besselink N., van der Roest B., Janssen R., Boymans S., de Jonge J., et al. Precancerous liver diseases do not cause increased mutagenesis in liver stem cells // Commun Biol. – 2021. – V. 4. – P. 1301. – DOI: 10.1038/s42003-021-02839-y.

62. Rosenbluth J.M., Schackmann R.C.J., Gray G.K., Selfors L.M., Li C.M., Boedicker M., Kuiken H.J., Richardson A., Brock J., Garber J., et al. Organoid cultures from normal and cancer-prone human breast tissues preserve complex epithelial lineages // Nat Commun. – 2020. – V. 11. – P. 1711. – DOI: 10.1038/s41467-020-15548-7.

63. B.C.H. Lee, P.S. Robinson, T.H.H. Coorens, H.H.N. Yan, S. Olafsson, H. Lee-Six, M.A. Sanders, H.C. Siu, J. Hewinson, S.S.K. Yue, et al. *Mutational landscape of normal epithelial cells in Lynch syndrome patients.* Nat. Commun., 13 (2022), p. 2710. 10.1038/s41467-022-29920-2

64. G. Vlachogiannis, S. Hedayat, A. Vatsiou, Y. Jamin, J. Fernández-Mateos, K. Khan, A. Lampis, K. Eason, I. Huntingford, R. Burke, et al. *Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers.* Science, 359 (2018), pp. 920-926. 10.1126/science.aao2774

65. M. Crespo, E. Vilar, S.Y. Tsai, K. Chang, S. Amin, T. Srinivasan, T. Zhang, N.H. Pipalia, H.J. Chen, M. Witherspoon, et al. *Colonic organoids derived from human induced pluripotent stem cells for modeling colorectal cancer and drug testing.* Nat. Med., 23 (2017), pp. 878-884. 10.1038/nm.4355

66. N. Yucer, R. Ahdoot, M.J. Workman, A.H. Laperle, M.S. Recouvreux, K. Kurowski, D.J. Naboulsi, V. Liang, Y. Qu, J.T. Plummer, et al. *Human iPSC-derived fallopian tube organoids with BRCA1 mutation recapitulate early-stage carcinogenesis.* Cell Rep., 37 (2021), p. 110146. 10.1016/j.celrep.2021.110146

67. M. Breunig, J. Merkle, M. Wagner, M.K. Melzer, T.F.E. Barth, T. Engleitner, J. Krumm, S. Wiedenmann, C.M. Cohrs, L. Perkhofer, et al. *Modeling plasticity and dysplasia of pancreatic ductal organoids derived from human pluripotent stem cells.* Cell Stem Cell, 28 (2021), pp. 1105-1124. 10.1016/j.stem.2021.03.005

68. E. Driehuis, K. Kretzschmar, H. Clevers. *Establishment of patient-derived cancer organoids for drug-screening applications.* Nat. Protoc., 15 (2020), pp. 3380-3409. 10.1038/s41596-020-0379-4

69. M. Fujii, T. Sato. *Somatic cell-derived organoids as prototypes of human epithelial tissues and diseases.* Nat. Mater., 20 (2021), pp. 156-169. 10.1038/s41563-020-0754-0

70. P. Jung, T. Sato, A. Merlos-Suárez, F.M. Barriga, M. Iglesias, D. Rossell, H. Auer, M. Gallardo, M.A. Blasco, E. Sancho, et al. *Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells.* Nat. Med., 17 (2011), pp. 1225-1227. 10.1038/nm.2470

71. L. Broutier, A. Andersson-Rolf, C.J. Hindley, S.F. Boj, H. Clevers, B.K. Koo, M. Huch. *Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation.* Nat. Protoc., 11 (2016), pp. 1724-1743. 10.1038/nprot.2016.097

72. J.F. Dekkers, E.J. van Vliet, N. Sachs, J.M. Rosenbluth, O. Kopper, H.G. Rebel, E.J. Wehrens, C. Piani, J.E. Visvader, C.S. Verissimo, et al. *Long-term culture, genetic manipulation and xenotransplantation of human normal and breast cancer organoids.* Nat. Protoc., 16 (2021), pp. 1936-1965. 10.1038/s41596-020-00474-1

73. M. Fujii, M. Matano, K. Toshimitsu, A. Takano, Y. Mikami, S. Nishikori, S. Sugimoto, T. Sato. *Human intestinal organoids maintain self-renewal capacity and cellular diversity in niche-inspired culture condition.* Cell Stem Cell, 23 (2018), pp. 787-793. 10.1016/j.stem.2018.11.016

74. H. Hu, H. Gehart, B. Artegiani, C. LÖpez-Iglesias, F. Dekkers, O. Basak, J. van Es, S.M. Chuva de Sousa Lopes, H. Begthel, J. Korving, et al. *Long-term expansion of functional mouse and human hepatocytes as 3D organoids.* Cell, 175 (2018), pp. 1591-1606. 10.1016/j.cell.2018.11.013

75. M. Jiang, H. Li, Y. Zhang, Y. Yang, R. Lu, K. Liu, S. Lin, X. Lan, H. Wang, H. Wu, et al. *Transitional basal cells at the squamous-columnar junction generate Barrett's oesophagus.* Nature, 550 (2017), pp. 529-533. 10.1038/nature24269

76. *Transitional basal cells at the squamous-columnar junction generate Barrett's oesophagus.* Nature, 550 (2017), pp. 529-533. 10.1038/nature24269

77. W.R. Karthaus, P.J. Iaquinta, J. Drost, A. Gracanin, R. van Boxtel, J. Wongvipat, C.M. Dowling, D. Gao, H. Begthel, N. Sachs, et al. *Identification of multipotent luminal progenitor cells in human prostate organoid cultures.* Cell, 159 (2014), pp. 163-175. 10.1016/j.cell.2014.08.017

78. F. Schutgens, M.B. Rookmaaker, T. Margaritis, A. Rios, C. Ammerlaan, J. Jansen, L. Gijzen, M. Vormann, A. Vonk, M. Viveen, et al. *Tubuloids derived from human adult kidney and urine for personalized disease modeling.* Nat. Biotechnol., 37 (2019), pp. 303-313. 10.1038/s41587-019-0048-8

79. M. Huch, H. Gehart, R. van Boxtel, K. Hamer, F. Blokzijl, M.M. Verstegen, E. Ellis, M. van Wenum, S.A. Fuchs, J. de Ligt, et al. *Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver.* Cell, 160 (2015), pp. 299-312. 10.1016/j.cell.2014.11.050

80. O.A. Timofeeva, N. Palechor-Ceron, G. Li, H. Yuan, E. Krawczyk, X. Zhong, G. Liu, G. Upadhyay, A. Dakic, S. Yu, et al. *Conditionally reprogrammed normal and primary tumor prostate epithelial cells: a novel patient-derived cell model for studies of human prostate cancer.* Oncotarget, 8 (2017), pp. 22741-22758. 10.18632/oncotarget.13937

81. X. Liu, E. Krawczyk, F.A. Suprynowicz, N. Palechor-Ceron, H. Yuan, A. Dakic, V. Simic, Y.L. Zheng, P. Sripadhan, C. Chen, et al. *Conditional reprogramming and long-term expansion of normal and tumor cells from human biospecimens.* Nat. Protoc., 12 (2017), pp. 439-451. 10.1038/nprot.2016.174

82. B.R.S. Correa, J. Hu, L.O.F. Penalva, R. Schlegel, D.L. Rimm, P.A.F. Galante, S. Agarwal. *Patient-derived conditionally reprogrammed cells maintain intra-tumor genetic heterogeneity.* Sci. Rep., 8 (2018), p. 4097. 10.1038/s41598-018-22427-1

83. C. Chen, S. Choudhury, D. Wangsa, C.J. Lescott, D.J. Wilkins, P. Sripadhan, X. Liu, D. Wangsa, T. Ried, C. Moskaluk, et al. *A multiplex preclinical model for adenoid cystic carcinoma of the salivary gland identifies regorafenib as a potential therapeutic drug.* Sci. Rep., 7 (2017), p. 11410. 10.1038/s41598-017-11764-2

84. S. Raghavan, P.S. Winter, A.W. Navia, H.L. Williams, A. DenAdel, K.E. Lowder, J. Galvez-Reyes, R.L. Kalekar, N. Mulugeta, K.S. Kapner, et al. *Microenvironment drives cell state, plasticity, and drug response in pancreatic cancer.* Cell, 184 (2021), pp. 6119-6137. 10.1016/j.cell.2021.11.017

85. K. Miyabayashi, L.A. Baker, A. Deschênes, B. Traub, G. Caligiuri, D. Plenker, B. Alagesan, P. Belleau, S. Li, J. Kendall, et al. *Intraductal transplantation models of human pancreatic ductal adenocarcinoma reveal progressive transition of molecular subtypes.* Cancer Discov., 10 (2020), pp. 1566-1589. 10.1158/2159-8290.CD-20-0133

86. C. Cortina, G. Turon, D. Stork, X. Hernando-Momblona, M. Sevillano, M. Aguilera, S. Tosi, A. Merlos-Suárez, C. Stephan-Otto Attolini, E. Sancho, et al. *A genome editing approach to study cancer stem cells in human tumors.* EMBO Mol. Med., 9 (2017), pp. 869-879. 10.15252/emmm.201707550

87. de Sousa, F. Melo, A.V. Kurtova, J.M. Harnoss, N. Kljavin, J.D. Hoeck, J. Hung, J.E. Anderson, E.E. Storm, Z. Modrusan, et al. *A distinct role for Lgr5(+) stem cells in primary and metastatic colon cancer.* Nature, 543 (2017), pp. 676-680. 10.1038/nature21713

88. M. Shimokawa, Y. Ohta, S. Nishikori, M. Matano, A. Takano, M. Fujii, S. Date, S. Sugimoto, T. Kanai, T. Sato. *Visualization and targeting of LGR5(+) human colon cancer stem cells.* Nature, 545 (2017), pp. 187-192. 10.1038/nature22081

89. A. Fumagalli, K.C. Oost, L. Kester, J. Morgner, L. Bornes, L. Bruens, L. Spaargaren, M. Azkanaz, T. Schelfhorst, E. Beerling, et al. *Plasticity of Lgr5-negative cancer cells drives metastasis in colorectal cancer.* Cell Stem Cell, 26 (2020), pp. 569-578. 10.1016/j.stem.2020.02.008

90. Y. Ohta, M. Fujii, S. Takahashi, A. Takano, K. Nanki, M. Matano, H. Hanyu, M. Saito, M. Shimokawa, S. Nishikori, et al. *Cell-matrix interface regulates dormancy in human colon cancer stem cells.* Nature, 608 (2022), pp. 784-794. 10.1038/s41586-022-05043-y

91. A. Alvarez-Varela, L. Novellasdemunt, F.M. Barriga, X. Hernando-Momblona, A. Canellas-Socias, S. Cano-Crespo, M. Sevillano, C. Cortina, D. Stork, C. Morral, et al. *Mex3a marks drug-tolerant persister colorectal cancer cells that mediate relapse after chemotherapy.* Nat Cancer, 3 (2022), pp. 1052-1070. 10.1038/s43018-022-00402-0

92. A. Cañellas-Socias, C. Cortina, X. Hernando-Momblona, S. Palomo-Ponce, E.J. Mulholland, G. Turon, L. Mateo, S. Conti, O. Roman, M. Sevillano, et al. *Metastatic recurrence in colorectal cancer arises from residual EMP1(+) cells.* Nature, 611 (2022), pp. 603-613. 10.1038/s41586-022-05402-9

93. K. Nanki, M. Fujii, M. Shimokawa, M. Matano, S. Nishikori, S. Date, A. Takano, K. Toshimitsu, Y. Ohta, S. Takahashi, et al. *Somatic inflammatory gene mutations in human ulcerative colitis epithelium.* Nature, 577 (2020), pp. 254-259. 10.1038/s41586-019-1844-5

94. N. Kakiuchi, K. Yoshida, M. Uchino, T. Kihara, K. Akaki, Y. Inoue, K. Kawada, S. Nagayama, A. Yokoyama, S. Yamamoto, et al. Frequent mutations that converge on the NFKBIZ pathway in ulcerative colitis. *Nature*, 577 (2020), pp. 260-265. 10.1038/s41586-019-1856-1

95. S. Olafsson, R.E. McIntyre, T. Coorens, T. Butler, H. Jung, P.S. Robinson, H. Lee-Six, M.A. Sanders, K. Arestang, C. Dawson, et al. Somatic evolution in non-neoplastic IBD-affected colon. *Cell*, 182 (2020), pp. 672–684.e11. 10.1016/j.cell.2020.06.036

96. J. Drost, R. van Boxtel, F. Blokzijl, T. Mizutani, N. Sasaki, V. Sasselli, J. de Ligt, S. Behjati, J.E. Grolleman, T. van Wezel, et al. Use of CRISPR-modified human stem cell organoids to study the origin of mutational signatures in cancer. *Science*, 358 (2017), pp. 234-238. 10.1126/science.aao3130

97. H. Fang, H.H.N. Yan, R.A. Bilardi, C. Flensburg, H. Yang, J.A. Barbour, H.C. Siu, M. Turski, E. Chew, Z. Xu, et al. Ganciclovir-induced mutations are present in a diverse spectrum of post-transplant malignancies. *Genome Med.*, 14 (2022), p. 124. 10.1186/s13073-022-01131-w

98. C. Pleguezuelos-Manzano, J. Puschhof, A. Rosendahl Huber, A. van Hoeck, H.M. Wood, J. Nomburg, C. Gurjao, F. Manders, G. Dalmasso, P.B. Stege, et al. Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks(+) *E. coli*. *Nature*, 580 (2020), pp. 269-273. 10.1038/s41586-020-2080-8

99. K.W. McCracken, E.M. Catá, C.M. Crawford, K.L. Sinagoga, M. Schumacher, B.E. Rockich, Y.H. Tsai, C.N. Mayhew, J.R. Spence, Y. Zavros, et al. Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids. *Nature*, 516 (2014), pp. 400-404. 10.1038/nature13863

100. E. De Crignis, T. Hossain, S. Romal, F. Carofiglio, P. Moulos, M.M. Khalid, S. Rao, A. Bazrafshan, M.M. Verstegen, F. Pourfarzad, et al. Application of human liver organoids as a patient-derived primary model for HBV infection and related hepatocellular carcinoma. *eLife*, 10 (2021), 10.7554/eLife.60747. 10.7554/eLife.60747

101. Y.Z. Nie, Y.W. Zheng, K. Miyakawa, S. Murata, R.R. Zhang, K. Sekine, Y. Ueno, T. Takebe, T. Wakita, A. Ryo, et al. Recapitulation of hepatitis B virus-host interactions in liver organoids from human induced pluripotent stem cells. *EBiomedicine*, 35 (2018), pp. 114-123. 10.1016/j.ebiom.2018.08.014

102. A.A. Duarte, E. Gogola, N. Sachs, M. Barazas, S. Annunziato, J.R. de Ruiter, A. Velds, S. Blatter, J.M. Houthuijzen, M. van de Ven, et al. BRCA-deficient mouse mammary tumor organoids to study cancer-drug resistance. *Nat Methods*, 15 (2018), pp. 134-140. 10.1038/nmeth.4535

103. D.V.F. Tauriello, S. Palomo-Ponce, D. Stork, A. Berenguer-Llergo, J. Badia-Ramentol, M. Iglesias, M. Sevillano, S. Ibiza, A. Cañellas, X. Hernando-Momblona, et al. TGFβ drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. *Nature*, 554 (2018), pp. 538-543. 10.1038/nature25492

104. D.J. Flanagan, N. Pentinmikko, K. Luopajärvi, N.J. Willis, K. Gilroy, A.P. Raven, L. McGarry, J.I. Englund, A.T. Webb, S. Scharaw, et al. NOTUM from Apc-mutant cells biases clonal competition to initiate cancer. *Nature*, 594 (2021), pp. 430-435. 10.1038/s41586-021-03525-z

105. S.M. van Neerven, N.E. de Groot, L.E. Nijman, B.P. Scicluna, M.S. van Driel, M.C. Lecca, D.O. Warmerdam, V. Kakkar, L.F. Moreno, F.A. Vieira Braga, et al. Apc-mutant cells act as supercompetitors in intestinal tumour initiation. *Nature*, 594 (2021), pp. 436-441. 10.1038/s41586-021-03558-4

106. K.P. O'Rourke, E. Loizou, G. Livshits, E.M. Schatoff, T. Baslan, E. Manchado, J. Simon, P.B. Romesser, B. Leach, T. Han, et al. Transplantation of engineered organoids enables rapid generation of metastatic mouse models of colorectal cancer. *Nat. Biotechnol.*, 35 (2017), pp. 577-582. 10.1038/nbt.3837

107. J. Roper, T. Tammela, N.M. Cetinbas, A. Akkad, A. Roghanian, S. Rickelt, M. Almeqdadi, K. Wu, M.A. Oberli, F.J. Sánchez-Rivera, et al. In vivo genome editing and organoid transplantation models of colorectal cancer and metastasis. *Nat. Biotechnol.*, 35 (2017), pp. 569-576. 10.1038/nbt.3836

108. S. Zhang, S. Iyer, H. Ran, I. Dolgalev, S. Gu, W. Wei, C.J.R. Foster, C.A. Loomis, N. Olvera, F. Dao, et al. Genetically defined, syngeneic organoid platform for developing combination therapies for ovarian cancer. *Cancer Discov.*, 11 (2021), pp. 362-383. 10.1158/2159-8290.CD-20-0455

109. S. Naranjo, C.M. Cabana, L.M. LaFave, R. Romero, S.L. Shanahan, A. Bhutkar, P.M.K. Westcott, J.M. Schenkel, A. Ghosh, L.Z. Liao, et al. Modeling diverse genetic subtypes of lung adenocarcinoma with a next-generation alveolar type 2 organoid platform. *Genes Dev.*, 36 (2022), pp. 936-949. 10.1101/gad.349659.122

110. Drost, R.H. van Jaarsveld, B. Ponsioen, C. Zimberlin, R. van Boxtel, A. Buijs, N. Sachs, R.M. Overmeer, G.J. Offerhaus, H. Begthel, et al. Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells. *Nature*, 521 (2015), pp. 43-47. 10.1038/nature14415

111. M. Matano, S. Date, M. Shimokawa, A. Takano, M. Fujii, Y. Ohta, T. Watanabe, T. Kanai, T. Sato. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nat. Med.*, 21 (2015), pp. 256-262. 10.1038/nm.3802

112. A. Fumagalli, J. Drost, S.J. Suijkerbuijk, R. van Boxtel, J. de Ligt, G.J. Offerhaus, H. Begthel, E. Beerling, E.H. Tan, O.J. Sansom, et al. Genetic dissection of colorectal cancer progression by orthotopic transplantation of engineered cancer organoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 114 (2017), pp. E2357-E2364. 10.1073/pnas.1701219114

113. Arianna Fumagalli, Jarno Drost, Saskia J. E. Suijkerbuijk, Ruben van Boxtel, Joep de Ligt, G. Johan Offerhaus, Harry Begthel, Evelyne Beerling, Ee Hong Tan, Owen J. Sansom, Edwin Cuppen Hans Clevers h.clevers@hubrecht.eu, and Jacco van Rheenen Genetic dissection of colorectal cancer progression by orthotopic transplantation of engineered cancer organoids. https://orcid.org/0000-0002-0400-9542

114. A.F.M. Dost, A.L. Moye, M. Vedaie, L.M. Tran, E. Fung, D. Heinze, C. Villacorta-Martin, J. Huang, R. Hekman, J.H. Kwan, et al. Organoids model transcriptional hallmarks of oncogenic KRAS activation in lung epithelial progenitor cells. *Cell Stem Cell*, 27 (2020), pp. 663-678. 10.1016/j.stem.2020.07.022

115. J.F. Dekkers, J.R. Whittle, F. Vaillant, H.R. Chen, C. Dawson, K. Liu, M.H. Geurts, M.J. Herold, H. Clevers, G.J. Lindeman, et al. Modeling breast cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human breast organoids. *J. Natl. Cancer Inst.*, 112 (2020), pp. 540-544. 10.1093/jnci/djz196

116. J. Ogawa, G.M. Pao, M.N. Shokhirev, I.M. Verma. Glioblastoma model using human cerebral organoids. *Cell Rep.*, 23 (2018), pp. 1220-1229. 10.1016/j.celrep.2018.03.105

117. S. Bian, M. Repic, Z. Guo, A. Kavirayani, T. Burkard, J.A. Bagley, C. Krauditsch, J.A. Knoblich. Genetically engineered cerebral organoids model brain tumor formation. *Nat. Methods*, 15 (2018), pp. 631-639. 10.1038/s41592-018-0070-7

118. B. Artegiani, L. van Voorthuijsen, R.G.H. Lindeboom, D. Seinstra, I. Heo, P. Tapia, C. López-Iglesias, D. Postrach, T. Dayton, R. Oka, et al. Probing the tumor suppressor function of BAP1 in CRISPR-engineered human liver organoids. *Cell Stem Cell*, 24 (2019), pp. 927-943. 10.1016/j.stem.2019.04.017

119. K. Kawasaki, M. Fujii, S. Sugimoto, K. Ishikawa, M. Matano, Y. Ohta, K. Toshimitsu, S. Takahashi, N. Hosoe, S. Sekine, et al. Chromosome engineering of human colon-derived organoids to develop a model of traditional serrated adenoma. *Gastroenterology*, 158 (2020), pp. 638-651. 10.1053/j.gastro.2019.10.009

120. Y.H. Lo, K.S. Kolahi, Y. Du, C.Y. Chang, A. Krokhotin, A. Nair, W.D. Sobba, K. Karlsson, S.J. Jones, T.A. Longacre, et al. A CRISPR/Cas9-engineered ARID1A-deficient human gastric cancer organoid model reveals essential and nonessential modes of oncogenic transformation. *Cancer Discov.*, 11 (2021), pp. 1562-1581. 10.1158/2159-8290.CD-20-1109

121. Z. Wu, J. Zhou, X. Zhang, Z. Zhang, Y. Xie, J.B. Liu, Z.V. Ho, A. Panda, X. Qiu, P. Cejas, et al. Reprogramming of the esophageal squamous carcinoma epigenome by SOX2 promotes ADAR1 dependence. *Nat. Genet.*, 53 (2021), pp. 881-894. 10.1038/s41588-021-00859-2

122. H. Liu, Y. Zhang, Y.Y. Zhang, Y.P. Li, Z.Q. Hua, C.J. Zhang, K.C. Wu, F. Yu, Y. Zhang, J. Su, et al. Human embryonic stem cell-derived organoid retinoblastoma reveals a cancerous origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 117 (2020), pp. 33628-33638. 10.1073/pnas.2011780117

123. E. Fessler, J. Drost, S.R. van Hooff, J.F. Linnekamp, X. Wang, M. Jansen, F. De Sousa E Melo, P.R. Prasetyanti, J.E. IJspeert, M. Franitza, et al. TGFβ signaling directs serrated adenomas to the mesenchymal colorectal cancer subtype. *EMBO Mol. Med.*, 8 (2016), pp. 745-760. 10.15252/emmm.201606184

124. B.E. Michels, M.H. Mosa, B.I. Streibl, T. Zhan, C. Menche, K. Abou-El-Ardat, T. Darvishi, E. Członka, S. Wagner, J. Winter, et al. Pooled in vitro and in vivo CRISPR-Cas9 screening identifies tumor suppressors in human colon organoids. *Cell Stem Cell*, 26 (2020), pp. 782–792.e7. 10.1016/j.stem.2020.04.003

125. T. Ringel, N. Frey, F. Ringnalda, S. Janjuha, S. Cherkaoui, S. Butz, S. Srivatsa, M. Pirkl, G. Russo, L. Villiger, et al. Genome-scale CRISPR screening in human intestinal organoids identifies drivers.

