**Приложение 3.**

***Форма заявки для открытия или продления Проекта***

**УТВЕРЖДАЮ**

 **Директор Института**

 **\_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_/**

**“ “ \_\_\_\_\_\_\_ 2024 г.**

**НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ**

**ОТКРЫТИЯ ИЛИ ПРОДЛЕНИЯ ПРОЕКТА**

**В ПРОБЛЕМНО-ТЕМАТИЧЕСКОМ ПЛАНЕ ОИЯИ НИР и МС ОИЯИ**

**1. Общие сведения о проекте**

**1.1. Шифр темы**

07-5-1131-2017

**1.2. Шифр проекта**

07-5-1131-3-2025/2029

**1.3. Лаборатория**

Лаборатория ядерных реакций им. Г.Н. Флерова

**1.4. Направление исследований согласно структуре ПТП**

07 –– Прикладная инновационная деятельность

**1.5. Наименование проекта**

«Высокоселективные сенсоры, работающие на принципах молекулярного узнавания для детектирования вирусов»

**1.5. Руководители проекта**

А.Н. Нечаев, Е.Г. Завьялова

**1.6. Научный руководитель проекта**

––

**1.7. Заместитель руководителя проекта**

––

**2. Научное обоснование и организационная структура**

**2.1. Аннотация**

Существующие экспресс тест-системы для диагностики инфекционных заболеваний основаны преимущественно на реакциях антиген-антитело. Разработка быстрых, чувствительных и селективных методов выявления патогенных микроорганизмов остается актуальной задачей здравоохранения и залогом национальной безопасности. Цель проекта – разработать принципиально новую технологию диагностики, отличающуюся быстротой проведения анализа, высокой чувствительностью и специфичностью, возможностью адаптации системы для обнаружения разных типов вируссодержащих аналитов. Обнаружение вирусов будет проводиться с применением специализированной медицинской аппаратуры нового поколения – рамановских люминесцентных диагностических комплексов. В основе метода лежит использование нанокомпозитных трековых мембран, обеспечивающих гигантское комбинационное рассеяние света (ГКРС). Трековые мембраны с эффектом ГКРС обеспечат избирательность задержания вирусов в исследуемых пробах и высокую чувствительность их обнаружения. Использование биоаффинных взаимодействий с применением функциональных аналогов антител- аптамеров, меченных репортерами ГКРС, будет дополнительным фактором специфичности выявления маркеров. В результате выполнения проекта будет разработана и экспериментально обоснована новая биосенсорная технология диагностики инфекционных заболеваний животных, в частности вируса африканской чумы свиней (АЧС). Экспериментальное обоснование гипотез и выбор оптимальных технических решений планируется провести на основе секвенирования ДНК вируса АЧС и разработки синтетического иммуноферментного реагента – аптамера, способного иммобилизоваться на поверхности серебряных и золотых наночастиц. На заключительных этапах работы будет создана экспериментальная тест-система для быстрого выявления антигенов одного из вируса АЧС в клиническом материале. Результаты проекта могут быть использованы для совершенствования технологии трековых мембран и будут способствовать расширению и оптимизации технологий получения иммунобиологических и генно-инженерных препаратов. Выполнение проекта должно обеспечить достижение результатов мирового уровня благодаря синергетическому взаимодействию специалистов в области прикладной ядерной физики, радиационной обработки материалов, коллоидной химии, современных биомедицинских технологий и микроэлектроники.

**2.2. Научное обоснование**

Стабильная работа ветеринарных служб – основа продовольственной безопасности страны. Каждая вспышка болезней сельскохозяйственных животных приводит к серьезному экономическому ущербу и ставит под угрозу не только развитие животноводства, но и население: более 80% инфекционных заболеваний являются общими для человека и животных. Ежегодно в мире, в том числе в России, регистрируются вспышки таких опасных заболеваний, как африканская чума свиней, птичий грипп, сибирская язва, ящур, бешенство, оспа овец и коз. Одним из основных направлений деятельности ветеринарных служб является профилактика болезней животных. В целях защиты населения от болезней, общих для человека и животных, а также профилактики и лечения заболеваний самих сельскохозяйственных животных, ветеринарной службой постоянно проводятся научно-исследовательские и профилактические работы. В то же время, по мнению экспертов, обеспечению биологической безопасности, профилактике и борьбе с вспышками инфекционных заболеваний животных, в том числе опасных для человека, препятствует ряд обстоятельств. Во-первых, это эффективность национальных ветеринарных служб, основанная на оперативном мониторинге эпизоотической ситуации. В настоящее время африканская чума свиней у домашних свиней регистрируется во многих странах мира, в том числе в Российской Федерации. Мониторинг вирусов африканской чумы свиней (АЧС) проводится постоянно с целью предотвращения ее распространения в другие зоны, а сельскохозяйственные комплексы всех стран несут огромные потери. Возбудителем вируса АЧС является уникальный арбовирус, содержащий оболочечную цитоплазматическую ДНК, который является единственным представителем семейства Asfarviridae. Хотя ранее считалось, что существует только один серотип вируса АЧС, недавние исследования классифицировали 32 изолята вируса АЧС на восемь различных серогрупп на основе реакции гемадсорбции. Однако генетическая характеристика всех известных на сегодняшний день изолятов вируса АЧС выявила 23 генотипа, связанных с географическим местоположением и многочисленными подгруппами, что иллюстрирует сложность эпизоотологии вируса АЧС. Генотип отражает изменчивость сегмента одного гена и белка (VP-72) и используется преимущественно для молекулярно-филогенетических целей (например, для определения источника вспышки). Насколько известно, он не определяет вирулентность или другие параметры заболевания. По мнению экспертов ВОЗ, вирус АЧС не опасен для человека, однако все меры по предотвращению его распространения проводятся в полном объеме, чтобы защитить животных от гибели. От такого заболевания не изобретена вакцина, и каждый год вирус наносит огромный ущерб экономике, что само по себе тоже немаловажно. Заболевание появилось в начале прошлого века, и с тех пор не найдено эффективных способов борьбы с ним, а его потенциальная угроза для человека вполне реальна.

Хотя вирус не вызывает клинических симптомов заражения у человека, проникая в организм, было бы также неверно говорить, что он вообще на него не влияет. Случаев заболевания вирусом АЧС у человека пока не зарегистрировано, но это не означает, что из-за мутаций он не приобретет патогенные свойства, а иммунная система никак на него не отреагирует. Течение заболевания до конца не изучено, как и все возможные его формы. Это связано с тем, что больных животных активно истребляют, не давая инфекции развернуться в полную силу. Однако наличие вируса в организме людей, контактировавших с больными животными, может ослабить иммунную систему. Кроме того, у людей, активно занимающихся сельским хозяйством и контактирующих с больными свиньями, были случаи выявления антител к возбудителям АЧС, а это означает, что иммунная система человека реагирует на вирус. Вероятно, что заражение протекает бессимптомно, и не факт, что так будет всегда. Учитывая склонность генома вируса к активным мутациям, есть вероятность, что со временем он может приобрести патогенные свойства, и тогда среди людей возможна эпидемия чумы свиней, и наша