126. K. Murakami, Y. Terakado, K. Saito, Y. Jomen, H. Takeda, M. Oshima, N. Barker. A genome-scale CRISPR screen reveals factors regulating Wnt-dependent renewal of mouse gastric epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 118 (2021), 10.1073/pnas.2016806118

127. H.A. McCauley, J.M. Wells. Pluripotent stem cell-derived organoids: using principles of developmental biology to grow human tissues in a dish. *Development*, 144 (2017), pp. 958-962. 10.1242/dev.140731

128. J.R. Spence, C.N. Mayhew, S.A. Rankin, M.F. Kuhar, J.E. Vallance, K. Tolle, E.E. Hoskins, V.V. Kalinichenko, S.I. Wells, A.M. Zorn, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature*, 470 (2011), pp. 105-109. 10.1038/nature09691

129. Y. Shi, H. Inoue, J.C. Wu, S. Yamanaka. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 16 (2017), pp. 115-130. 10.1038/nrd.2016.245

130. R.C. Smith, V. Tabar. Constructing and deconstructing cancers using human pluripotent stem cells and organoids. *Cell Stem Cell*, 24 (2019), pp. 2-24. 10.1016/j.stem.2018.11.012

131. M.A. Lancaster, M. Renner, C.A. Martin, D. Wenzel, L.S. Bicknell, M.E. Hurles, T. Homfray, J.M. Penninger, A.P. Jackson, J.A. Knoblich. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, 501 (2013), pp. 373-379. 10.1038/nature12517

132. Y.W. Chen, S.X. Huang, A.L.R.T. de Carvalho, S.H. Ho, M.N. Islam, S. Volpi, L.D. Notarangelo, M. Ciancanelli, J.L. Casanova, J. Bhattacharya, et al. A three-dimensional model of human lung development and disease from pluripotent stem cells. *Nat. Cell Biol.*, 19 (2017), pp. 542-549. 10.1038/ncb3510

133. M. Hohwieler, A. Illing, P.C. Hermann, T. Mayer, M. Stockmann, L. Perkhofer, T. Eiseler, J.S. Antony, M. Müller, S. Renz, et al. Human pluripotent stem cell-derived acinar/ductal organoids generate human pancreas upon orthotopic transplantation and allow disease modelling. *Gut*, 66 (2017), pp. 473-486. 10.1136/gutjnl-2016-312423

134. S.L. Trisno, K.E.D. Philo, K.W. McCracken, E.M. Catá, S. Ruiz-Torres, S.A. Rankin, L. Han, T. Nasr, P. Chaturvedi, M.E. Rothenberg, et al. Esophageal organoids from human pluripotent stem cells delineate Sox2 functions during esophageal specification. *Cell Stem Cell*, 23 (2018), pp. 501–515.e7. 10.1016/j.stem.2018.08.008

135. J.H. Low, P. Li, E.G.Y. Chew, B. Zhou, K. Suzuki, T. Zhang, M.M. Lian, M. Liu, E. Aizawa, C. Rodriguez Esteban, et al. Generation of human PSC-derived kidney organoids with patterned nephron segments and a de novo vascular network. *Cell Stem Cell*, 25 (2019), pp. 373–387.e9. 10.1016/j.stem.2019.06.009

136. S.J. Mun, J.S. Ryu, M.O. Lee, Y.S. Son, S.J. Oh, H.S. Cho, M.Y. Son, D.S. Kim, S.J. Kim, H.J. Yoo, et al. Generation of expandable human pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like liver organoids. *J. Hepatol.*, 71 (2019), pp. 970-985. 10.1016/j.jhep.2019.06.030

137. M. Zhang, J.J. Vandana, L. Lacko, S. Chen. Modeling cancer progression using human pluripotent stem cell-derived cells and organoids. *Stem Cell Res.*, 49 (2020), p. 102063. 10.1016/j.scr.2020.102063

138. M.P. Chao, A.J. Gentles, S. Chatterjee, F. Lan, A. Reinisch, M.R. Corces, S. Xavy, J. Shen, D. Haag, S. Chanda, et al. Human AML-iPSCs reacquire leukemic properties after differentiation and model clonal variation of disease. *Cell Stem Cell*, 20 (2017), pp. 329–344.e7. 10.1016/j.stem.2016.11.018

139. K. Kumano, S. Arai, M. Hosoi, K. Taoka, N. Takayama, M. Otsu, G. Nagae, K. Ueda, K. Nakazaki, Y. Kamikubo, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from primary chronic myelogenous leukemia patient samples. *Blood*, 119 (2012), pp. 6234-6242. 10.1182/blood-2011-07-367441

140. K. Hu, J. Yu, K. Suknuntha, S. Tian, K. Montgomery, K.D. Choi, R. Stewart, J.A. Thomson, I.I. Slukvin. Efficient generation of transgene-free induced pluripotent stem cells from normal and neoplastic bone marrow and cord blood mononuclear cells. *Blood*, 117 (2011), pp. e109-e119. 10.1182/blood-2010-07-298331

141. S. Gandre-Babbe, P. Paluru, C. Aribeana, S.T. Chou, S. Bresolin, L. Lu, S.K. Sullivan, S.K. Tasian, J. Weng, H. Favre, et al. Patient-derived induced pluripotent stem cells recapitulate hematopoietic abnormalities of juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood*, 121 (2013), pp. 4925-4929. 10.1182/blood-2013-01-478412

142. A. Linkous, D. Balamatsias, M. Snuderl, L. Edwards, K. Miyaguchi, T. Milner, B. Reich, L. Cohen-Gould, A. Storaska, Y. Nakayama, et al. Modeling patient-derived glioblastoma with cerebral organoids. *Cell Rep.*, 26 (2019), pp. 3203–3211.e5. 10.1016/j.celrep.2019.02.063

143. M.S. Choe, J.S. Kim, H.C. Yeo, C.M. Bae, H.J. Han, K. Baek, W. Chang, K.S. Lim, S.P. Yun, I.S. Shin, et al. A simple metastatic brain cancer model using human embryonic stem cell-derived cerebral organoids. *FASEB J.*, 34 (2020), pp. 16464-16475. 10.1096/fj.202000372R

144. J. Barretina, G. Caponigro, N. Stransky, K. Venkatesan, A.A. Margolin, S. Kim, C.J. Wilson, J. Lehár, G.V. Kryukov, D. Sonkin, et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature*, 483 (2012), pp. 603-607. 10.1038/nature11003

145. M.J. Garnett, E.J. Edelman, S.J. Heidorn, C.D. Greenman, A. Dastur, K.W. Lau, P. Greninger, I.R. Thompson, X. Luo, J. Soares, et al. Systematic identification of genomic markers of drug sensitivity in cancer cells. *Nature*, 483 (2012), pp. 570-575. 10.1038/nature11005

146. L. Li, H. Knutsdottir, K. Hui, M.J. Weiss, J. He, B. Philosophe, A.M. Cameron, C.L. Wolfgang, T.M. Pawlik, G. Ghiaur, et al. Human primary liver cancer organoids reveal intratumor and interpatient drug response heterogeneity. *JCI Insight*, 4 (2019), 10.1172/jci.insight.121490

147. C.J. de Witte, J. Espejo Valle-Inclan, N. Hami, K. Lõhmussaar, O. Kopper, C.P.H. Vreuls, G.N. Jonges, P. van Diest, L. Nguyen, H. Clevers, et al. Patient-derived ovarian cancer organoids mimic clinical response and exhibit heterogeneous inter- and intrapatient drug responses. *Cell Rep.*, 31 (2020), p. 107762. 10.1016/j.celrep.2020.107762

148. S. Karkampouna, F. La Manna, A. Benjak, M. Kiener, M. De Menna, E. Zoni, J. Grosjean, I. Klima, A. Garofoli, M. Bolis, et al. Patient-derived xenografts and organoids model therapy response in prostate cancer. *Nat. Commun.*, 12 (2021), p. 1117. 10.1038/s41467-021-21300-6

149. J. Betge, N. Rindtorff, J. Sauer, B. Rauscher, C. Dingert, H. Gaitantzi, F. Herweck, K. Srour-Mhanna, T. Miersch, E. Valentini, et al. The drug-induced phenotypic landscape of colorectal cancer organoids. *Nat. Commun.*, 13 (2022), p. 3135. 10.1038/s41467-022-30722-9

150. K. Toshimitsu, A. Takano, M. Fujii, K. Togasaki, M. Matano, S. Takahashi, T. Kanai, T. Sato. Organoid screening reveals epigenetic vulnerabilities in human colorectal cancer. *Nat. Chem. Biol.*, 18 (2022), pp. 605-614. 10.1038/s41589-022-00984-x

151. S.N. Ooft, F. Weeber, K.K. Dijkstra, C.M. McLean, S. Kaing, E. van Werkhoven, L. Schipper, L. Hoes, D.J. Vis, J. van de Haar, et al. Patient-derived organoids can predict response to chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients. *Sci. Transl. Med.*, 11 (2019), 10.1126/scitranslmed.aay2574

152. C. Calandrini, S.R. van Hooff, I. Paassen, D. Ayyildiz, S. Derakhshan, M.E.M. Dolman, K.P.S. Langenberg, M. van de Ven, C. de Heus, N. Liv, et al. Organoid-based drug screening reveals Neddylation as therapeutic target for malignant rhabdoid tumors. *Cell Rep.*, 36 (2021), p. 109568. 10.1016/j.celrep.2021.109568

153. P. Tan, M. Wang, A. Zhong, Y. Wang, J. Du, J. Wang, L. Qi, Z. Bi, P. Zhang, T. Lin, et al. SRT1720 inhibits the growth of bladder cancer in organoids and murine models through the SIRT1-HIF axis. *Oncogene*, 40 (2021), pp. 6081-6092. 10.1038/s41388-021-01999-9

154. T. Seidlitz, Y.T. Chen, H. Uhlemann, S. Schölch, S. Kochall, S.R. Merker, A. Klimova, A. Hennig, C. Schweitzer, K. Pape, et al. Mouse models of human gastric cancer subtypes with stomach-specific CreERT2-mediated pathway alterations. *Gastroenterology*, 157 (2019), pp. 1599–1614.e2. 10.1053/j.gastro.2019.09.026

155. H. Zhang, A. Schaefer, Y. Wang, R.G. Hodge, D.R. Blake, J.N. Diehl, A.G. Papageorge, M.D. Stachler, J. Liao, J. Zhou, et al. Gain-of-function RHOA mutations promote focal adhesion kinase activation and dependency in diffuse gastric cancer. *Cancer Discov.*, 10 (2020), pp. 288-305. 10.1158/2159-8290.CD-19-0811

156. S. Sugimoto, Y. Ohta, M. Fujii, M. Matano, M. Shimokawa, K. Nanki, S. Date, S. Nishikori, Y. Nakazato, T. Nakamura, et al. Reconstruction of the human colon epithelium in vivo. *Cell Stem Cell*, 22 (2018), pp. 171–176.e5. 10.1016/j.stem.2017.11.012

157. K. Karlsson, M. Przybilla, H. Xu, E. Kotler, K. Karagyozova, A. Sockell, K. Liu, A. Mah, Y.H. Lo, B. Lu, et al. Experimental evolution in TP53 deficient human gastric organoids recapitulates tumorigenesis. Preprint at *bioRxiv* (2022), 10.1101/2022.04.09.487529

158. R. Coppo, J. Kondo, K. Iida, M. Okada, K. Onuma, Y. Tanaka, M. Kamada, M. Ohue, K. Kawada, K. Obama, et al. Distinct but interchangeable subpopulations of colorectal cancer cells with different growth fates and drug sensitivity. *iScience*, 26 (2023), p. 105962. 10.1016/j.isci.2023.105962

159. K.K. Dijkstra, C.M. Cattaneo, F. Weeber, M. Chalabi, J. van de Haar, L.F. Fanchi, M. Slagter, D.L. van der Velden, S. Kaing, S. Kelderman, et al. Generation of tumor-reactive T cells by co-culture of

peripheral blood lymphocytes and tumor organoids. *Cell*, 174 (2018), pp. 1586–1598.e12. 10.1016/j.cell.2018.07.009

160. B. Palikuqi, D.T. Nguyen, G. Li, R. Schreiner, A.F. Pellegata, Y. Liu, D. Redmond, F. Geng, Y. Lin, J.M. Gómez-Salinero, et al. Adaptable haemodynamic endothelial cells for organogenesis and tumorigenesis. *Nature*, 585 (2020), pp. 426-432. 10.1038/s41586-020-2712-z

161. J.T. Neal, X. Li, J. Zhu, V. Giangarra, C.L. Grzeskowiak, J. Ju, I.H. Liu, S.H. Chiou, A.A. Salahudeen, A.R. Smith, et al. Organoid modeling of the tumor immune microenvironment. *Cell*, 175 (2018), pp. 1972–1988.e16. 10.1016/j.cell.2018.11.021

162. S. Ding, C. Hsu, Z. Wang, N.R. Natesh, R. Millen, M. Negrete, N. Giroux, G.O. Rivera, A. Dohlman, S. Bose, et al. Patient-derived micro-organospheres enable clinical precision oncology. *Cell Stem Cell*, 29 (2022), pp. 905–917.e6. 10.1016/j.stem.2022.04.006

163. N.S. Münch, H.Y. Fang, J. Ingermann, H.C. Maurer, A. Anand, V. Kellner, V. Sahm, M. Wiethaler, T. Baumeister, F. Wein, et al. High-fat diet accelerates carcinogenesis in a mouse model of Barrett's esophagus via interleukin 8 and alterations to the gut microbiome. *Gastroenterology*, 157 (2019), pp. 492-506.e2. 10.1053/j.gastro.2019.04.013

164. S. Price, S. Bhosle, E. Gonçalves, X. Li, D.P. McClurg, S. Barthorpe, A. Beck, C. Hall, H. Lightfoot, L. Farrow, et al. A suspension technique for efficient large-scale cancer organoid culturing and perturbation screens. *Sci. Rep.*, 12 (2022), p. 5571. 10.1038/s41598-022-09508-y

165. N. Gjorevski, N. Sachs, A. Manfrin, S. Giger, M.E. Bragina, P. Ordóñez-Morán, H. Clevers, M.P. Lutolf. Designer matrices for intestinal stem cell and organoid culture. *Nature*, 539 (2016), pp. 560-564. 10.1038/nature20168

References

1. Всемирная организация здравоохранения. Global cancer burden growing – amidst mounting need for services [Электронный ресурс]. – URL: https://www.who.int/ru/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services (дата обращения: 06.02.2026).

2. Wang C., Tang Z., Zhao Y., Yao R., Li L., Sun W. Three-dimensional in vitro cancer models: a short review // Biofabrication. – 2014. – V. 6, №2. – P. 022001.

3. Vargo-Gogola T., Rosen J.M. Modelling breast cancer: one size does not fit all // Nat Rev Cancer. – 2007. – V. 7, №9. – P. 659-672.

4. Breitenbach M., Hoffmann J. Cancer models // Front Oncol. – 2018. – V. 8. – P. 401.

5. Schachtschneider K.M., Schwind R.M., Newson J., et al. The oncopig cancer model: an innovative large animal translational oncology platform // Front Oncol. – 2017. – V. 7. – P. 190.

6. Sato T., Vries R.G., Snippert H.J., van de Wetering M., Barker N., Stange D.E., van Es J.H., Abo A., Kujala P., Peters P.J., et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche // Nature. – 2009. – V. 459. – P. 262-265. – DOI: 10.1038/nature07935.

7. Kim K.A., Kakitani M., Zhao J., Oshima T., Tang T., Binnerts M., Liu Y., et al. Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium // Science. – 2005. – V. 309. – P. 1256-1259. – DOI: 10.1126/science.1112521.

8. Korinek V., Barker N., Moerer P., van Donselaar E., Huls G., Peters P.J., Clevers H. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4 // Nat Genet. – 1998. – V. 19. – P. 379-383. – DOI: 10.1038/1270.

9. Sato T., van Es J.H., Snippert H.J., Stange D.E., Vries R.G., van den Born M., Barker N., Shroyer N.F., van de Wetering M., Clevers H. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts // Nature. – 2011. – V. 469. – P. 415-418. – DOI: 10.1038/nature09637.

10. Sasaki T., Giltay R., Talts U., Timpl R., Talts J.F. Expression and distribution of laminin alpha1 and alpha2 chains in embryonic and adult mouse tissues: an immunochemical approach // Exp Cell Res. – 2002. – V. 275. – P. 185-199. – DOI: 10.1006/excr.2002.5499.

11. Ootani A., Li X., Sangiorgi E., Ho Q.T., Ueno H., Toda S., Sugihara H., Fujimoto K., Weissman I.L., Capecchi M.R., et al. Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche // Nat Med. – 2009. – V. 15. – P. 701-706. – DOI: 10.1038/nm.1951.

12. Kim E., Choi S., Kang B., Kong J., Kim Y., Yoon W.H., Lee H.R., Kim S., Kim H.M., Lee H., et al. Creation of bladder assembloids mimicking tissue regeneration and cancer // Nature. – 2020. – V. 588. – P. 664-669. – DOI: 10.1038/s41586-020-3034-x.

13. Lee S.H., Hu W., Matulay J.T., Silva M.V., Owczarek T.B., Kim K., Chua C.W., Barlow L.J., Kandoth C., Williams A.B., et al. Tumor evolution and drug response in patient-derived organoid models of bladder cancer // Cell. – 2018. – V. 173. – P. 515-528.e17. – DOI: 10.1016/j.cell.2018.03.017.

14. Mullenders J., de Jongh E., Brousali A., Roosen M., Blom J.P.A., Begthel H., Korving J., Jonges T., Kranenburg O.W., Meijer R., et al. Mouse and human urothelial cancer organoids: A tool for bladder cancer research // Proc Natl Acad Sci USA. – 2019. – V. 116. – P. 4567-4574. – DOI: 10.1073/pnas.1803595116.

15. Abdullah K.G., Bird C.E., Buehler J.D., Gattie L.C., Savani M.R., Sternisha A.C., Xiao Y., Levitt M.M., Hicks W.H., Li W., et al. Establishment of patient-derived organoid models of lower-grade glioma // Neuro Oncol. – 2022. – V. 24. – P. 612-623. – DOI: 10.1093/neuonc/noab273.

16. Sachs N., de Ligt J., Kopper O., Gogola E., Bounova G., Weeber F., Balgobind A.V., Wind K., Gracanin A., Begthel H., et al. A living biobank of breast cancer organoids captures disease heterogeneity // Cell. – 2018. – V. 172. – P. 373-386. – DOI: 10.1016/j.cell.2017.11.010.

17. Lõhmussaar K., Oka R., Espejo Valle-Inclan J., Smits M.H.H., Wardak H., Korving J., Begthel H., Proost N., van de Ven M., Kranenburg O.W., et al. Patient-derived organoids model cervical tissue dynamics and viral oncogenesis in cervical cancer // Cell Stem Cell. – 2021. – V. 28. – P. 1380-1396. – DOI: 10.1016/j.stem.2021.03.012.

18. Boretto M., Maenhoudt N., Luo X., Hennes A., Boeckx B., Bui B., Heremans R., Perneel L., Kobayashi H., Van Zundert I., et al. Patient-derived organoids from endometrial disease capture clinical heterogeneity and are amenable to drug screening // Nat Cell Biol. – 2019. – V. 21. – P. 1041-1051. – DOI: 10.1038/s41556-019-0360-z.

19. Li X., Francies H.E., Secrier M., Perner J., Miremadi A., Galeano-Dalmau N., Barendt W.J., Letchford L., Leyden G.M., Goffin E.K., et al. Organoid cultures recapitulate esophageal adenocarcinoma heterogeneity providing a model for clonality studies and precision therapeutics // Nat Commun. – 2018. – V. 9. – P. 2983. – DOI: 10.1038/s41467-018-05190-9.

20. Tanaka N., Osman A.A., Takahashi Y., Lindemann A., Patel A.A., Zhao M., Takahashi H., Myers J.N. Head and neck cancer organoids established by modification of the CTOS method can be used to predict in vivo drug sensitivity // Oral Oncol. – 2018. – V. 87. – P. 49-57. – DOI: 10.1016/j.oraloncology.2018.10.018.

21. Driehuis E., Kolders S., Spelier S., Lõhmussaar K., Willems S.M., Devriese L.A., de Bree R., de Ruiter E.J., Korving J., Begthel H., et al. Oral mucosal organoids as a potential platform for personalized cancer therapy // Cancer Discov. – 2019. – V. 9. – P. 852-871. – DOI: 10.1158/2159-8290.CD-18-1522.

22. Van de Wetering M., Francies H.E., Francis J.M., Bounova G., Iorio F., Pronk A., van Houdt W., van Gorp J., Taylor-Weiner A., Kester L., et al. Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients // Cell. – 2015. – V. 161. – P. 933-945. – DOI: 10.1016/j.cell.2015.03.053.

23. Weeber F., van de Wetering M., Hoogstraat M., Dijkstra K.K., Krijgsman O., Kuilman T., Gadellaa-van Hooijdonk C.G., van der Velden D.L., Peeper D.S., Cuppen E.P., et al. Preserved genetic diversity in organoids cultured from biopsies of human colorectal cancer metastases // Proc Natl Acad Sci USA. – 2015. – V. 112. – P. 13308-13311. – DOI: 10.1073/pnas.1516689112.

24. Fujii M., Shimokawa M., Date S., Takano A., Matano M., Nanki K., Ohta Y., Toshimitsu K., Nakazato Y., Kawasaki K., et al. A colorectal tumor organoid library demonstrates progressive loss of niche factor requirements during tumorigenesis // Cell Stem Cell. – 2016. – V. 18. – P. 827-838. – DOI: 10.1016/j.stem.2016.04.003.

25. Schütte M., Risch T., Abdavi-Azar N., Boehnke K., Schumacher D., Keil M., Yildiriman R., Jandrasits C., Borodina T., Amstislavskiy V., et al. Molecular dissection of colorectal cancer in pre-clinical models identifies biomarkers predicting sensitivity to EGFR inhibitors // Nat Commun. – 2017. – V. 8. – P. 14262. – DOI: 10.1038/ncomms14262.

26. Ganesh K., Wu C., O'Rourke K.P., Szeglin B.C., Zheng Y., Sauvé C.G., Adileh M., Wasserman I., Marco M.R., Kim A.S., et al. A rectal cancer organoid platform to study individual responses to chemoradiation // Nat Med. – 2019. – V. 25. – P. 1607-1614. – DOI: 10.1038/s41591-019-0584-2.

27. Yan H.H.N., Siu H.C., Ho S.L., Yue S.S.K., Gao Y., Tsui W.Y., Chan D., Chan A.S., Wong J.W.H., Man A.H.Y., et al. Organoid cultures of early-onset colorectal cancers reveal distinct and rare genetic profiles // Gut. – 2020. – V. 69. – P. 2165-2179. – DOI: 10.1136/gutjnl-2019-320019.

28. Yao Y., Xu X., Yang L., Zhu J., Wan J., Shen L., Xia F., Fu G., Deng Y., Pan M., et al. Patient-derived organoids predict chemoradiation responses of locally advanced rectal cancer // Cell Stem Cell. – 2020. – V. 26. – P. 17-26.e6. – DOI: 10.1016/j.stem.2019.10.010.

29. Herpers B., Eppink B., James M.I., Cortina C., Cañellas-Socias A., Boj S.F., Hernando-Momblona X., Glodzik D., Roovers R.C., van de Wetering M., et al. Functional patient-derived organoid screenings identify MCLA-158 as a therapeutic EGFR x LGR5 bispecific antibody with efficacy in epithelial tumors // Nat Cancer. – 2022. – V. 3. – P. 418-436. – DOI: 10.1038/s43018-022-00359-0.

30. Calandrini C., Schutgens F., Oka R., Margaritis T., Candelli T., Mathijsen L., Ammerlaan C., van Ineveld R.L., Derakhshan S., de Haan S., et al. An organoid biobank for childhood kidney cancers that captures disease and tissue heterogeneity // Nat Commun. – 2020. – V. 11. – P. 1310. – DOI: 10.1038/s41467-020-15155-6.

31. Broutier L., Mastrogiovanni G., Verstegen M.M., Francies H.E., Gavarró L.M., Bradshaw C.R., Allen G.E., Arnes-Benito R., Sidorova O., Gaspersz M.P., et al. Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening // Nat Med. – 2017. – V. 23. – P. 1424-1435. – DOI: 10.1038/nm.4438.

32. Nuciforo S., Fofana I., Matter M.S., Blumer T., Calabrese D., Boldanova T., Piscuoglio S., Wieland S., Ringnalda F., Schwank G., et al. Organoid models of human liver cancers derived from tumor needle biopsies // Cell Rep. – 2018. – V. 24. – P. 1363-1376. – DOI: 10.1016/j.celrep.2018.07.001.

33. Van Tienderen G.S., Li L., Broutier L., Saito Y., Inacio P., Huch M., Selaru F.M., van der Laan L.J.W., Verstegen M.M.A. Hepatobiliary tumor organoids for personalized medicine: a multicenter view on establishment, limitations, and future directions // Cancer Cell. – 2022. – V. 40. – P. 226-230. – DOI: 10.1016/j.ccell.2022.02.001.

34. Sachs N., Papaspyropoulos A., Zomer-van Ommen D.D., Heo I., Böttinger L., Klay D., Weeber F., Huelsz-Prince G., Iakobachvili N., Amatngalim G.D., et al. Long-term expanding human airway organoids for disease modeling // EMBO J. – 2019. – V. 38. – P. e100300. – DOI: 10.15252/embj.2018100300.

35. Ding R.B., Chen P., Rajendran B.K., Lyu X., Wang H., Bao J., Zeng J., Hao W., Sun H., Wong A.H., et al. Molecular landscape and subtype-specific therapeutic response of nasopharyngeal carcinoma revealed by integrative pharmacogenomics // Nat Commun. – 2021. – V. 12. – P. 3046. – DOI: 10.1038/s41467-021-23379-3.

36. Kawasaki K., Toshimitsu K., Matano M., Fujita M., Fujii M., Togasaki K., Ebisudani T., Shimokawa M., Takano A., Takahashi S., et al. An organoid biobank of neuroendocrine neoplasms enables genotype-phenotype mapping // Cell. – 2020. – V. 183. – P. 1420-1435.e21. – DOI: 10.1016/j.cell.2020.10.023.

37. Kopper O., de Witte C.J., Lõhmussaar K., Valle-Inclan J.E., Hami N., Kester L., Balgobind A.V., Korving J., Proost N., Begthel H., et al. An organoid platform for ovarian cancer captures intra- and interpatient heterogeneity // Nat Med. – 2019. – V. 25. – P. 838-849. – DOI: 10.1038/s41591-019-0422-6.

38. Tiriac H., Belleau P., Engle D.D., Plenker D., Deschênes A., Somerville T.D.D., Froeling F.E.M., Burkhart R.A., Denroche R.E., Jang G.H., et al. Organoid profiling identifies common responders to chemotherapy in pancreatic cancer // Cancer Discov. – 2018. – V. 8. – P. 1112-1129. – DOI: 10.1158/2159-8290.CD-18-0349.

39. Seino T., Kawasaki S., Shimokawa M., Tamagawa H., Toshimitsu K., Fujii M., Ohta Y., Matano M., Nanki K., Kawasaki K., et al. Human pancreatic tumor organoids reveal loss of stem cell niche factor dependence during disease progression // Cell Stem Cell. – 2018. – V. 22. – P. 454-467. – DOI: 10.1016/j.stem.2017.12.009.

40. Boj S.F., Hwang C.I., Baker L.A., Chio I.I., Engle D.D., Corbo V., Jager M., Ponz-Sarvise M., Tiriac H., Spector M.S., et al. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer // Cell. – 2015. – V. 160. – P. 324-338. – DOI: 10.1016/j.cell.2014.12.021.

41. Driehuis E., van Hoeck A., Moore K., Kolders S., Francies H.E., Gulersonmez M.C., Stigter E.C.A., Burgering B., Geurts V., Gracanin A., et al. Pancreatic cancer organoids recapitulate disease and allow personalized drug screening // Proc Natl Acad Sci USA. – 2019. – V. 116. – P. 26580-26590. – DOI: 10.1073/pnas.1911273116.

42. Gao D., Vela I., Sboner A., Iaquinta P.J., Karthaus W.R., Gopalan A., Dowling C., Wanjala J.N., Undvall E.A., Arora V.K., et al. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer // Cell. – 2014. – V. 159. – P. 176-187. – DOI: 10.1016/j.cell.2014.08.016.

43. Mout L., van Dessel L.F., Kraan J., de Jong A.C., Neves R.P.L., Erkens-Schulze S., Beaufort C.M., Sieuwerts A.M., van Riet J., Woo T.L.C., et al. Generating human prostate cancer organoids from leukapheresis enriched circulating tumour cells // Eur J Cancer. – 2021. – V. 150. – P. 179-189. – DOI: 10.1016/j.ejca.2021.03.023.

44. Wang B., Gan J., Liu Z., Hui Z., Wei J., Gu X., Mu Y., Zang G. An organoid library of salivary gland tumors reveals subtype-specific characteristics and biomarkers // J Exp Clin Cancer Res. – 2022. – V. 41. – P. 350. – DOI: 10.1186/s13046-022-02561-5.

45. Nanki K., Toshimitsu K., Takano A., Fujii M., Shimokawa M., Ohta Y., Matano M., Seino T., Nishikori S., Ishikawa K., et al. Divergent routes toward Wnt and R-spondin niche independency during human gastric carcinogenesis // Cell. – 2018. – V. 174. – P. 856-869. – DOI: 10.1016/j.cell.2018.07.027.

46. Tong Y., Cheng P.S.W., Or C.S., Yue S.S.K., Siu H.C., Ho S.L., Law S.Y.K., Tsui W.Y., Chan D., Ma S., et al. Escape from cell-cell and cell-matrix adhesion dependence underscores disease progression in gastric cancer organoid models // Gut. – 2023. – V. 72. – P. 242-255. – DOI: 10.1136/gutjnl-2022-327121.

47. Yan H.H.N., Siu H.C., Law S., Ho S.L., Yue S.S.K., Tsui W.Y., Chan D., Chan A.S., Ma S., Lam K.O., et al. A comprehensive human gastric cancer organoid biobank captures tumor subtype heterogeneity and enables therapeutic screening // Cell Stem Cell. – 2018. – V. 23. – P. 882-897. – DOI: 10.1016/j.stem.2018.09.016.

48. Seidlitz T., Merker S.R., Rothe A., Zakrzewski F., von Neubeck C., Grützmann K., Sommer U., Schweitzer C., Schölch S., Uhlemann H., et al. Human gastric cancer modelling using organoids // Gut. – 2019. – V. 68. – P. 207-217. – DOI: 10.1136/gutjnl-2017-314549.

49. Togasaki K., Sugimoto S., Ohta Y., Nanki K., Matano M., Takahashi S., Fujii M., Kanai T., Sato T. Wnt signaling shapes the histologic variation in diffuse gastric cancer // Gastroenterology. – 2021. – V. 160. – P. 823-830. – DOI: 10.1053/j.gastro.2020.10.047.

50. Bartfeld S., Bayram T., van de Wetering M., Huch M., Begthel H., Kujala P., Vries R., Peters P.J., Clevers H. In vitro expansion of human gastric epithelial stem cells and their responses to bacterial infection // Gastroenterology. – 2015. – V. 148. – P. 126-136. – DOI: 10.1053/j.gastro.2014.09.042.

51. Hill S.J., Decker B., Roberts E.A., Horowitz N.S., Muto M.G., Worley M.J. Jr., Feltmate C.M., Nucci M.R., Swisher E.M., Nguyen H., et al. Prediction of DNA repair inhibitor response in short-term patient-derived ovarian cancer organoids // Cancer Discov. – 2018. – V. 8. – P. 1404-1421. – DOI: 10.1158/2159-8290.CD-18-0474.

52. Huang L., Holtzinger A., Jagan I., BeGora M., Lohse I., Ngai N., Nostro C., Wang R., Muthuswamy L.B., Crawford H.C., et al. Ductal pancreatic cancer modeling and drug screening using human pluripotent stem cell- and patient-derived tumor organoids // Nat Med. – 2015. – V. 21. – P. 1364-1371. – DOI: 10.1038/nm.3973.

53. Maier C.F., Zhu L., Nanduri L.K., Kühn D., Kochall S., Thepkaysone M.L., William D., Grützmann K., Klink B., Betge J., et al. Patient-derived organoids of cholangiocarcinoma // Int J Mol Sci. – 2021. – V. 22. – P. 8675. – DOI: 10.3390/ijms22168675.

54. Saito Y., Muramatsu T., Kanai Y., Ojima H., Sukeda A., Hiraoka N., Arai E., Sugiyama Y., Matsuzaki J., Uchida R., et al. Establishment of patient-derived organoids and drug screening for biliary tract carcinoma // Cell Rep. – 2019. – V. 27. – P. 1265-1276. – DOI: 10.1016/j.celrep.2019.03.088.

55. Sato T., Stange D.E., Ferrante M., Vries R.G., Van Es J.H., Van den Brink S., Van Houdt W.J., Pronk A., Van Gorp J., Siersema P.D., et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium // Gastroenterology. – 2011. – V. 141. – P. 1762-1772. – DOI: 10.1053/j.gastro.2011.07.050.

56. Yan H.H.N., Lai J.C.W., Ho S.L., Leung W.K., Law W.L., Lee J.F.Y., Chan A.K.W., Tsui W.Y., Chan A.S.Y., Lee B.C.H., et al. RNF43 germline and somatic mutation in serrated neoplasia pathway and its association with BRAF mutation // Gut. – 2017. – V. 66. – P. 1645-1656. – DOI: 10.1136/gutjnl-2016-311849.

57. Chumduri C., Gurumurthy R.K., Berger H., Dietrich O., Kumar N., Koster S., Brinkmann V., Hoffmann K., Drabkina M., Arampatzi P., et al. Opposing Wnt signals regulate cervical squamocolumnar homeostasis and emergence of metaplasia // Nat Cell Biol. – 2021. – V. 23. – P. 184-197. – DOI: 10.1038/s41556-020-00619-0.

58. Maru Y., Kawata A., Taguchi A., Ishii Y., Baba S., Mori M., Nagamatsu T., Oda K., Kukimoto I., Osuga Y., et al. Establishment and molecular phenotyping of organoids from the squamocolumnar junc-

tion region of the uterine cervix // Cancers (Basel). – 2020. – V. 12. – P. 694. – DOI: 10.3390/cancers12030694.

59. Min J., Zhang C., Bliton R.J., Caldwell B., Caplan L., Presentation K.S., Park D.J., Kong S.H., Lee H.S., Washington M.K., et al. Dysplastic stem cell plasticity functions as a driving force for neoplastic transformation of precancerous gastric mucosa // Gastroenterology. – 2022. – V. 163. – P. 875-890. – DOI: 10.1053/j.gastro.2022.06.021.

60. Busslinger G.A., de Barbanson B., Oka R., Weusten B.L.A., de Maat M., van Hillegersberg R., Brosens L.A.A., van Boxtel R., van Oudenaarden A., Clevers H. Molecular characterization of Barrett's esophagus at single-cell resolution // Proc Natl Acad Sci USA. – 2021. – V. 118. – DOI: 10.1073/pnas.2113061118.

61. Nguyen L., Jager M., Lieshout R., de Ruiter P.E., Locati M.D., Besselink N., van der Roest B., Janssen R., Boymans S., de Jonge J., et al. Precancerous liver diseases do not cause increased mutagenesis in liver stem cells // Commun Biol. – 2021. – V. 4. – P. 1301. – DOI: 10.1038/s42003-021-02839-y.

62. Rosenbluth J.M., Schackmann R.C.J., Gray G.K., Selfors L.M., Li C.M., Boedicker M., Kuiken H.J., Richardson A., Brock J., Garber J., et al. Organoid cultures from normal and cancer-prone human breast tissues preserve complex epithelial lineages // Nat Commun. – 2020. – V. 11. – P. 1711. – DOI: 10.1038/s41467-020-15548-7.

63. B.C.H. Lee, P.S. Robinson, T.H.H. Coorens, H.H.N. Yan, S. Olafsson, H. Lee-Six, M.A. Sanders, H.C. Siu, J. Hewinson, S.S.K. Yue, et al. *Mutational landscape of normal epithelial cells in Lynch syndrome patients.* Nat. Commun., 13 (2022), p. 2710. 10.1038/s41467-022-29920-2

64. G. Vlachogiannis, S. Hedayat, A. Vatsiou, Y. Jamin, J. Fernández-Mateos, K. Khan, A. Lampis, K. Eason, I. Huntingford, R. Burke, et al. *Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers.* Science, 359 (2018), pp. 920-926. 10.1126/science.aao2774

65. M. Crespo, E. Vilar, S.Y. Tsai, K. Chang, S. Amin, T. Srinivasan, T. Zhang, N.H. Pipalia, H.J. Chen, M. Witherspoon, et al. *Colonic organoids derived from human induced pluripotent stem cells for modeling colorectal cancer and drug testing.* Nat. Med., 23 (2017), pp. 878-884. 10.1038/nm.4355

66. N. Yucer, R. Ahdoot, M.J. Workman, A.H. Laperle, M.S. Recouvreux, K. Kurowski, D.J. Naboulsi, V. Liang, Y. Qu, J.T. Plummer, et al. *Human iPSC-derived fallopian tube organoids with BRCA1 mutation recapitulate early-stage carcinogenesis.* Cell Rep., 37 (2021), p. 110146. 10.1016/j.celrep.2021.110146

67. M. Breunig, J. Merkle, M. Wagner, M.K. Melzer, T.F.E. Barth, T. Engleitner, J. Krumm, S. Wiedenmann, C.M. Cohrs, L. Perkhofer, et al. *Modeling plasticity and dysplasia of pancreatic ductal organoids derived from human pluripotent stem cells.* Cell Stem Cell, 28 (2021), pp. 1105-1124. 10.1016/j.stem.2021.03.005

68. E. Driehuis, K. Kretzschmar, H. Clevers. *Establishment of patient-derived cancer organoids for drug-screening applications.* Nat. Protoc., 15 (2020), pp. 3380-3409. 10.1038/s41596-020-0379-4

69. M. Fujii, T. Sato. *Somatic cell-derived organoids as prototypes of human epithelial tissues and diseases.* Nat. Mater., 20 (2021), pp. 156-169. 10.1038/s41563-020-0754-0

70. P. Jung, T. Sato, A. Merlos-Suárez, F.M. Barriga, M. Iglesias, D. Rossell, H. Auer, M. Gallardo, M.A. Blasco, E. Sancho, et al. *Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells.* Nat. Med., 17 (2011), pp. 1225-1227. 10.1038/nm.2470

71. L. Broutier, A. Andersson-Rolf, C.J. Hindley, S.F. Boj, H. Clevers, B.K. Koo, M. Huch. *Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation.* Nat. Protoc., 11 (2016), pp. 1724-1743. 10.1038/nprot.2016.097

72. J.F. Dekkers, E.J. van Vliet, N. Sachs, J.M. Rosenbluth, O. Kopper, H.G. Rebel, E.J. Wehrens, C. Piani, J.E. Visvader, C.S. Verissimo, et al. *Long-term culture, genetic manipulation and xenotransplantation of human normal and breast cancer organoids.* Nat. Protoc., 16 (2021), pp. 1936-1965. 10.1038/s41596-020-00474-1

73. M. Fujii, M. Matano, K. Toshimitsu, A. Takano, Y. Mikami, S. Nishikori, S. Sugimoto, T. Sato. *Human intestinal organoids maintain self-renewal capacity and cellular diversity in niche-inspired culture condition.* Cell Stem Cell, 23 (2018), pp. 787-793. 10.1016/j.stem.2018.11.016

74. H. Hu, H. Gehart, B. Artegiani, C. LÖpez-Iglesias, F. Dekkers, O. Basak, J. van Es, S.M. Chuva de Sousa Lopes, H. Begthel, J. Korving, et al. *Long-term expansion of functional mouse and human hepatocytes as 3D organoids.* Cell, 175 (2018), pp. 1591-1606. 10.1016/j.cell.2018.11.013

75. M. Jiang, H. Li, Y. Zhang, Y. Yang, R. Lu, K. Liu, S. Lin, X. Lan, H. Wang, H. Wu, et al. *Transitional basal cells at the squamous-columnar junction generate Barrett's oesophagus.* Nature, 550 (2017), pp. 529-533. 10.1038/nature24269

76. *Transitional basal cells at the squamous-columnar junction generate Barrett's oesophagus.* Nature, 550 (2017), pp. 529-533. 10.1038/nature24269

77. W.R. Karthaus, P.J. Iaquinta, J. Drost, A. Gracanin, R. van Boxtel, J. Wongvipat, C.M. Dowling, D. Gao, H. Begthel, N. Sachs, et al. *Identification of multipotent luminal progenitor cells in human prostate organoid cultures.* Cell, 159 (2014), pp. 163-175. 10.1016/j.cell.2014.08.017

78. F. Schutgens, M.B. Rookmaaker, T. Margaritis, A. Rios, C. Ammerlaan, J. Jansen, L. Gijzen, M. Vormann, A. Vonk, M. Viveen, et al. *Tubuloids derived from human adult kidney and urine for personalized disease modeling.* Nat. Biotechnol., 37 (2019), pp. 303-313. 10.1038/s41587-019-0048-8

79. M. Huch, H. Gehart, R. van Boxtel, K. Hamer, F. Blokzijl, M.M. Verstegen, E. Ellis, M. van Wenum, S.A. Fuchs, J. de Ligt, et al. *Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver.* Cell, 160 (2015), pp. 299-312. 10.1016/j.cell.2014.11.050

80. O.A. Timofeeva, N. Palechor-Ceron, G. Li, H. Yuan, E. Krawczyk, X. Zhong, G. Liu, G. Upadhyay, A. Dakic, S. Yu, et al. *Conditionally reprogrammed normal and primary tumor prostate epithelial cells: a novel patient-derived cell model for studies of human prostate cancer.* Oncotarget, 8 (2017), pp. 22741-22758. 10.18632/oncotarget.13937

81. X. Liu, E. Krawczyk, F.A. Suprynowicz, N. Palechor-Ceron, H. Yuan, A. Dakic, V. Simic, Y.L. Zheng, P. Sripadhan, C. Chen, et al. *Conditional reprogramming and long-term expansion of normal and tumor cells from human biospecimens.* Nat. Protoc., 12 (2017), pp. 439-451. 10.1038/nprot.2016.174

82. B.R.S. Correa, J. Hu, L.O.F. Penalva, R. Schlegel, D.L. Rimm, P.A.F. Galante, S. Agarwal. *Patient-derived conditionally reprogrammed cells maintain intra-tumor genetic heterogeneity.* Sci. Rep., 8 (2018), p. 4097. 10.1038/s41598-018-22427-1

83. C. Chen, S. Choudhury, D. Wangsa, C.J. Lescott, D.J. Wilkins, P. Sripadhan, X. Liu, D. Wangsa, T. Ried, C. Moskaluk, et al. *A multiplex preclinical model for adenoid cystic carcinoma of the salivary gland identifies regorafenib as a potential therapeutic drug.* Sci. Rep., 7 (2017), p. 11410. 10.1038/s41598-017-11764-2

84. S. Raghavan, P.S. Winter, A.W. Navia, H.L. Williams, A. DenAdel, K.E. Lowder, J. Galvez-Reyes, R.L. Kalekar, N. Mulugeta, K.S. Kapner, et al. *Microenvironment drives cell state, plasticity, and drug response in pancreatic cancer.* Cell, 184 (2021), pp. 6119-6137. 10.1016/j.cell.2021.11.017

85. K. Miyabayashi, L.A. Baker, A. Deschênes, B. Traub, G. Caligiuri, D. Plenker, B. Alagesan, P. Belleau, S. Li, J. Kendall, et al. *Intraductal transplantation models of human pancreatic ductal adenocarcinoma reveal progressive transition of molecular subtypes.* Cancer Discov., 10 (2020), pp. 1566-1589. 10.1158/2159-8290.CD-20-0133

86. C. Cortina, G. Turon, D. Stork, X. Hernando-Momblona, M. Sevillano, M. Aguilera, S. Tosi, A. Merlos-Suárez, C. Stephan-Otto Attolini, E. Sancho, et al. *A genome editing approach to study cancer stem cells in human tumors.* EMBO Mol. Med., 9 (2017), pp. 869-879. 10.15252/emmm.201707550

87. de Sousa, F. Melo, A.V. Kurtova, J.M. Harnoss, N. Kljavin, J.D. Hoeck, J. Hung, J.E. Anderson, E.E. Storm, Z. Modrusan, et al. *A distinct role for Lgr5(+) stem cells in primary and metastatic colon cancer.* Nature, 543 (2017), pp. 676-680. 10.1038/nature21713

88. M. Shimokawa, Y. Ohta, S. Nishikori, M. Matano, A. Takano, M. Fujii, S. Date, S. Sugimoto, T. Kanai, T. Sato. *Visualization and targeting of LGR5(+) human colon cancer stem cells.* Nature, 545 (2017), pp. 187-192. 10.1038/nature22081

89. A. Fumagalli, K.C. Oost, L. Kester, J. Morgner, L. Bornes, L. Bruens, L. Spaargaren, M. Azkanaz, T. Schelfhorst, E. Beerling, et al. *Plasticity of Lgr5-negative cancer cells drives metastasis in colorectal cancer.* Cell Stem Cell, 26 (2020), pp. 569-578. 10.1016/j.stem.2020.02.008

90. Y. Ohta, M. Fujii, S. Takahashi, A. Takano, K. Nanki, M. Matano, H. Hanyu, M. Saito, M. Shimokawa, S. Nishikori, et al. *Cell-matrix interface regulates dormancy in human colon cancer stem cells.* Nature, 608 (2022), pp. 784-794. 10.1038/s41586-022-05043-y

91. A. Alvarez-Varela, L. Novellasdemunt, F.M. Barriga, X. Hernando-Momblona, A. Canellas-Socias, S. Cano-Crespo, M. Sevillano, C. Cortina, D. Stork, C. Morral, et al. *Mex3a marks drug-tolerant persister colorectal cancer cells that mediate relapse after chemotherapy.* Nat Cancer, 3 (2022), pp. 1052-1070. 10.1038/s43018-022-00402-0

92. A. Cañellas-Socias, C. Cortina, X. Hernando-Momblona, S. Palomo-Ponce, E.J. Mulholland, G. Turon, L. Mateo, S. Conti, O. Roman, M. Sevillano, et al. *Metastatic recurrence in colorectal cancer arises from residual EMP1(+) cells.* Nature, 611 (2022), pp. 603-613. 10.1038/s41586-022-05402-9

93. K. Nanki, M. Fujii, M. Shimokawa, M. Matano, S. Nishikori, S. Date, A. Takano, K. Toshimitsu, Y. Ohta, S. Takahashi, et al. *Somatic inflammatory gene mutations in human ulcerative colitis epithelium.* Nature, 577 (2020), pp. 254-259. 10.1038/s41586-019-1844-5

94. N. Kakiuchi, K. Yoshida, M. Uchino, T. Kihara, K. Akaki, Y. Inoue, K. Kawada, S. Nagayama, A. Yokoyama, S. Yamamoto, et al. Frequent mutations that converge on the NFKBIZ pathway in ulcerative colitis. *Nature*, 577 (2020), pp. 260-265. 10.1038/s41586-019-1856-1

95. S. Olafsson, R.E. McIntyre, T. Coorens, T. Butler, H. Jung, P.S. Robinson, H. Lee-Six, M.A. Sanders, K. Arestang, C. Dawson, et al. Somatic evolution in non-neoplastic IBD-affected colon. *Cell*, 182 (2020), pp. 672–684.e11. 10.1016/j.cell.2020.06.036

96. J. Drost, R. van Boxtel, F. Blokzijl, T. Mizutani, N. Sasaki, V. Sasselli, J. de Ligt, S. Behjati, J.E. Grolleman, T. van Wezel, et al. Use of CRISPR-modified human stem cell organoids to study the origin of mutational signatures in cancer. *Science*, 358 (2017), pp. 234-238. 10.1126/science.aao3130

97. H. Fang, H.H.N. Yan, R.A. Bilardi, C. Flensburg, H. Yang, J.A. Barbour, H.C. Siu, M. Turski, E. Chew, Z. Xu, et al. Ganciclovir-induced mutations are present in a diverse spectrum of post-transplant malignancies. *Genome Med.*, 14 (2022), p. 124. 10.1186/s13073-022-01131-w

98. C. Pleguezuelos-Manzano, J. Puschhof, A. Rosendahl Huber, A. van Hoeck, H.M. Wood, J. Nomburg, C. Gurjao, F. Manders, G. Dalmasso, P.B. Stege, et al. Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks(+) *E. coli*. *Nature*, 580 (2020), pp. 269-273. 10.1038/s41586-020-2080-8

99. K.W. McCracken, E.M. Catá, C.M. Crawford, K.L. Sinagoga, M. Schumacher, B.E. Rockich, Y.H. Tsai, C.N. Mayhew, J.R. Spence, Y. Zavros, et al. Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids. *Nature*, 516 (2014), pp. 400-404. 10.1038/nature13863

100.E. De Crignis, T. Hossain, S. Romal, F. Carofiglio, P. Moulos, M.M. Khalid, S. Rao, A. Bazrafshan, M.M. Verstegen, F. Pourfarzad, et al. Application of human liver organoids as a patient-derived primary model for HBV infection and related hepatocellular carcinoma. *eLife*, 10 (2021), 10.7554/eLife.60747. 10.7554/eLife.60747

101.Y.Z. Nie, Y.W. Zheng, K. Miyakawa, S. Murata, R.R. Zhang, K. Sekine, Y. Ueno, T. Takebe, T. Wakita, A. Ryo, et al. Recapitulation of hepatitis B virus-host interactions in liver organoids from human induced pluripotent stem cells. *EBiomedicine*, 35 (2018), pp. 114-123. 10.1016/j.ebiom.2018.08.014

102.A.A. Duarte, E. Gogola, N. Sachs, M. Barazas, S. Annunziato, J.R. de Ruiter, A. Velds, S. Blatter, J.M. Houthuijzen, M. van de Ven, et al. BRCA-deficient mouse mammary tumor organoids to study cancer-drug resistance. *Nat Methods*, 15 (2018), pp. 134-140. 10.1038/nmeth.4535

103.D.V.F. Tauriello, S. Palomo-Ponce, D. Stork, A. Berenguer-Llergo, J. Badia-Ramentol, M. Iglesias, M. Sevillano, S. Ibiza, A. Cañellas, X. Hernando-Momblona, et al. TGFβ drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. *Nature*, 554 (2018), pp. 538-543. 10.1038/nature25492

104.D.J. Flanagan, N. Pentinmikko, K. Luopajärvi, N.J. Willis, K. Gilroy, A.P. Raven, L. McGarry, J.I. Englund, A.T. Webb, S. Scharaw, et al. NOTUM from Apc-mutant cells biases clonal competition to initiate cancer. *Nature*, 594 (2021), pp. 430-435. 10.1038/s41586-021-03525-z

105.S.M. van Neerven, N.E. de Groot, L.E. Nijman, B.P. Scicluna, M.S. van Driel, M.C. Lecca, D.O. Warmerdam, V. Kakkar, L.F. Moreno, F.A. Vieira Braga, et al. Apc-mutant cells act as supercompetitors in intestinal tumour initiation. *Nature*, 594 (2021), pp. 436-441. 10.1038/s41586-021-03558-4

106.K.P. O'Rourke, E. Loizou, G. Livshits, E.M. Schatoff, T. Baslan, E. Manchado, J. Simon, P.B. Romesser, B. Leach, T. Han, et al. Transplantation of engineered organoids enables rapid generation of metastatic mouse models of colorectal cancer. *Nat. Biotechnol.*, 35 (2017), pp. 577-582. 10.1038/nbt.3837

107.J. Roper, T. Tammela, N.M. Cetinbas, A. Akkad, A. Roghanian, S. Rickelt, M. Almeqdadi, K. Wu, M.A. Oberli, F.J. Sánchez-Rivera, et al. In vivo genome editing and organoid transplantation models of colorectal cancer and metastasis. *Nat. Biotechnol.*, 35 (2017), pp. 569-576. 10.1038/nbt.3836

108.S. Zhang, S. Iyer, H. Ran, I. Dolgalev, S. Gu, W. Wei, C.J.R. Foster, C.A. Loomis, N. Olvera, F. Dao, et al. Genetically defined, syngeneic organoid platform for developing combination therapies for ovarian cancer. *Cancer Discov.*, 11 (2021), pp. 362-383. 10.1158/2159-8290.CD-20-0455

109.S. Naranjo, C.M. Cabana, L.M. LaFave, R. Romero, S.L. Shanahan, A. Bhutkar, P.M.K. Westcott, J.M. Schenkel, A. Ghosh, L.Z. Liao, et al. Modeling diverse genetic subtypes of lung

adenocarcinoma with a next-generation alveolar type 2 organoid platform. *Genes Dev.*, 36 (2022), pp. 936-949. 10.1101/gad.349659.122

110.Drost, R.H. van Jaarsveld, B. Ponsioen, C. Zimberlin, R. van Boxtel, A. Buijs, N. Sachs, R.M. Overmeer, G.J. Offerhaus, H. Begthel, et al. Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells. *Nature*, 521 (2015), pp. 43-47. 10.1038/nature14415

111. M. Matano, S. Date, M. Shimokawa, A. Takano, M. Fujii, Y. Ohta, T. Watanabe, T. Kanai, T. Sato. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nat. Med.*, 21 (2015), pp. 256-262. 10.1038/nm.3802

112. A. Fumagalli, J. Drost, S.J. Suijkerbuijk, R. van Boxtel, J. de Ligt, G.J. Offerhaus, H. Begthel, E. Beerling, E.H. Tan, O.J. Sansom, et al. Genetic dissection of colorectal cancer progression by orthotopic transplantation of engineered cancer organoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 114 (2017), pp. E2357-E2364. 10.1073/pnas.1701219114

113.Arianna Fumagalli, Jarno Drost, Saskia J. E. Suijkerbuijk, Ruben van Boxtel, Joep de Ligt, G. Johan Offerhaus, Harry Begthel, Evelyne Beerling, Ee Hong Tan, Owen J. Sansom, Edwin Cuppen Hans Clevers h.clevers@hubrecht.eu, and Jacco van Rheenen Genetic dissection of colorectal cancer progression by orthotopic transplantation of engineered cancer organoids. https://orcid.org/0000-0002-0400-9542

114. A.F.M. Dost, A.L. Moye, M. Vedaie, L.M. Tran, E. Fung, D. Heinze, C. Villacorta-Martin, J. Huang, R. Hekman, J.H. Kwan, et al. Organoids model transcriptional hallmarks of oncogenic KRAS activation in lung epithelial progenitor cells. *Cell Stem Cell*, 27 (2020), pp. 663-678. 10.1016/j.stem.2020.07.022

115. J.F. Dekkers, J.R. Whittle, F. Vaillant, H.R. Chen, C. Dawson, K. Liu, M.H. Geurts, M.J. Herold, H. Clevers, G.J. Lindeman, et al. Modeling breast cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human breast organoids. *J. Natl. Cancer Inst.*, 112 (2020), pp. 540-544. 10.1093/jnci/djz196

116. J. Ogawa, G.M. Pao, M.N. Shokhirev, I.M. Verma. Glioblastoma model using human cerebral organoids. *Cell Rep.*, 23 (2018), pp. 1220-1229. 10.1016/j.celrep.2018.03.105

117. S. Bian, M. Repic, Z. Guo, A. Kavirayani, T. Burkard, J.A. Bagley, C. Krauditsch, J.A. Knoblich. Genetically engineered cerebral organoids model brain tumor formation. *Nat. Methods*, 15 (2018), pp. 631-639. 10.1038/s41592-018-0070-7

118. B. Artegiani, L. van Voorthuijsen, R.G.H. Lindeboom, D. Seinstra, I. Heo, P. Tapia, C. López-Iglesias, D. Postrach, T. Dayton, R. Oka, et al. Probing the tumor suppressor function of BAP1 in CRISPR-engineered human liver organoids. *Cell Stem Cell*, 24 (2019), pp. 927-943. 10.1016/j.stem.2019.04.017

119.K. Kawasaki, M. Fujii, S. Sugimoto, K. Ishikawa, M. Matano, Y. Ohta, K. Toshimitsu, S. Takahashi, N. Hosoe, S. Sekine, et al. Chromosome engineering of human colon-derived organoids to develop a model of traditional serrated adenoma. *Gastroenterology*, 158 (2020), pp. 638-651. 10.1053/j.gastro.2019.10.009

120. Y.H. Lo, K.S. Kolahi, Y. Du, C.Y. Chang, A. Krokhotin, A. Nair, W.D. Sobba, K. Karlsson, S.J. Jones, T.A. Longacre, et al. A CRISPR/Cas9-engineered ARID1A-deficient human gastric cancer organoid model reveals essential and nonessential modes of oncogenic transformation. *Cancer Discov.*, 11 (2021), pp. 1562-1581. 10.1158/2159-8290.CD-20-1109

121. Z. Wu, J. Zhou, X. Zhang, Z. Zhang, Y. Xie, J.B. Liu, Z.V. Ho, A. Panda, X. Qiu, P. Cejas, et al. Reprogramming of the esophageal squamous carcinoma epigenome by SOX2 promotes ADAR1 dependence. *Nat. Genet.*, 53 (2021), pp. 881-894. 10.1038/s41588-021-00859-2

122. H. Liu, Y. Zhang, Y.Y. Zhang, Y.P. Li, Z.Q. Hua, C.J. Zhang, K.C. Wu, F. Yu, Y. Zhang, J. Su, et al. Human embryonic stem cell-derived organoid retinoblastoma reveals a cancerous origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 117 (2020), pp. 33628-33638. 10.1073/pnas.2011780117

123. E. Fessler, J. Drost, S.R. van Hooff, J.F. Linnekamp, X. Wang, M. Jansen, F. De Sousa E Melo, P.R. Prasetyanti, J.E. IJspeert, M. Franitza, et al. TGFβ signaling directs serrated adenomas to the mesenchymal colorectal cancer subtype. *EMBO Mol. Med.*, 8 (2016), pp. 745-760. 10.15252/emmm.201606184

124. B.E. Michels, M.H. Mosa, B.I. Streibl, T. Zhan, C. Menche, K. Abou-El-Ardat, T. Darvishi, E. Członka, S. Wagner, J. Winter, et al. Pooled in vitro and in vivo CRISPR-Cas9 screening identifies tumor suppressors in human colon organoids. *Cell Stem Cell*, 26 (2020), pp. 782–792.e7. 10.1016/j.stem.2020.04.003

125. T. Ringel, N. Frey, F. Ringnalda, S. Janjuha, S. Cherkaoui, S. Butz, S. Srivatsa, M. Pirkl, G. Russo, L. Villiger, et al. Genome-scale CRISPR screening in human intestinal organoids identifies drivers.

126. K. Murakami, Y. Terakado, K. Saito, Y. Jomen, H. Takeda, M. Oshima, N. Barker. A genome-scale CRISPR screen reveals factors regulating Wnt-dependent renewal of mouse gastric epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 118 (2021), 10.1073/pnas.2016806118

127. H.A. McCauley, J.M. Wells. Pluripotent stem cell-derived organoids: using principles of developmental biology to grow human tissues in a dish. *Development*, 144 (2017), pp. 958-962. 10.1242/dev.140731

128. J.R. Spence, C.N. Mayhew, S.A. Rankin, M.F. Kuhar, J.E. Vallance, K. Tolle, E.E. Hoskins, V.V. Kalinichenko, S.I. Wells, A.M. Zorn, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature*, 470 (2011), pp. 105-109. 10.1038/nature09691

129.Y. Shi, H. Inoue, J.C. Wu, S. Yamanaka. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 16 (2017), pp. 115-130. 10.1038/nrd.2016.245

130.R.C. Smith, V. Tabar. Constructing and deconstructing cancers using human pluripotent stem cells and organoids. *Cell Stem Cell*, 24 (2019), pp. 2-24. 10.1016/j.stem.2018.11.012

131.M.A. Lancaster, M. Renner, C.A. Martin, D. Wenzel, L.S. Bicknell, M.E. Hurles, T. Homfray, J.M. Penninger, A.P. Jackson, J.A. Knoblich. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, 501 (2013), pp. 373-379. 10.1038/nature12517

132.Y.W. Chen, S.X. Huang, A.L.R.T. de Carvalho, S.H. Ho, M.N. Islam, S. Volpi, L.D. Notarangelo, M. Ciancanelli, J.L. Casanova, J. Bhattacharya, et al. A three-dimensional model of human lung development and disease from pluripotent stem cells. *Nat. Cell Biol.*, 19 (2017), pp. 542-549. 10.1038/ncb3510

133. M. Hohwieler, A. Illing, P.C. Hermann, T. Mayer, M. Stockmann, L. Perkhofer, T. Eiseler, J.S. Antony, M. Müller, S. Renz, et al. Human pluripotent stem cell-derived acinar/ductal organoids generate human pancreas upon orthotopic transplantation and allow disease modelling. *Gut*, 66 (2017), pp. 473-486. 10.1136/gutjnl-2016-312423

134. S.L. Trisno, K.E.D. Philo, K.W. McCracken, E.M. Catá, S. Ruiz-Torres, S.A. Rankin, L. Han, T. Nasr, P. Chaturvedi, M.E. Rothenberg, et al. Esophageal organoids from human pluripotent stem cells delineate Sox2 functions during esophageal specification. *Cell Stem Cell*, 23 (2018), pp. 501–515.e7. 10.1016/j.stem.2018.08.008

135. J.H. Low, P. Li, E.G.Y. Chew, B. Zhou, K. Suzuki, T. Zhang, M.M. Lian, M. Liu, E. Aizawa, C. Rodriguez Esteban, et al. Generation of human PSC-derived kidney organoids with patterned nephron segments and a de novo vascular network. *Cell Stem Cell*, 25 (2019), pp. 373–387.e9. 10.1016/j.stem.2019.06.009

136. S.J. Mun, J.S. Ryu, M.O. Lee, Y.S. Son, S.J. Oh, H.S. Cho, M.Y. Son, D.S. Kim, S.J. Kim, H.J. Yoo, et al. Generation of expandable human pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like liver organoids. *J. Hepatol.*, 71 (2019), pp. 970-985. 10.1016/j.jhep.2019.06.030

137. M. Zhang, J.J. Vandana, L. Lacko, S. Chen. Modeling cancer progression using human pluripotent stem cell-derived cells and organoids. *Stem Cell Res.*, 49 (2020), p. 102063. 10.1016/j.scr.2020.102063

138. M.P. Chao, A.J. Gentles, S. Chatterjee, F. Lan, A. Reinisch, M.R. Corces, S. Xavy, J. Shen, D. Haag, S. Chanda, et al. Human AML-iPSCs reacquire leukemic properties after differentiation and model clonal variation of disease. *Cell Stem Cell*, 20 (2017), pp. 329–344.e7. 10.1016/j.stem.2016.11.018

139. K. Kumano, S. Arai, M. Hosoi, K. Taoka, N. Takayama, M. Otsu, G. Nagae, K. Ueda, K. Nakazaki, Y. Kamikubo, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from primary chronic myelogenous leukemia patient samples. *Blood*, 119 (2012), pp. 6234-6242. 10.1182/blood-2011-07-367441

140. K. Hu, J. Yu, K. Suknuntha, S. Tian, K. Montgomery, K.D. Choi, R. Stewart, J.A. Thomson, I.I. Slukvin. Efficient generation of transgene-free induced pluripotent stem cells from normal and neoplastic bone marrow and cord blood mononuclear cells. *Blood*, 117 (2011), pp. e109-e119. 10.1182/blood-2010-07-298331

141. S. Gandre-Babbe, P. Paluru, C. Aribeana, S.T. Chou, S. Bresolin, L. Lu, S.K. Sullivan, S.K. Tasian, J. Weng, H. Favre, et al. Patient-derived induced pluripotent stem cells recapitulate hematopoietic abnormalities of juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood*, 121 (2013), pp. 4925-4929. 10.1182/blood-2013-01-478412

142.A. Linkous, D. Balamatsias, M. Snuderl, L. Edwards, K. Miyaguchi, T. Milner, B. Reich, L. Cohen-Gould, A. Storaska, Y. Nakayama, et al. Modeling patient-derived glioblastoma with cerebral organoids. *Cell Rep.*, 26 (2019), pp. 3203–3211.e5. 10.1016/j.celrep.2019.02.063

143. M.S. Choe, J.S. Kim, H.C. Yeo, C.M. Bae, H.J. Han, K. Baek, W. Chang, K.S. Lim, S.P. Yun, I.S. Shin, et al. A simple metastatic brain cancer model using human embryonic stem cell-derived cerebral organoids. *FASEB J.*, 34 (2020), pp. 16464-16475. 10.1096/fj.202000372R

144.J. Barretina, G. Caponigro, N. Stransky, K. Venkatesan, A.A. Margolin, S. Kim, C.J. Wilson, J. Lehár, G.V. Kryukov, D. Sonkin, et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature*, 483 (2012), pp. 603-607. 10.1038/nature11003

145. M.J. Garnett, E.J. Edelman, S.J. Heidorn, C.D. Greenman, A. Dastur, K.W. Lau, P. Greninger, I.R. Thompson, X. Luo, J. Soares, et al. Systematic identification of genomic markers of drug sensitivity in cancer cells. *Nature*, 483 (2012), pp. 570-575. 10.1038/nature11005

146.L. Li, H. Knutsdottir, K. Hui, M.J. Weiss, J. He, B. Philosophe, A.M. Cameron, C.L. Wolfgang, T.M. Pawlik, G. Ghiaur, et al. Human primary liver cancer organoids reveal intratumor and interpatient drug response heterogeneity. *JCI Insight*, 4 (2019), 10.1172/jci.insight.121490

147. C.J. de Witte, J. Espejo Valle-Inclan, N. Hami, K. Lõhmussaar, O. Kopper, C.P.H. Vreuls, G.N. Jonges, P. van Diest, L. Nguyen, H. Clevers, et al. Patient-derived ovarian cancer organoids mimic clinical response and exhibit heterogeneous inter- and intrapatient drug responses. *Cell Rep.*, 31 (2020), p. 107762. 10.1016/j.celrep.2020.107762

148.S. Karkampouna, F. La Manna, A. Benjak, M. Kiener, M. De Menna, E. Zoni, J. Grosjean, I. Klima, A. Garofoli, M. Bolis, et al. Patient-derived xenografts and organoids model therapy response in prostate cancer. *Nat. Commun.*, 12 (2021), p. 1117. 10.1038/s41467-021-21300-6

149.J. Betge, N. Rindtorff, J. Sauer, B. Rauscher, C. Dingert, H. Gaitantzi, F. Herweck, K. Srour-Mhanna, T. Miersch, E. Valentini, et al. The drug-induced phenotypic landscape of colorectal cancer organoids. *Nat. Commun.*, 13 (2022), p. 3135. 10.1038/s41467-022-30722-9

150.K. Toshimitsu, A. Takano, M. Fujii, K. Togasaki, M. Matano, S. Takahashi, T. Kanai, T. Sato. Organoid screening reveals epigenetic vulnerabilities in human colorectal cancer. *Nat. Chem. Biol.*, 18 (2022), pp. 605-614. 10.1038/s41589-022-00984-x

151.S.N. Ooft, F. Weeber, K.K. Dijkstra, C.M. McLean, S. Kaing, E. van Werkhoven, L. Schipper, L. Hoes, D.J. Vis, J. van de Haar, et al. Patient-derived organoids can predict response to chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients. *Sci. Transl. Med.*, 11 (2019), 10.1126/scitranslmed.aay2574

152.C. Calandrini, S.R. van Hooff, I. Paassen, D. Ayyildiz, S. Derakhshan, M.E.M. Dolman, K.P.S. Langenberg, M. van de Ven, C. de Heus, N. Liv, et al. Organoid-based drug screening reveals Neddylation as therapeutic target for malignant rhabdoid tumors. *Cell Rep.*, 36 (2021), p. 109568. 10.1016/j.celrep.2021.109568

153.P. Tan, M. Wang, A. Zhong, Y. Wang, J. Du, J. Wang, L. Qi, Z. Bi, P. Zhang, T. Lin, et al. SRT1720 inhibits the growth of bladder cancer in organoids and murine models through the SIRT1-HIF axis. *Oncogene*, 40 (2021), pp. 6081-6092. 10.1038/s41388-021-01999-9

154.T. Seidlitz, Y.T. Chen, H. Uhlemann, S. Schölch, S. Kochall, S.R. Merker, A. Klimova, A. Hennig, C. Schweitzer, K. Pape, et al. Mouse models of human gastric cancer subtypes with stomach-specific CreERT2-mediated pathway alterations. *Gastroenterology*, 157 (2019), pp. 1599–1614.e2. 10.1053/j.gastro.2019.09.026

155. H. Zhang, A. Schaefer, Y. Wang, R.G. Hodge, D.R. Blake, J.N. Diehl, A.G. Papageorge, M.D. Stachler, J. Liao, J. Zhou, et al. Gain-of-function RHOA mutations promote focal adhesion kinase activation and dependency in diffuse gastric cancer. *Cancer Discov.*, 10 (2020), pp. 288-305. 10.1158/2159-8290.CD-19-0811

156.S. Sugimoto, Y. Ohta, M. Fujii, M. Matano, M. Shimokawa, K. Nanki, S. Date, S. Nishikori, Y. Nakazato, T. Nakamura, et al. Reconstruction of the human colon epithelium in vivo. *Cell Stem Cell*, 22 (2018), pp. 171–176.e5. 10.1016/j.stem.2017.11.012

157.K. Karlsson, M. Przybilla, H. Xu, E. Kotler, K. Karagyozova, A. Sockell, K. Liu, A. Mah, Y.H. Lo, B. Lu, et al. Experimental evolution in TP53 deficient human gastric organoids recapitulates tumorigenesis. Preprint at *bioRxiv* (2022), 10.1101/2022.04.09.487529

158.R. Coppo, J. Kondo, K. Iida, M. Okada, K. Onuma, Y. Tanaka, M. Kamada, M. Ohue, K. Kawada, K. Obama, et al. Distinct but interchangeable subpopulations of colorectal cancer cells with different growth fates and drug sensitivity. *iScience*, 26 (2023), p. 105962. 10.1016/j.isci.2023.105962

159.K.K. Dijkstra, C.M. Cattaneo, F. Weeber, M. Chalabi, J. van de Haar, L.F. Fanchi, M. Slagter, D.L. van der Velden, S. Kaing, S. Kelderman, et al. Generation of tumor-reactive T cells by co-culture of

peripheral blood lymphocytes and tumor organoids. *Cell*, 174 (2018), pp. 1586–1598.e12. 10.1016/j.cell.2018.07.009

160.B. Palikuqi, D.T. Nguyen, G. Li, R. Schreiner, A.F. Pellegata, Y. Liu, D. Redmond, F. Geng, Y. Lin, J.M. Gómez-Salinero, et al. Adaptable haemodynamic endothelial cells for organogenesis and tumorigenesis. *Nature*, 585 (2020), pp. 426-432. 10.1038/s41586-020-2712-z

161.J.T. Neal, X. Li, J. Zhu, V. Giangarra, C.L. Grzeskowiak, J. Ju, I.H. Liu, S.H. Chiou, A.A. Salahudeen, A.R. Smith, et al. Organoid modeling of the tumor immune microenvironment. *Cell*, 175 (2018), pp. 1972–1988.e16. 10.1016/j.cell.2018.11.021

162.S. Ding, C. Hsu, Z. Wang, N.R. Natesh, R. Millen, M. Negrete, N. Giroux, G.O. Rivera, A. Dohlman, S. Bose, et al. Patient-derived micro-organospheres enable clinical precision oncology. *Cell Stem Cell*, 29 (2022), pp. 905–917.e6. 10.1016/j.stem.2022.04.006

163.N.S. Münch, H.Y. Fang, J. Ingermann, H.C. Maurer, A. Anand, V. Kellner, V. Sahm, M. Wiethaler, T. Baumeister, F. Wein, et al. High-fat diet accelerates carcinogenesis in a mouse model of Barrett's esophagus via interleukin 8 and alterations to the gut microbiome. *Gastroenterology*, 157 (2019), pp. 492-506.e2. 10.1053/j.gastro.2019.04.013

164.S. Price, S. Bhosle, E. Gonçalves, X. Li, D.P. McClurg, S. Barthorpe, A. Beck, C. Hall, H. Lightfoot, L. Farrow, et al. A suspension technique for efficient large-scale cancer organoid culturing and perturbation screens. *Sci. Rep.*, 12 (2022), p. 5571. 10.1038/s41598-022-09508-y

165.N. Gjorevski, N. Sachs, A. Manfrin, S. Giger, M.E. Bragina, P. Ordóñez-Morán, H. Clevers, M.P. Lutolf. Designer matrices for intestinal stem cell and organoid culture. *Nature*, 539 (2016), pp. 560-564. 10.1038/nature20168

КАНЦЕРОГЕНЕЗДІ МОДЕЛЬДЕУДЕГІ ЖӘНЕ ЖЕКЕ МЕДЕЦИНАДАҒЫ ЖАСУШАЛАР БИОТЕХНОЛОГИЯЛАРЫНЫҢ ПОТЕНЦИАЛЫ

А.К. Наханов, С.К. Коканов, А.А. Теребай*, Л.Г. Мараховская

«Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» ЖШС,
«QazBioPharm» ұлттық холдингі, Гвардейский, Қазақстан Республикасы
* s.kokanov@biosafety.kz

Аннотация. Онкологиялық аурулар адамзаттың ең өзекті мәселелерінің бірі болып табылады. Өкінішке орай, қатерлі ісіктің алдын алу мен емдеудің заманауи әдістері өлім-жітімнің жоғарылау тенденциясына және осы аурулардың жаңа жағдайларының пайда болуына сәйкес келмейді. Мұның бір себебі адам ісіктерін, олардың әртүрлі морфологиясын, молекулалық сипаттамаларын және микроортасын дәл бейнелейтін клиникаға дейінгі *in vitro* үлгілерінің болмауы. Ісіктерді зерттеу, олардың морфологиялық сипаттамалары, емдеу болжамы, емдеу тәсілдер әлі күнге дейін жасуша мен жануарлар өсінділерін 2-өлшемді үлгілерде жүргізілуде. Алайда, жасуша өсінділерінің 2-өлшемді үлгілерінде тінге тән архитектураның, биохимиялық сигналдардың және жасушалар мен қоршаған матрицаның өзара әрекеттесуінің болмауына байланысты шектеулер бар, сондықтан олар *in vivo* күрделі процестерді дәл көрсете және үлгі ретінде алмайды. Өз кезегінде, ісік ауруларын модельдеу және дәрі-дәрмектерді сынау үшін жануарларды пайдалану қымбат және уақытты қажет етеді, сонымен қатар бұл модельдер түрлердің айырмашылығына байланысты адамдардың биологиялық реакцияларына бейнелей алмайды. 3-өлшемді үлгілер морфология, пролиферация, дәрілік емдеуге жауап беру, сондай-ақ гендер мен ақуыздардың экспрессиясы тұрғысынан анағұрлым қолайлы, тіндердің in vivo өсуін дәлірек бейнелейді. Бұл шолуда канцерогенезді және олардың дәл медицинадағы әлеуетін зерттеу үшін жасушалық биотехнологияларды қолдану туралы заманауи ғылыми дәлелдер келтірілген.

Түйінді сөздер: жасуша өсіндісілері, органоидтар, онкология, in vitro - модельдер, канцерогенез, жеке медицина.

CELLULAR BIOTECHNOLOGIES IN THE MODELING OF CARCINOGENESIS AND THEIR POTENTIAL IN PRECISION MEDICINE

A.K. Nakhanov, S.K. Kokanov, A.A. Terebay*, L.G. Marakhovskaya

LLP «Research Institute for Biological Safety Problems», National holding «QazBioPharm», Guardeyskiy, Republic of Kazakhstan
* s.kokanov@biosafety.kz

Annotation. Oncological diseases are one of the most pressing problems of mankind. Unfortunately, modern methods of cancer prevention and treatment have not kept pace with the trend of increasing mortality and the emergence of new cases of these diseases. One of the reasons for this is the lack of preclinical in vitro models that would accurately simulate human tumors, their diverse morphology, molecular characteristics and microenvironment. Studies of tumors, their morphological characteristics, treatment prognosis, and therapeutic approaches are still carried out on two-dimensional models of cell and animal cultures. However, two-dimensional cell culture models have limitations due to the lack of tissue-specific architecture, biochemical signals, and interactions between cells and the surrounding matrix, so they cannot accurately display and simulate complex processes in vivo. In turn, using animals to model tumor diseases and test drugs for them is not only expensive and time-consuming, but also these models cannot simulate biological reactions of humans due to species differences. Three-dimensional tissue models are more suitable in terms of morphology, migration, proliferation, response to drug treatment, as well as gene and protein expression, and more accurately mimic tissue growth in vivo. This review presents current scientific data on the use of cellular biotechnologies to study carcinogenesis and their potential in precision medicine.

Key words: cell culture, organoids, oncology, in vitro models, carcinogenesis, precision medicine.

МРНТИ 34.25.01

DOI: 10.58318/2957-5702-2025-23-84-92

Оригинальная статья

ПОДБОР СТАБИЛИЗИРУЮЩЕЙ СРЕДЫ ДЛЯ ВИРУСА РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ ЧЕЛОВЕКА

Тургын М.Б [1], Кендирбаева С.К [2], Кенжебаева М.К [1],Жугунисов К.Д [1], Мамбеталиев М[1], Азанбекова М.А[1], Килибаев С.С [1]

[1]ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», Национальный холдинг «QazBioPharm», Гвардейский, Республика Казахстан
[2]Кыргызский государственный университет им. И. Арабаева, г.Бишкек, Республика Кыргызстан, *sanat.kilibaev@mail.ru

Аннотация. В данной работе представлены результаты исследования по подбору стабилизирующей среды для вируса респираторно-синцитиальной инфекции человека. При этом проведены исследования с использованием разных стабилизирующих сред, применяемые в биотехнологии и изучены их влияния на сохраняемости изучаемого вируса при хранении в разных температурно-временных условиях с последующим определением остаточной биологической активности образцов вируса в перевиваемой клеточной культуре Vero.

По результатам исследования было установлено, что все образцы вируса, содержащие пептон, сахарозу, желатин и их смеси при низких температурах (минус 40 °С и плюс 4 °С) благоприятно влияют на сохраняемость вируса, тогда как высокая плюсовая температура (37 °С и 22 °С) способствует снижению биологической активности вируса респираторно-синцитиальной инфекции человека. Эти данные важны для хранения, транспортировки и применения вируса при разработке диагностических и вакцинных препаратов против данной инфекции.

Ключевые слова: респираторно-синцитиальная инфекция человека, вирус, сохраняемость, защитная среда, режим хранения, биологическая активность.

Введение

Вирус респираторно-синцитиальной инфекции человека (РСИ) играет чрезвычайно важную роль в структуре инфекционной патологии дыхательного тракта, в особенности у детей первых лет жизни. В развитых индустриальных странах у детей в возрасте до 3 лет, госпитализированных с острыми респираторными инфекциями с поражением нижних отделов дыхательного тракта, частота диагностирования РСИ достигает 42–63 % [1]. Возбудитель РСИ является РНК-содержащим вирусом, который вместе с метапневмовирусом человека относится к семейству *Pneumoviridae* и имеет два генотипа (А и В) [2]. Вирус РСИ передается по воздуху через зараженные респираторные частицы, выделяемые инфицированными людьми. Считается, что вирус может также передаваться при прямом контакте с инфицированными людьми или загрязненными вирусом предметами [3].

РСИ ежегодно становится причиной 3,6 миллиона случаев госпитализации и около 100 000 случаев смерти во всем мире среди детей в возрасте до 5 лет [4]. Глобальные оценки заболеваемости РСИ среди взрослых отсутствуют. Однако в Соединенных Штатах Америки РСИ приводит к 160 000 случаев госпитализации и 10 000 случаев смерти среди взрослых в возрасте старше 65 лет [5].

Для биотехнологии критически важно длительное сохранение вируса в биологически активном состоянии, что обеспечивает поддержание его жизнеспособности и антигенных свойств. Это достигается за счет использования специализированных условий: глубокой заморозки, лиофилизации (сублимационной сушки) и строгого соблюдения температурного режима (холодовой цепи) при транспортировке и хранении. Залогом надежной стабильности сухих биопрепаратов является применение в технологии их изготовления эффективных защитных сред-стабилизаторов, предотвращающих повреждения микроорганизмов в процессе замораживания, обезвоживания и длительного хранения в высушенном состоянии при различных температурах [6-8]. Из ряда факторов, оказывающих влияние на выживаемость микроорганизмов в процессе высушивания и хранения, наиболее важную роль играет состав защитной среды. Защитные среды, применяемые при высушивании вирусов, многочисленны и разнообразны.

При выборе защитной среды необходимо учитывать не только непосредственный эффект, полученный при высушивании, но и способность среды обеспечить максимальное и длительное сохранение вирусов в высушенных препаратах. Устойчивость лиофилизированных биопрепаратов при хранении является одной из важных моментов в технологической цепи [9-11]. Необходимость сохранения биологической активности препаратов является первостепенной задачей в биологической промышленности.

В связи с этим изучение сохраняемости вируса РСИ критически важно, так как знание его стабильности в комплексе с эффективной защитной средой необходимо при разработке профилактических и диагностических препаратов.

Цель исследования: Подбор стабилизирующей среды для вируса респираторно-синцитиальной инфекции человека, обеспечивающей сохраняемости его при лиофилизации и хранении при разных температурно-временных режимах.

Материалы и методы исследования.

Вирус и клеточная линия. Для проведения исследования использован штамм «РСВ-А2» вируса респираторно-синцитиальной инфекции человека

Для получения вирусной биомассы использовали матрасы с монослоем клеточной линии культуры клеток Vero. Для культивирования клеточной линии культуры использовали питательную среду Игла (DMEM) (Sigma, США), содержащую 2 % сыворотки плода крупного рогатого скота (FBS) с антибиотиками (пенициллина натриевой соли 100 МЕ/мл и стрептомицина сульфат - 100 мг/мл). Биологическую активность вируса определяли титрованием в перевиваемой линии культуры клеток Vero с использованием 96-луночных планшет.

Стабилизирующие среды. При подборе стабилизирующей среды использовали комплексные защитые среды, состоящие из 5 % пептона и 1 % желатина (1 образец), 6 % пептона и 3 % сахарозы (2 образец) и 7,5 % пептона (3 образец) в конечных концентрациях в соотношении 1:1 с вируссодержащей суспензией. В качестве контроля использовали высушенный вирус без защитной среды (4 образец).

Процесс лиофилизации. Перед лиофилизацией смеси вируссодержащей суспензии с защитными средами разливали в ампулы по 1 мл и затем подвергали замораживанию при минус 45°С в течении (12±4) ч и лиофилизировали в аппарате “Labconco” при следующем режиме:

температуру замораживания - минус 55-60 °С; фактическое давление в камере - от 3 до 7 Па; процесс сублимации и досушивания при температуре минус 55 °С; температура нагрева полок - от 10 до 40 °С; конечная температура биоматериала - (22±2) °С. После высушивания материала ампулы запаивали с вакуумом на карусельно-коллекторном аппарате при остаточном давлении от 25 до 30 Па. Запаянные ампулы проверяли визуально на отсутствие трещин и на наличие вакуума по ГОСТ 28083–2012.

Определение сохраняемости вируса. Для определения сохраняемости лиофилизированных образцов вируса с различными защитными средами, ампулы заложили на хранение при температуре плюс (37±0,5) ℃ на 7 суток, (20,0±2,0) ℃ на 3 мес., (4,0 ± 2,0) ℃ на 6 мес. и при минус (4,0 ± 2,0) ℃ на 12 мес. При этом остаточную биологическую активность вируса определяли методом титрования в линии культуры клеток Vero в разведениях от 10^{-1} до 10^{-8} в трех повторности. Каждым разведением вируса инфицировали по 4 лунок планшета с культурой клеток внося по 100 мкм. Инфицированные и неинфицированные (контроль) планшеты с культурой клеток инкубировали в CO_2 термостате при температуре (37 ± 1) °С. Учет результатов титрования вируса проводили, начиная со второй сутки. При этом каждую лунку планшета просматривают под малым увеличением микроскопа и отмечали ЦПД вируса (условно в крестах). Титр вируса рассчитывали методм Reed L.J. и Muench H.A. [12] и выражали в lg $ТЦД_{50}/см^3$.

Статистическая обработка экспериментальных данных. Результаты представлены в виде X±m, X – среднее арифметическое значение, m – стандартное отклонение. Расчеты проводили с помощью компьютерной программы «Microsoft Excel» и методом дисперсионного анализа (One-way ANOVA). Порогом статистической значимости считали $p < 0,100$.

Результаты. В процессе культивирования штамма вируса РСИ человека в перевиваемой линии культуры клеток Vero проявление ЦПД вируса наблюдалось с 4 сут срока культивирования. Деструктивное изменение в монослое культуры клеток до 80-85% было отмечено на 5-6 сут (рисунок 1), где наблюдалось заметное скопление и округление клеток.

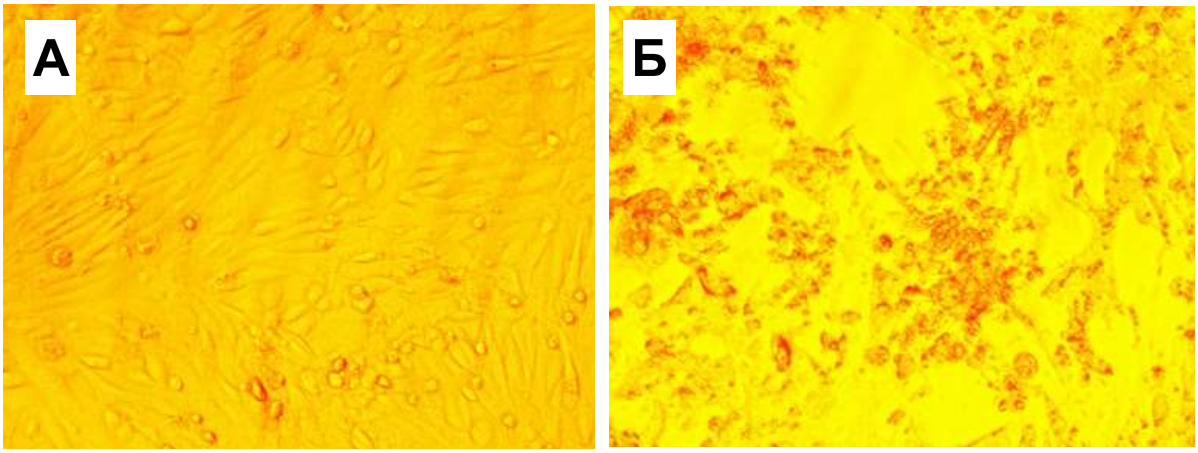


Рисунок 1 – Микрофотография проявления ЦПД штамма «РСВ-А2» вируса РСИ человека в культуре клеток Vero. А – не инфицированная культура клеток Vero (контроль); Б – инфицированная культура клеток Vero вирусом РСИ (6 сут. инкубации)

Для подбора стабилизирующей среды была наработана вируссодержащая суспензия штамма «РСВ-А2» вируса респираторно-синцитиальной инфекции человека с биологической активностью (5,50±0,00) lg $ТЦД_{50}/см^3$.

После объединения вируссодержащей суспензии штамма с испытуемыми защитными средами были лиофилизированы. Эффективность испытуемых защитных сред оценивали по разнице биологической активности исходных и высушенных образцов вируса. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Биологическая активность образцов штамма «РСВ-А2» вируса РСИ человека при лиофилизации с разными защитными средами

№ образца штамма вируса	Состав защитной среды	Титр вируса до лиофилизации, lg $ТЦД_{50}/см^3$, n=3, X±m	Титр вируса после лиофилизации, lg $ТЦД_{50}/см^3$, n=3, X±m	Снижение титра вируса после лиофилизации, lg $ТЦД_{50}/см^3$
1	5 % пептона+ 1 % желатина	5,50±0,00	4,92±0,08	0,58
2	6 % пептона + 3 % сахарозы		5,25±0,00	0,25
3	7,5 % пептона		5,33±0,08	0,17
4	вирус без защитной среды (контроль)		4,08±0,0,8	1,42

Как видно из таблицы 1, что наибольшими защитными свойствами при лиофилизации обладают образцы вируса №3 (снижение на 0,17 lg $ТЦД_{50}/см^3$) и №2 (снижение на 0,25 lg $ТЦД_{50}/см^3$), состоящие из 7,5 % пептона и 6 % пептона+3 % сахарозы соответственно, по сравнению с образцами №1 (0,58 lg $ТЦД_{50}/см^3$), состоящими из 5 % пептона +1 % желатина и №4 (1,42 lg $ТЦД_{50}/см^3$) вирус без защитной среды.

Далее были изучены защитные свойства стабилизирующих сред в образцах вируса при хранении в разных температурно-временных режимах.

Результаты проведенных исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Сохраняемость лиофилизированных образцов штамма «РСВ-А2» вируса РСИ человека с различными защитными средами при температуре (37±0,5) ºС

№ образцов	Состав защитной среды вируса	Срок хранения, сут	Биологическая активность, lg $ТЦД_{50}$		Снижения биологической активности, lg $ТЦД_{50}$	Значимость различий, P	Установленный срок хранения образцов вируса
			исходная	После хранения			
1	5 % пептон + 1 % желатина	3	4,91±0,14	4,91±0,14	0,00	> 0,500	7 сут
		7		4,66±0,08	0,25	> 0,200	
		15		3,91±0,14	1,00	< 0,005	
		30		2,41±0,14	2,50	< 0,001	
2	6 % пептона + 3 % сахарозы	3	5,25±0,00	5,25±0,00	0,00	> 0,500	15 сут
		7		5,23±0,08	0,02	> 0,500	
		15		4,75±0,14	0,50	< 0,250	
		30		3,25±0,00	2,00	< 0,001	
3	7,5 % пептона	3	5,33±0,14	5,33±0,08	0,00	> 0,500	15 сут
		7		5,17±0,17	0,16	> 0,500	
		15		5,08±0,08	0,25	> 0,100	
		30		4,92±0,08	0,41	< 0,050	
4	вирус без защитной среды (контроль)	3	4,08±0,14	3,75±0,14	0,33	> 0,100	3 сут
		7		3,33±0,08	0,75	< 0,005	
		15		2,17±0,08	1,91	< 0,001	
		30		1,83±0,08	2,25	< 0,001	

Из данных таблицы 2 видно, что хранение при температуре (37±0,5) ºС биологическую активность образцов вируса в течение 15 сут (P>0,25-0,5) сохраняют защитные среды №2 (6 % пептона+3 % сахарозы) и №3 (7,5 % пептона) по сравнению с образцами №1 (5 % пептона+1 % желатина) и №4 (контроль) 7 и 3 сут соответственно.

При изучении влиянии температуры (20±2,0) ºС на сохраняемость образцов штамма «РСВ-А2» вируса РСИ человека так же установлены рекомендуемые сроки хранения образцов вируса с минимальной потерей биологической активности (p <0,100) (таблица 3).

Таблица 3 – Сохраняемость лиофилизированных образцов штамма «РСВ-А2» вируса РСИ человека с различными защитными средами при температуре (20,0±2,0) ºС

№ образцов	Состав защитной среды вируса	Срок хранения	Биологическая активность, lg $ТЦД_{50}$		Снижения активности, lg $ТЦД_{50}$	Значимость различий, Р	Установленный срок хранения образцов вируса
			исходная	После хранения			
1	5 % пептон и 1 % желатин	15 сут	4,91±0,14	4,75±0,14	0,16	> 0,500	30 сут
		30 сут		4,67±0,08	0,24	> 0,100	
		60 сут		4,17±0,08	0,74	< 0,005	
		90 сут.		3,75±0,14	1,16	< 0,001	
2	6 % пептон и 3 % сахароза	15 сут	5,25±0,08	5,17±0,08	0,08	> 0,500	30 сут
		30 сут		5,08±0,17	0,17	> 0,500	
		60 сут		4,42±0,08	0,83	< 0,001	
		90 сут.		3,75±0,14	1,50	< 0,001	
3	7,5% пептон	15 сут	5,33±0,14	5,33±0,08	0,00	> 0,500	60 сут
		30 сут		5,25±0,08	0,08	> 0,500	
		60 сут		5,08±0,08	0,25	> 0,100	
		90 сут.		4,25±0,14	1,08	< 0,005	
4	без стабилизирующей среды (контроль)	15 сут	4,08±0,14	3,92±0,08	0,16	> 0,200	15 сут
		30 сут		3,42±0,08	0,66	< 0,010	
		60 сут		2,92±0,08	1,16	< 0,001	
		90 сут.		2,25±0,14	1,83	< 0,001	

Данные таблицы 3 показывают, что при комнатной температуре (20,0 ± 2,0) ºС хранения защитная среда №3 способствует сохранению биологической активности штамма «РСВ-А2» вируса РСИ человека без существенной потери (Р>0,100-0,500) в течение 60 сут по сравнению с остальными испытанными образцами вируса.

В дальнейших исследованиях представлялось целесообразным изучить сохраняемость штамма «РСВ-А2» вируса РСИ человека в условиях бытового холодильника, т.е. при температуре (4,0 ± 2,0) ºС. Результаты исследования представлены на таблице 4.

Таблица 4 - Сохраняемость лиофилизированных образцов штамма «РСВ-А2» вируса РСИ человека с различными защитными средами при температуре (4,0 ± 2,0) ºС

№ образцов	Состав защитной среды вируса	Срок хранения	Биологическая активность, lg $ТЦД_{50}$		Снижения активности, lg $ТЦД_{50}$	Значимость различий, Р	Установленный срок хранения образцов вируса
			исходная	После хранения			
1	5 % пептон и 1 % желатин	1 мес	4,91±0,14	4,83±0,08	0,08	> 0,500	3 мес.
		3 мес.		4,75±0,00	0,16	> 0,200	
		6 мес.		4,08±0,08	0,83	< 0,005	
		9 мес.		3,67±0,08	1,24	< 0,001	
2	6 % пептон и 3 % сахароза	3 мес	5,25±0,00	5,25±0,00	0,00	> 0,500	9 мес.
		6мес.		5,17±0,08	0,08	> 0,500	
		9 мес.		5,08±0,08	0,17	> 0,200	
		12 мес.		4,67±0,08	0,58	< 0,010	
3	7,5% пептон	1 мес	5,33±0,14	5,33±0,08	0,00	> 0,500	более 12 мес (срок наблюдения)
		2 мес.		5,33±0,08	0,00	> 0,500	
		3 мес.		5,25±0,00	0,08	> 0,500	
		6 мес.		5,08±0,08	0,25	> 0,200	
		12 мес.		5,08±0,08	0,25	> 0,200	
4	без стабилизирующей среды (контроль)	1 мес	4,08±0,14	3,92±0,08	0,16	> 0,400	1 мес.
		2 мес.		3,50±0,25	0,58	< 0,050	
		3 мес.		3,25±0,14	0,83	< 0,010	
		6 мес.		2,92±0,08	1,16	< 0,001	

Как видно из таблицы 4, что лиофилизированный образец штамма «РСВ-А2» вируса РСИ человека №3 со стабилизирующей средой (7,5 % пептона) при температуре (4,0 ± 2,0) ºС

сохраняется более 12 месяцев без существенного снижения биологической активности (P> 0,400) по сравнению с остальными образцами защитных сред за этот период хранения (P< 0,001-0,010).

Хранение образцов штамма «РСВ-А2» вируса РСИ человека с разными защитными средами при низких минусовых температурах оказало положительное влияние на сохраняемость всех испытуемых образцов.

Результаты исследования сохраняемости образцов РСВ при температуре (40,0 ± 1,0) ºС представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Сохраняемость лиофилизированных образцов штамма «РСВ-А2» вируса РСИ человека с различными защитными средами при температуре минус (40,0 ± 1,0) ºС

№ образцов	Состав защитной среды вируса	Срок хранения	Биологическая активность, lg $ТЦД_{50}$		Снижения активности, lg $ТЦД_{50}$	Значимость различий, P	Установленный срок хранения образцов вируса
			исходная	после хранения			
1	5 % пептон +1 % желатин	1 мес.	4,91±0,14	4,91±0,14	0,00	> 0,500	12 мес.
		3 мес.		4,83±0,08	0,08	> 0,500	
		6 мес.		4,75±0,00	0,16	> 0,400	
		12 мес.		4,50±0,08	0,41	> 0,100	
2	6 % пептон + 3 % сахароза	1 мес.	5,25±0,00	5,25±0,00	0,00	> 0,500	12 мес.
		3 мес.		5,17±0,08	0,08	> 0,500	
		6 мес.		5,17±0,08	0,08	>0,500	
		12 мес.		5,00±0,08	0,25	>0,100	
3	7,5% пептон	1 мес.	5,33±0,14	5,33±0,08	0,00	> 0,500	более 12 мес.
		3 мес.		5,33±0,08	0,00	> 0,500	
		6 мес.		5,25±0,00	0,08	> 0,500	
		12 мес.		5,17±0,08	0,16	> 0,200	
4	без стабилизирующей среды (контроль)	1 мес.	4,08±0,14	4,08±0,14	0,00	> 0,500	6 мес
		3 мес.		4,00±0,00	0,08	> 0,500	
		6 мес.		3,75±0,14	0,33	> 0,100	
		12 мес.		3,58±0,08	1,00	<0,010	

Данные таблицы 5 показывают, что все образцы штамма «РСВ-А2» вируса РСИ человека хорошо сохранились в условиях низкой температуры минус (40,0 ± 1,0) ºС (12 мес. и более) в зависимости от состава защитной среды. Следует отметить, 3-образец вируса, где защитной средой является 7,5 % пептон, в биологически активном состоянии сохраняет вирус более 12 мес. (срок наблюдения).

Таким образом, наиболее защитным свойством для штамма «РСВ-А2» вируса РСИ человека обладает защитная среда, состоящая из 7,5 % пептона.

Обсуждение

Основными методами сохранения большинства вирусов для исследовательских и производственных целей являются сушка и замораживание при низких температурах с использованием защитных сред [13]. Лиофилизация является заключительным этапом производства живых биологических препаратов, и особое внимание уделяется защитным средам, которые влияют не только на процесс сушки вирусной массы, но и на сохранение ее свойств, особенно при длительном хранении [14]. Поэтому поиск оптимальной защитной среды для вирусов, которая может обеспечить высокую эффективность биологических препаратов после лиофилизации и при дальнейшем хранении, является важной задачей [10].

Следует отметить, что на просторах интернета в открытых источниках исследований по выбору стабилизирующих компонентов для сохранения жизнеспособности РСВ мы не нашли. Поэтому полученные результаты не обсуждались и не анализировались подробно в сравнении с другими аналогичными исследованиями. Однако мы попытались анализировать полученные результаты с результатами других авторов по изучаемому вопросу в отношении вирусов, которые вызывают респираторные заболеваний. Так, Н.Т. Сактаганов и др. [15], установили наилучшие показатели жизнеспособности 12 штаммов вируса гриппа А и В, с защитной средой содержащие 2 % желатина и 20 % сахарозы при лиофилизации и хранении при температуре 4 °С, которые стабильны в течении 6 месяцев. Однако авторы не предоставили сравнительных данных

исследований с разными стабилизирующими средами при разных температурно-временных режимах хранения. По нашему опыту было отмечено, что после лиофилизации возбудителя РСИ человека с различными испытанными стабилизаторами, активность образца №3 (7,5 пептон) существенно не снижалась при хранении на протяжении 12 мес. и более при низких температурах.

Б.Ш. Мырзахметова и др. [16] для лиофилизации вируса SARS-CoV-2 рекомендуют использовать среду, содержащую сахарозу, трегалозу и их комбинации с пептоном и гидролизатом лактальбумина. При хранении ими лиофилизированного вируса при температуре ниже 8 °С в комплексе с этими защитными средами в течение 180 суток, снижения его активности не наблюдалось.

Резюмируя вышесказанное, при выборе защитной среды для вируса РСИ человека, в качестве стабилизатора для лиофилизации и хранении вируса было отдано предпочтение 7,5 % пептону в конечной концентрации, где его биологическая активность в течение года при температуре (4,0 ± 2,0) ºС и минус (40,0±1,0) ºС снизилась лишь на 0,25 lg $ТЦД_{50}$.

Заключение

На основании полученных результатов, для лиофилизации РСВ была выбрана стабилизирующая среда, состоящая из 7,5 % пептона в конечной концентрации и установленный срок хранения при температуре (37 ± 0,5) ºС до 15 сут, при температуре (20,0 ± 2,0) ºС до 60 сут, при температуре (4,0 ± 2,0) ºС и (40,0 ± 1,0) ºС до 1 года и более (срок наблюдения).

Финансирование: Данная научная статья выпалена в рамках проекта по Государственному заданию «Услуги по обеспечению биологической безопасности в сфере науки» на 2025 г. по выполнению задачи по стандартизации процедур хранения и поддержания возбудителей особо опасных инфекций человека, животных и фитопатогенов коллекции НИИПББ.

Благодарность. Авторы выражают благодарность Б.И. Бектурову за помощь в проведении научно-исследовательских работ.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Литература

1. В.З. Кривицкая Респираторно-синцитиальная вирусная инфекция. Особенности патогенеза, стратегия профилактики и лечения /Вопросы современной педиатрии /2013/ ТОМ 12/ № 2. https://vsp.spr-journal.ru/jour/article/viewFile/344/248

2. Rima B, Collins P, Easton A, Fouchier R, Kurath G, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Pneumoviridae. J Gen Virol. 2017 Dec;98(12):2912-2913

3. Респираторно-синцитиальный вирус. ВОЗ. https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/respiratory-syncytial-virus-(rsv)

4. Li Y, Wang X, Blau DM, Caballero MT, Feikin DR, Gill CJ, et al. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in children younger than 5 years in 2019: a systematic analysis. Lancet. 2022 May 28;399(10340):2047-2064.

5. Landi SN, Garofalo DC, Reimbaeva M, Scott AM, Jiang L, et al. Hospitalization Following Outpatient Diagnosis of Respiratory Syncytial Virus in Adults. JAMA Netw Open. 2024 Nov 4;7(11):e2446010.

6. Токарик Э.Ф., Ковальская Л.А., Скотникова Т.А. и др. Методические подходы к конструированию защитных сред для живых вирусных вакцин // Научные основы производства ветеринарных препаратов. – М., 1989. – С. 17–21.

7. Токарик Э.Ф., Ковальская Л.А., Константинов В.М. Методы статистического анализа в исследованиях по стабилизации вирусных вакцин // Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины: тез. докл. междунар. конф. – Харьков, 1988. – С. 56.

8. Slonim D. Nestovicna vakcina. 3 Tepelna stabilita lyofilizavane vakciny // Cs. Epidem. – 1978. – Vol. 27, № 1. – P. 8–14.

9. Долинов К.Е. Основы технологии сухих биопрепаратов. – М., 1969. – 231 с.

10. Никитин Е.Е., Звягин И.В. Замораживание и высушивание биологических препаратов. – М., 1971. – 343 с. 219

11. Звягин И.В., Хорьков И.А., Токарик Э.Ф. и др. Методические рекомендации по разработке режимов замораживания-высушивания биологических препаратов. – М., 1981. – 33 с.

12. Reed, I.J. A simple method of estimating fifty per cent endpoints [Text] / I.J. Reed // Am. J. Hyd., 1938. – Vol.27. – P. 493-497.

13. Главацкий В.Н., Кравченко В.М., Накопов В.Н. и др. Стабилизация эффективных веществ при замораживании и высушивании очищенных биопрепаратов // Акт. пробл. вет. вирусол. - Владимир, 1977. С. 103-107.

14. Варяница В.В., Высеканцев И.П. Защитные среды для хранения стандартного штамма вируса бешенства CVS при температурах минус 20-80 0С // Вісник проблем біології і медицини.- 2019. - Вип. 4, Т. 1 (153).- С. 205-211. ISSN 2077-4214.

15. Н.Т. Сактаганов, Т.И. Глебова, А.М. Баймухаметова, С.Б. БАйсейіт, Н.С. Онгарбаева, Д.А. Исмагулова, Г.В. Лукманова, Н.Г. Кливлеева, Г.К. Абдилова, Н.Т. Жанузакова. Использование лиофилизации для хранения штаммов вируса гриппа // Микробиология және вирусология. 2021, №4 (35). С.48-55. doi: 10.53729/MV-AS.2021.04.04

16. Б.Ш. Мырзахметова, А.А. Түсіпова, Г.А. Жаппарова, Т.М. Тленчиева, К.Б. Бисенбаева, Л.Б. Кутумбетов. Подбор эффективной рецептуры защитных компонентов для стабилизации аттенуированного вируса SARS-COV-2// Gylym zane bilim, 2025. Том 1 № 2 (79). С.167-177. DOI 10.52578/2305-9397-2025-2-1-167-178

References

1. V. Z. Krivitskaya. Infectio virus syncytialis respiratorii. Characteres pathogenesis, praeventionis et strategiae curationis / Quaestiones paediatricae modernae / 2013 / VOL. 12 / No. 2. https://vsp.spr-journal.ru/jour/article/viewFile/344/248

2. Rima B, Collins P, Easton A, Fouchier R, Kurath G, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Pneumoviridae. J Gen Virol. 2017 Dec;98(12):2912-2913

3. Virus syncytialis respiratorius. OMS. https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/respiratory-syncytial-virus-(rsv)

4. Li Y, Wang X, Blau DM, Caballero MT, Feikin DR, Gill CJ, et al. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in children younger than 5 years in 2019: a systematic analysis. Lancet. 2022 May 28;399(10340):2047-2064.

5. Landi SN, Garofalo DC, Reimbaeva M, Scott AM, Jiang L, et al. Hospitalization Following Outpatient Diagnosis of Respiratory Syncytial Virus in Adults. JAMA Netw Open. 2024 Nov 4;7(11):e2446010.

6. Tokarik E.F., Kovalskaya L.A., Skotnikova T.A. et al. Aditus methodologici ad designandum ambitus protectores pro vaccinis viralibus vivis // Fundamenta scientifica productionis medicamentorum veterinariorum. - M., 1989. - P. 17-21.

7. Tokarik E.F., Kovalskaya L.A., Konstantinov V.M. Methodi analysis statisticae in studiis de stabilizatione vaccinorum viralium // Res gestae et spes progressionis cryobiologiae et cryomedicinae: summarium relationum conventus internationalis – Kharkov, 1988. – P. 56.

8. Slonim D. Nestovicna vakcina. 3 Tepelna stabilita lyofilizavane vakciny // Cs. Epidem. – 1978. – Vol. 27, № 1. – P. 8–14.

9. Dolinov, K.E. *Fundamenta technologiae productorum biologicorum siccatorum*. – M., 1969. – 231 p.

10. Nikitin E.E., Zvyagin I.V. Congelatio et siccatio praeparatorum biologicorum. – M., 1971. – 343 p. 219

11. Zvyagin I.V., Khorkov I.A., Tokarik E.F. et al. *Commendationes methodologicae ad modos congelationis-siccationis pro praeparationibus biologicis evolvendos.* – M., 1981. – 33 p.

12. Reed, I.J. A simple method of estimating fifty per cent endpoints [Text] / I.J. Reed // Am. J. Hyd., 1938. – Vol.27. – P. 493-497.

13. Glavatsky V.N., Kravchenko V.M., Nakopov V.N., et al. *Stabilizatio substantiarum efficacium per congelationem et exsiccationem productorum biologicorum purificatorum* // Akt. probl. vet. virol. - Vladimir, 1977. Pp. 103-107.

14. Varyanitsa V.V., Vysekancev I.P. *Media protectora ad conservandam stirpem normalem virus rabiei CVS ad temperaturas minus 20-80°C* // Bulletin of Problems of Biology and Medicine. - 2019. - Fasciculus 4, V. 1 (153). - Pp. 205-211. ISSN 2077-4214.

15. N.T. Saktaganov, T.I. Glebova, A.M. Baimukhametova, S.B. БАйсейіт, N.S. Ongarbaeva, D.A. Ismagulova, G.V. Lukmanova, N.G. Klivleeva, G.K. Abdilova, N.T. Zhanuzakova. Usus lyophilizationis ad conservandas stirpes virus influenzae // Microbiology and Virology. 2021, No. 4 (35). P. 48-55. doi: 10.53729/MV-AS.2021.04.04

16. B.Sh. Myrzakhmetova, A.A. Tusipova, G.A. Zhapparova, T.M. Tlenchieva, K.B. Bisenbaeva, L.B. Kutumbetov. Selectio formulae efficacis componentium tutelarium ad stabilizationem virus SARS-COV-2 attenuati // Gylym zane bilim, 2025. Vol. 1 No. 2 (79). P. 167-177. DOI 10.52578/2305-9397-2025-2-1-167-178

АДАМНЫҢ ТЫНЫС АЛУ СИНЦИТИАЛДЫҚ ИНФЕКЦИЯ ВИРУСЫНА АРНАЛҒАН ТҰРАҚТАНДЫРУШЫ ОРТАНЫ ТАҢДАУ

Тұрғын М.Б[1], Кендирбаева С.К[2], Кенжебаева М.К [1], Жүгінісов К.Д [1], Мамбеталиев М[1], Азанбекова М.А[1], Килибаев С.С [1]

[1]«Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» ЖШС, «QazBioPharm» ұлттық холдингі, Гвардейский, Қазақстан Республикасы
[2] И. Арабаев атындағы Қырғыз мемлекеттік университеті., Бішкек, Қырғызстан Республикасы
*sanat.kilibaev@mail.ru

Аннотация. Бұл мақалада адамның тыныс алу синцитиалды ауыру тудыратын вирусы үшін тұрақтандырғыш ортаны таңдау бойынша зерттеу нәтижелері ұсынылған. Зерттеулер биотехнологияда қолданылатын әртүрлі тұрақтандырғыш орталарды пайдалана отырып олардың әртүрлі температура мен уақыт аралығындағы вирустың үлгілерінің сақталуын, вирустың биологиялық белсенділігін Vero жасуша өсіндісінде зерттеу арқылы анықталды.

Зерттеулер пептон, сахароза, желатин және олардың қоспаларын қамтитын барлық вирус үлгілері төмен температураларда (минус 40 °С және плюс 4 °С) вирустың сақталуына пайдалы әсерін тигізетін, ал жоғары температураларда (плюс 37 °С және 22 °С) адамның тыныс алу синцитиалды ауыру тудыратын вирусының биологиялық белсенділігінің төмендегені анықталды. Бұл деректер вирусты сақтау, тасымалдау және осы инфекцияға қарсы диагностикалық және вакциналық препараттарды әзірлеуде пайдалану үшін маңызды.

Кілт сөздер: адамның тыныс алу синцитиалды ауыру тудыратын вирусы**,** вирусты сақтау, қорғаныс ортасы, сақтау шарттары, биологиялық белсенділік.

SELECTION OF A STABILIZING MEDIUM FOR HUMAN RESPIRATORY SYNCYTIAL INFECTION VIRUS

Turgyn M.B[1], Kendirbaeva S.K[2], Kenzhebaeva M.K[1], Zhugunisov K.D[1], Mambetaliev M[1], Azanbekova M.A[1], Kilibayev S.S[1]

[1]LLP «Research Institute for Biological Safety Problems», National holding «QazBioPharm», Guardeyskiy, Republic of Kazakhstan
[2]Kyrgyz State University named after I. Arabaev, Bishkek, Republic of Kyrgyzstan
* sanat.kilibaev@mail.ru

Abstract. This paper presents the results of a study on the selection of a stabilizing medium for the human respiratory syncytial virus (RSV). Studies were conducted using various stabilizing media used in biotechnology, examining their effects on the storability of the studied virus during storage under different temperature and time conditions, followed by determination of the residual biological activity of virus samples in a continuous Vero cell culture.

The study found that all virus samples containing peptone, sucrose, gelatin, and their mixtures at low temperatures (minus 40 °C and plus 4 °C) had a beneficial effect on virus storability, whereas high temperatures (plus 37 °C and 22 °C) reduced the biological activity of the RSV. These data are important for the storage, transportation, and use of the virus in the development of diagnostic and vaccine preparations against this infection.

Keywords: human respiratory syncytial virus**,** virus storability, protective environment, storage conditions, biological activity.

ДАННЫЕ ОБ АВТОРАХ

1. Саметова Жанна Жумабековна, магистр, научный сотрудник, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0002-2332-2841,

Аманова Жанат Темирбаевна, магистр, ведущий научный сотрудник, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0002-3987-6814

Тұрыскелді Шолпан Сманқызы, магистр, научный сотрудник, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0002-9515-0655

Үсембай Абдурахман Қайратұлы, младший научный сотрудник, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0003-3639-3793

Абитаев Руслан Тореханович, магистр, старший научный сотрудник, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0001-5609-2491

Кондибаева Жанат Буркитбаевна, PhD, ведущий научный сотрудник, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0002-8224-8047

Булатов Ербол Акенович, к.б.н, заведующий лабораторией, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0001-8543-4219

2. Шыныбекова Гаухар Орынбековна, магистр, старший научный сотрудник, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0002-6976-1540, sh.gaukhar@biosafety.kz.

Алмежанова Мейрим Джаксыбековна, магистр, старший лаборант, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0002-0450-5941, m.almezhanova@biosafety.kz

Кожабергенов Нурлан Сиязбекович, магистр, заведующий лабораторией, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0001-6299-9399, n.kozhabergen@biosafety.kz

Султанкулова Куляйсан Турлыбаевна, к.б.н, заведующий лабораторией, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0002-1332-1247, k.sultankulova@biosafety.kz

3. Жадра Кудайбергенова, PhD докторант КазНАИУ, научный сотрудник, ТОО «Казахский научно - исследовательский ветеринарный институт», ORCID 0009-0002-0671-7174, zhanka11.04@mail.ru

Жандос Абай, PhD, заведующий лаборатории, ТОО «Казахский научно - исследовательский ветеринарный институт», ORCID 0000-0003-1822-1437, abaizh097@mail.ru

Роза Айтлесова, магистр ветеринарных наук, младший научный сотрудник, ТОО «Казахский научно - исследовательский ветеринарный институт», rozaitlesova@mail.ru

Куандык Шыныбаев, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник, ТОО «Казахский научно - исследовательский ветеринарный институт», ORCID 0000-0002-7702-1390, shynybaev.k@mail.ru

Мархабат Касенов, кандидат ветеринарных наук, генеральный директор, ТОО «Казахский научно - исследовательский ветеринарный институт», ORCID 0000-0001-6124-703X, kassenov_mm@mail.ru

Айнур Нурпейсова, PhD, заместитель генерального директора, ТОО «Казахский научно - исследовательский ветеринарный институт», ORCID 0000-0002-7039-5621, ainurnurpeisova@mail.ru

4. Назаров Сүйіндік Ғалымжанұлы, ассистент кафедры Фармакогнозии с курсом ботаники, Казахский национальный медицинский университет имени С.Д. Асфендиярова,ORCID 0009-0000-4513-6989, nazarov.s@kaznmu.kz.

Жаңабайқызы Салтанат, магистр технических наук, ассистент кафедры «Фармацевтической и токсикологической химии» НАО «Казахский Национальный медицинский университет имени С. Д. Асфендиярова», ORCID 0009-0001-3739-6382, zhangabaykyzy_s@mail.ru.

5. Наханов Азиз Куралбаевич, к.б.н, заведующий лабораторией, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0002-6593-0271, a.nakhanov@biosafety.kz.

Коканов Сабит Кабдышевич, к.в.н., старший научный сотрудник, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0009-0005-2630-8489.

Теребай Айбол Айдосұлы, магистр, младший научный сотрудник, ТОО «Научно-

исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0003-2077-7063a.terebay@biosafety.kz.

Мараховская Любовь Геннадьевна, старший лаборант, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», l.marahovskaya@biosafety.

6. Тұрғын Мөлдір Бақтиярқызы, старший специалист по биологической безопасности, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0009-0008-0630-8635, moldir.turgyn.98@mail.ru.

Кендирбаева Салтанат Кенешовна, профессор, заведующий кафедрой биоразнообразия имени М. М. Ботбаева, кандидат биологических наук, доцент, Кыргызский государственный университет имени И. Арабаева, г. Бишкек, Кыргызская Республика, ORCID 0009-0006-8532-9607, santaken999@gmail.com.

Кенжебаева Маржан Кулкубековна, магистр, младший научный сотрудник, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0001-6666-6532, m.kenjebaeva@biosafety.kz.

Жугунисов Куандык Даулетбаевич, PhD, заведующий лабораторией, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0003-4238-5116, k.zhugunisov@biosafety.kz.

Мамбеталиев Муратбай, к.в.н., главный научный сотрудник, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0001-6034-6642, m.mambetalyev@biosafety.kz.

Азанбекова Молдир Абдильдаевна, PhD, старший научный сотрудник, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0002-5807-7604, azanbekova.m@biosafety.kz.

Килибаев Санат Серикович, PhD, старший научный сотрудник, ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», ORCID 0000-0001-9203-2189, s.kilibayev@biosafety.kz.

ТРЕБОВАНИЯ К НАУЧНЫМ СТАТЬЯМ ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ В ЖУРНАЛЕ

Правила для авторов

Научный журнал «*Биобезопасность и Биотехнология*» принимает к публикации оригинальные исследовательские статьи, краткие сообщения и обзоры по следующим направлениям науки:

- Биологическая безопасность и биозащита
- Микробиология
- Медицинская и ветеринарная биотехнология
- Фитопатология и биотехнология растений

КАК ПОДГОТОВИТЬ СТАТЬЮ В ЖУРНАЛ

1. Требования к рукописям, направляемым в журнал

Текст должен быть набран в редакторе Microsoft Word, шрифт Times New Roman, размер 12, интервал одинарный, все поля 2 см, абзацный отступ 1 см. Все страницы и строки должны быть пронумерованы и иметь сквозную нумерацию. Выравнивание – по ширине (с автоматической расстановкой переносов).

Объем статей должен составлять 10-15 печатных страниц для оригинальных статей, 15-25 печатных страниц для обзоров, до 5 печатных страниц для кратких сообщений.

Авторы также должны представить каждое изображение в отдельном файле в оригинальном размере (не менее 300 dpi).

2. Язык статьи

К публикации в журнале принимаются рукописи из любых стран на казахском, русском и/или английском языках. Метаданные статьи (название статьи, Ф.И.О. авторов, официальное название учреждений авторов, адреса, резюме статьи, ключевые слова, информация для контакта с ответственным автором) должны быть представлены на трех языках.

Метаданные статьи на другом языке (если статья написана на казахском, то на русском языке или же наоборот) и на английском языке приводят в конце статьи после списка использованной литературы.

Для статей на казахском и русском языках пристатейный список литературы **(References)** должен быть дополнительно представлен в транслитерированном виде – см. пункт 4).

В случае, если авторы не предоставили метаданные статьи на языках, отличающихся от языка написания статьи или перевод некачественный, то редакция прибегает к услугам переводчика самостоятельно (право выбора переводчика остается за редакцией).

3. Титульный лист (метаданные статьи).

Титульный лист должен включать следующую информацию:

1) код МРНТИ (Международный рубрикатор научно-технической информации; определяется по ссылке http://grnti.ru/)

2) название статьи (лаконично и информативно. Заголовки часто используются в информационно-поисковых системах. По возможности избегайте сокращений и формул)

3) инициалы и фамилии авторов (пожалуйста, четко фамилии (имена) каждого автора и проверьте правильность написания всех имен)

4) организация и ее местонахождение для каждого автора (все аффилиации нумеруются надстрочной арабскими цифрами сразу после имени автора и перед соответствующим адресом; укажите адрес каждой организации, включая название населенного пункта и страны), и, если возможно, адрес электронной почты каждого автора. Если все авторы статьи работают в одном

учреждении, указывать место работы каждого автора отдельно не нужно, достаточно указать учреждение один раз. Если у автора несколько мест работы, каждое обозначается отдельным цифровым индексом.

5) контактная информация (адрес электронной почты) автора для корреспонденции: (поставьте знак «*» сразу после индекса аффилиации автора для корреспонденции и перед контактной информацией). Если авторов для корреспонденции несколько, укажите инициалы рядом с каждым адресом.

6) при наличии указать для авторов ID номера ORCID с использованием гиперссылки в значке

7) аннотация (один абзац не более 300 слов, при этом не менее 150 слов). В аннотации должны быть кратко изложены цель исследования, основные результаты и основные выводы. Аннотация часто представляется отдельно от статьи. В связи с этим следует избегать ссылок, нестандартных или необычных сокращений, но, если они необходимы, они должны быть определены при их первом упоминании в самом реферате. Аннотация должна быть объективным изложением статьи, не должна содержать результатов, не представленных и не обоснованных в основном тексте, и не должна преувеличивать основные выводы.

8) ключевые слова (5-10 слов или словосочетаний, должны отражать основное содержание статьи; определить предметную область исследования. Каждое ключевое слово отделяется точкой с запятой).

4. План построения оригинальных статей

Структура оригинальных статей должна соответствовать формату IMRAD (Introduction, Methods, Results, Discussion, Conclusion) и содержать разделы ВВЕДЕНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ, РЕЗУЛЬТАТЫ, ОБСУЖДЕНИЕ, ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В конце статьи размещают информацию о финансовой поддержке работы, гранты, благодарности; указание на конфликт интересов; список цитированной литературы. Оригинальная статья оформляется в соответствии ШАБЛОНА, предложенного редколлегией журнала journal.biosafety.kz.

Во введении следует изложить текущее состояние области исследований и процитировать основные публикации, обосновать актуальность и значимость проводимых исследований. Необходимо кратко указать цель работы. Насколько это возможно, сделайте введение понятным для ученых, не занимающихся вашей конкретной областью исследований. Ссылки должны быть пронумерованы в порядке их появления и обозначены цифрой или цифрами в квадратных скобках, например, [1] или [2,3], или [4–6]. Дополнительные сведения о ссылках см. в конце документа.

Материалы и методы должны быть описаны достаточно подробно, чтобы другие могли воспроизвести и использовать опубликованные результаты. Новые методы и протоколы должны быть описаны подробно, в то время как хорошо зарекомендовавшие себя методы могут быть кратко описаны и надлежащим образом процитированы.

Исследования с участием животных или людей, а также другие исследования, требующие этического одобрения, должны указывать орган, предоставивший одобрение, и соответствующий кодекс этического одобрения.

Раздел «**Результаты**» должен содержать точное описание экспериментальных результатов, их интерпретацию, а также экспериментальные выводы, которые можно сделать. При необходимости этот раздел может быть разделен на подразделы.

В разделе «**Обсуждение»** авторы должны обсудить полученные результаты и то, как их можно интерпретировать с точки зрения предыдущих исследований и рабочих гипотез. В обсуждении можно привести возможные объяснения сходства и противоречий с другими

аналогичными исследованиями. В максимально широком контексте следует обсудить выводы и их значение. Также в данном разделе могут быть выделены будущие направления исследований.

Раздел **«Заключение»** включает обобщение и подведение итогов работы на текущем этапе. Выводы должны быть точными и использоваться для обобщения результатов исследований в конкретных научных областях с описанием предложений или возможностей дальнейшей работы.

Финансирование: Укажите источник финансирования исследований (название финансирующей организации, номер гранта). Внимательно проверьте правильность приведенных данных и используйте стандартное написание названий финансирующих организаций.

Благодарности: В этом разделе вы можете отметить любую оказанную поддержку. Это может включать административную и техническую поддержку или предоставление материалов для экспериментов.

Конфликт интересов: Все авторы должны раскрывать информацию о любых финансовых и личных отношениях с другими людьми или организациями, которые могут ненадлежащим образом повлиять (предвзято) на их работу. Примеры потенциальных конфликтов интересов включают занятость, консультации, владение акциями, гонорары, платные экспертные заключения, патентные заявки/регистрации, а также гранты или другое финансирование. Если нет никаких конфликтов к опубликованию материалов в статье, указать, что авторы не имеют конфликта интересов.

В разделе **«Литература»** следует привести список цитированной литературы, оформленный согласно ГОСТ 7.1-2003 «Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления» (требование к изданиям, входящих в перечень КОКСОН). Список литературы должен быть пронумерован в порядке упоминания в тексте (включая цитаты в таблицах и легендах). Включите цифровой идентификатор объекта (DOI) для всех ссылок, где они доступны. В тексте ссылки должны быть заключены в квадратные скобки [..] и поставлены перед знаками препинания; например [1], [1–3] или [1,3].

Примеры оформления ссылок:

Статья в периодическом издании (журнале)

Aspden K., Passmore J.A., Tiedt F., Williamson A.L. Evaluation of lumpy skin disease virus, a capripoxvirus, as a replication-deficient vaccine vector // J. Gen. Virol. – 2003. – Vol. 84 (Pt 8). – P. 1985-1996. doi: ... (при наличии)

Гуненков В.В., Черняк В.П., Кузнецов Г.Д. Сухая живая вакцина против оспы овец из штамма С113/86 // Ветеринария. – 1993. – № 11/12. – С. 23-24.

Книги

Зайцев В.Л. Морфогенез вируса оспы овец в культуре клеток /В.Л.Зайцев, Н.Т.Сандыбаев, К.Т.Султанкулова, В.Ю.Белоусов, О.В.Червякова, В.М.Строчков // Вирус оспы овец: молекулярно-биологические свойства и структура генома. – Алматы, 2011. – С.73

-84. ISBN 978-601-278-599-9

Материалы конференций

Султанкулова К.Т. Токсико-биологическая оценка гриба *Histoplasma farciminosum* – возбудителя эпизоотического лимфангоита лошадей // Ветеринарные и зоотехнические вопросы коневодства: первая науч.-практ. конф. - Алматы, 2003. – С. 26-29

Сансызбай А.Р. Эпизоотическая ситуация лимфангита лошадей, вызванного *Histoplasma farciminosum*, в коневодческих хозяйствах Республики Казахстан //Современное состояние и актуальные проблемы развития ветеринарной науки и практики: науч.-практ. конф. – Алматы, 2005. – С. 234-237.

Интернет-источники

Вспышка оспы овец на территории Российской Федерации в Ярославской области [Электрон.ресурс]. - URL: http://www.fsvps.ru/fsvps/news/18142.html (дата обращения 3 сентября 2016 г).

Далее приводится транслитерированный список использованных источников в разделе REFERENCES. При этом англоязычные источники дублируются из раздела ЛИТЕРАТУРА, казахскоязычные и русскоязычные ссылки должны быть приведены к латинскому алфавиту (латинице) и английскому переводу. Ссылка должна дополнительно содержать DOI (идентификатор цифрового объекта), если таковой имеется. Транслитерация осуществляется с использованием онлайн-платформы http://translit-online.ru/. Эта онлайн-платформа не транслитерирует отдельные буквы казахского алфавита. Авторы должны самостоятельно вносить исправления после транслитерации казахского текста.

Транслитерированный список литературы должен выглядеть в следующем виде для источников на кириллице: автор(-ы) (транслитерация) → (год в круглых скобках)→название статьи в транслитерированном варианте [перевод названия статьи на английский язык в квадратных скобках], название русскоязычного источника (транслитерация, либо английское название – если есть), выходные данные с обозначениями на английском языке.

Например: Gokhberg L., Kuznetsova T. (2011) Strategiya-2020: novye kontury rossiiskoi innovatsionnoi politiki [Strategy 2020: New Outlines of Innovation Policy]. *Foresight-Russia*, vol. 5, no 4, pp. 8–30.

5. Оформление обзоров и кратких сообщений

Обзорные статьи должны включать в себя введение, разделы обзора литературы и заключение. Файл шаблона также можно использовать для подготовки первой и заключительной частей обзорной рукописи. Основная часть может содержать разделы и подразделы. Обзоры публикуются по заказу редакции или по инициативе автора.

Краткое сообщение представляет краткий формат информации логически завершенного научного исследования в объёме до 5 страниц, включающее не более 2 рисунков/таблиц/графиков и до 10 ссылок.

6. Особенности оформления таблиц, рисунков

Таблицы должны быть созданы в формате таблицы Microsoft Word. Таблицы должны быть пронумерованы и в тексте должны быть ссылки на каждую таблицу. Заголовок таблицы расположен по центру над таблицей, пояснительные сноски (обозначенные строчными надстрочными буквами) расположены под таблицей. Таблицы не должны дублировать информацию, представленную в тексте.

Все рисунки (фотографии, диаграммы, графики и схемы) должны быть пронумерованы арабскими цифрами (1, 2, …). Надписи и символы должны быть четко определены либо в подписи, либо в легенде, являющейся частью рисунка.

КАК ПОДАТЬ СТАТЬЮ НА РАССМОТРЕНИЕ

Рукопись статьи направляется в редакцию через форму на сайте журнала journal.biosafety.kz

Загружаемый в систему файл со статьей должен быть представлен в формате Microsoft Word (иметь расширение *.doc или *.docx). Сопроводительное письмо с оригинальными подписями должно быть представлено в формате PDF. Сопроводительное письмо должно быть кратким с указанием соответствия рукописи тематике журнала. Сопроводительное письмо

должно содержать утверждения, что ни рукопись, ни какие-либо части ее содержания в настоящее время не находятся на рассмотрении или опубликованы в другом журнале. Все авторы должны одобрить рукопись и согласиться с ее подачей в журнал.

Перед отправкой рукописи убедитесь, что:

- Рукопись проверена на орфографию и грамматику
- Все ссылки, упомянутые в списке литературы, цитируются в тексте, и наоборот
- Получено разрешение на использование материалов, защищенных авторским правом, из других источников (включая Интернет)
- Правила журнала, подробно описанные в этом руководстве, были изучены
- Убедитесь, что все ссылки на рисунки и таблицы в тексте соответствуют предоставленным файлам

7. К сведению авторов

К статье прилагаются:

- сопроводительное письмо (для сторонних организаций).
- сведения об авторах: фамилия, имя и отчество (полностью), ученая степень, должность, место работы, контактные телефоны, ORCID, адрес для переписки (e-mail).

Решение о публикации принимается редакционной коллегией журнала после рецензирования, учитывая научную значимость и актуальность представленных материалов.

Вид рецензирования – двойное «слепое» рецензирование, то есть и автор, и рецензент остаются анонимными. Рукопись направляется на отзыв члену редколлегии и рецензенту; в спорных случаях по усмотрению редколлегии привлекаются дополнительные рецензенты; на основании экспертных заключений редколлегия определяет дальнейшую судьбу рукописи: принятие к публикации в представленном виде, необходимость доработки или отклонение. В случае необходимости рукопись направляется авторам на доработку по замечаниям рецензентов и редакторов, после чего она повторно рецензируется, и редколлегия вновь решает вопрос о приемлемости рукописи для публикации. Переработанная рукопись должна быть возвращена в редакцию в течение месяца после получения авторами отзывов; в противном случае рукопись рассматривается как вновь поступившая. Рукопись, получившая недостаточно высокие оценки при рецензировании, отклоняется как не соответствующая уровню или профилю публикаций журнала.

Авторы несут ответственность за достоверность и значимость научных результатов, а также актуальность научного содержания работ.

Направление статьи в редакцию означает, что авторы не передали аналогичный материал (в оригинале или в переводе на другие языки или с других языков) в другой журнал(ы), что этот материал не был ранее опубликован и не будет направлен в печать в другое издание или не принят в печать в другом журнале. Если в ходе работы над рукописью выяснится, что аналогичный материал (возможно, под другим названием и с другим порядком авторов) направлен в другой журнал, статья немедленно возвращается авторам, о происшедшем сообщается в журнал, принявший к рассмотрению этот материал, с рекомендацией отклонить статью за нарушение авторских прав редакции и издательства.

Наш адрес:

080409, Жамбылская область, Кордайский район, пгт. Гвардейский, ул. Момышулы 15
ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Учебный научно-образовательный центр (УНОЦ), тел. (726-36) 7-22-28.

E-mail: unots@biosafety.kz
Публикация в журнале для авторов **бесплатна**.
МРНТИ ***(https://grnti.ru/)*** ***DOI……***

НАЗВАНИЕ

Имя Фамилия[1], Имя Фамилия[2], Имя Фамилия[2],*

[1] Место работы
[2] Место работы
***e-mail** (если авторов-корреспондентов несколько, добавьте инициалы авторов)

Аннотация. Один абзац не более 300 слов, при этом не менее 150 слов. В аннотации должны быть кратко изложены цель исследования, основные результаты и основные выводы. Аннотация часто представляется отдельно от статьи. В связи с этим следует избегать ссылок, нестандартных или необычных сокращений, но, если они необходимы, они должны быть определены при их первом упоминании в самом реферате. Аннотация должна быть объективным изложением статьи, не должна содержать результатов, не представленных и не обоснованных в основном тексте, и не должна преувеличивать основные выводы.

Ключевые слова: ключевое слово 1; ключевое слово 2; ключевое слово 3 (5-10 слов или словосочетаний, должны отражать основное содержание статьи; определить предметную область исследования. Каждое ключевое слово отделяется точкой с запятой)

Как использовать данный шаблон

В шаблоне подробно описаны разделы, которые должны быть использованы рукописи. Обратите внимание, что у каждого раздела есть соответствующий стиль, который можно найти в меню «Стили» Word. Разделы, которые не являются обязательными, перечислены кактаковые. Названия разделов даны для оригинальных статей. Обзорные статьи и другие типы статей имеют более гибкую структуру.

Удалите этот абзац и начните с раздела «Введение». По всем вопросам обращайтесь в редакцию журнала по адресу unots@biosafety.kz.

Введение

Во введении следует изложить текущее состояние области исследований и процитировать основные публикации, обосновать актуальность и значимость проводимых исследований. Необходимо кратко указать цель работы. Насколько это возможно, сделайте введение понятным для ученых, не занимающихся вашей конкретной областью исследований. Ссылки должны быть пронумерованы в порядке их появления и обозначены цифрой или цифрами в квадратных скобках, например, [1] или [2,3], или [4–6].

Материалы и методы

Данный раздел должен быть описан достаточно подробно, чтобы другие могли воспроизвести и использовать опубликованные результаты. Новые методы и протоколы должны быть описаны подробно, в то время как хорошо зарекомендовавшие себя методы могут быть кратко описаны и надлежащим образом процитированы, например, [1] или [2,3], или [4–6].

Исследования с участием животных или людей, а также другие исследования, требующие этического одобрения, должны указывать орган, предоставивший одобрение, и соответствующий кодекс этического одобрения.

При необходимости этот раздел может быть разделен на подразделы.

Подраздел

Результаты

Данный раздел должен содержать краткое и точное описание экспериментальных результатов, их интерпретацию, а также экспериментальные выводы, которые можно сделать. При необходимости этот раздел может быть разделен на подразделы.

Подраздел

Таблицы и рисунки

Таблицы и рисунки должны быть пронумерованы и в тексте на них должны быть ссылки. Например, Таблица 1, Рисунок 1 и т.п.

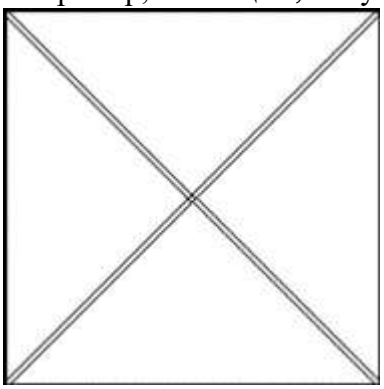
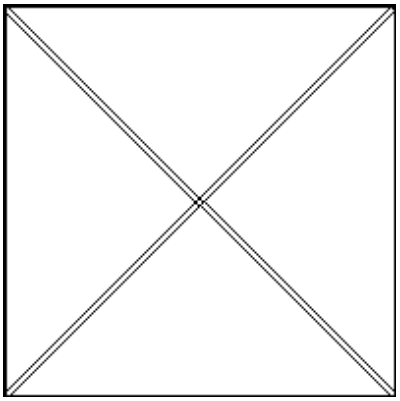


Рисунок 1 – Это рисунок. Схемы имеют такое же форматирование

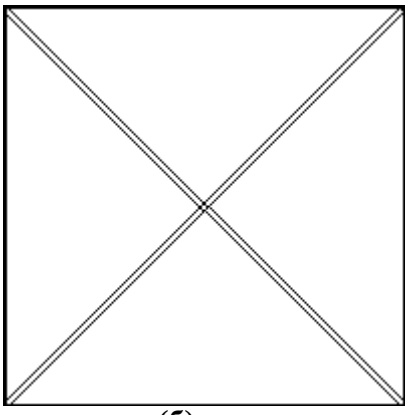
Таблица 1 – Это таблица. Таблицы следует размещать в основном тексте рядом с местом первого упоминания

Заголовок 1	Заголовок 2	Заголовок 3
вводные 1	данные	данные
вводные 2	данные	данные [1]
[1] *Примечания к данным таблицы разместить под таблицей.*		

Продолжить текст раздела (Рисунок 2).



(**а**)



(**б**)

Если имеется несколько панелей, они должны быть перечислены следующим образом: (**а**) описание того, что содержится в первой панели; (**б**) Описание того, что содержится во второй панели

Рисунок 2 – Это рисунок. Рисунки следует размещать в основном тексте рядом с местом первого упоминания

Обсуждение

Авторы должны обсудить полученные результаты и то, как их можно интерпретировать с точки зрения предыдущих исследований и рабочих гипотез. В обсуждении можно привести возможные объяснения сходства и противоречий с другими аналогичными исследованиями. В максимально широком контексте следует обсудить выводы и их значение. Также в данном разделе могут быть выделены будущие направления исследований.

Заключение

Данный раздел включает обобщение и подведение итогов работы на текущем этапе. Выводы должны быть точными и использоваться для обобщения результатов исследований в конкретных научных областях с описанием предложений или возможностей дальнейшей

работы.

Финансирование: Укажите источник финансирования исследований (название финансирующей организации, номер гранта). Внимательно проверьте правильность приведенных данных и используйте стандартное написание названий финансирующих организаций.

Благодарности: В этом разделе вы можете отметить любую оказанную поддержку. Это может включать административную и техническую поддержку или предоставление материалов для экспериментов.

Конфликт интересов: Все авторы должны раскрывать информацию о любых финансовых и личных отношениях с другими людьми или организациями, которые могут ненадлежащим образом повлиять (предвзято) на их работу. Примеры потенциальных конфликтов интересов включают занятость, консультации, владение акциями, гонорары, платные экспертные заключения, патентные заявки/регистрации, а также гранты или другое финансирование. Если нет никаких конфликтов к опубликованию материалов в статье, указать, что авторы не имеют конфликта интересов.

Литература

В данном разделе следует привести список цитированной литературы оформленный согласно ГОСТ 7.1-2003 «Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления» (требование к изданиям, входящих в перечень КОКСОН). Список литературы должен быть пронумерован в порядке упоминания в тексте (включая цитаты в таблицах и легендах). Включите цифровой идентификатор объекта (DOI) для всех ссылок, где они доступны. В тексте ссылки должны быть заключены в квадратные скобки [..] и поставлены перед знаками препинания; например [1], [1–3] или [1,3].

1. Aspden K., Passmore J.A., Tiedt F., Williamson A.L. Evaluation of lumpy skin disease virus, a capripoxvirus, as a replication-deficient vaccine vector // J. Gen. Virol. – 2003. – Vol. 84 (Pt8). – P. 1985-1996. doi: ... (при наличии)
2. Туненков В.В., Черняк В.П., Кузнецов Г.Д. Сухая живая вакцина против оспы овец из штамма С113/86 // Ветеринария. – 1993. – № 11/12. – С. 23-24.
3. Зайцев В.Л. Морфогенез вируса оспы овец в культуре клеток /В.Л.Зайцев, Н.Т.Сандыбаев, К.Т.Султанкулова, В.Ю.Белоусов, О.В.Червякова, В.М.Строчков // Вирус оспы овец: молекулярно-биологические свойства и структура генома. – Алматы, 2011. – С.73
-84. ISBN 978-601-278-599-9
4. Султанкулова К.Т. Токсико-биологическая оценка гриба Histoplasma farciminosum – возбудителя эпизоотического лимфангоита лошадей // Ветеринарные и зоотехнические вопросы коневодства: первая науч.-практ. конф. - Алматы, 2003. – С. 26-29
5. Сансызбай А.Р. Эпизоотическая ситуация лимфангита лошадей, вызванного Histoplasma farciminosum, в коневодческих хозяйствах Республики Казахстан //Современное состояние и актуальные проблемы развития ветеринарной науки и практики: науч.-практ. конф. – Алматы, 2005. – С. 234-237.
6. Вспышка оспы овец на территории Российской Федерации в Ярославской области [Электрон.ресурс]. - URL: http://www.fsvps.ru/fsvps/news/18142.html (дата обращения 3 сентября 2016 г).

References

Далее приводится транслитерированный список использованных источников в разделе REFERENCES. При этом англоязычные источники дублируются из раздела ЛИТЕРАТУРА, казахскоязычные и русскоязычные ссылки должны быть приведены к латинскому алфавиту (латинице) и английскому переводу. Ссылка должна дополнительно содержать DOI (идентификатор цифрового объекта), если таковой имеется. Транслитерация осуществляется с использованием онлайн-платформы http://translit-online.ru/. Эта онлайн-платформа не транслитерирует отдельные буквы казахского алфавита. Авторы должны самостоятельно вносить исправления после транслитерации казахского текста.

Транслитерированный список литературы должен выглядеть в следующем виде для

источников на кириллице: автор(-ы) (транслитерация) → (год в круглых скобках)→название статьи в транслитерированном варианте [перевод названия статьи на английский язык в квадратных скобках], название русскоязычного источника (транслитерация, либо английское название – если есть), выходные данные с обозначениями на английском языке.

Например:

11. Gokhberg L., Kuznetsova T. (2011) Strategiya-2020: novye kontury rossiiskoi innovatsionnoi politiki [Strategy 2020: New Outlines of Innovation Policy]. Foresight-Russia, vol. 5,no 4, pp. 8–30.

Данные об авторах

Фамилия, имя и отчество (полностью), ученая степень, должность, место работы, ORCID, адрес для переписки (e-mail)

*для каждого автора.

МАҚАЛА ТАҚЫРЫБЫ

Аты Тегі[1], Аты Тегі[2], Аты Тегі[2],*

[1] Жұмыс орны

[2] Жұмыс орны

*e-mail (егер бірнеше автор-корреспондент болса, авторлардың инициалдарын қосыңыз)

Аннотация. Бір абзац 300 сөзден аспайды, 150 сөзден кем емес. Аннотацияда зерттеу мақсаты, негізгі нәтижелер мен негізгі қорытындылар қысқаша көрсетілуі керек. Аннотация көбінесе мақаладан бөлек беріледі. Осыған байланысты сілтемелерден, стандартты емес немесе әдеттен тыс аббревиатуралардан аулақ болу керек, бірақ қажет болған жағдайда олар рефераттың өзінде бірінші рет айтылған кезде анықталуы керек. Аннотация мақаланың объективті баяндалуы болуы керек, негізгі мәтінде көрсетілмеген немесе дәлелденбеген нәтижелерді қамтымауы керек және негізгі қорытындыларды асыра көрсетпеуі керек.

Түйін сөздер: түйінсөз 1; түйінсөз 2; түйінсөз 3 (5-10 сөз немесе сөз тіркестері мақаланың негізгі мазмұнын көрсетуі керек; зерттеудің пәндік саласын анықтау. Әрбір түйінді сөз нүктелі үтірмен бөлінеді)

TITLE

Firstname Lastname[1], Firstname Lastname[2], Firstname Lastname[2],*

[1] Affiliation

[2] Affiliation

* e-mail (if there are more than one correspondent authors, add the initials of the authors)

Abstract. One paragraph no more than 300 words, with no less than 150 words. The abstract should briefly describe the purpose of the study, the main results and main conclusions. The abstract is often presented separately from the article. In this regard, references, non-standard or unusual abbreviations should be avoided, but, if necessary, they should be identified at their first mention in the abstract itself. The abstract should be an objective presentation of the article, should not contain results that are not presented or substantiated in the main text, and should not exaggerate the main conclusions.

Keywords: keyword 1; keyword 2; keyword 3 (5-10 words or phrases should reflect the main content of the article; define the subject area of the study. Each keyword is separated by a semicolon)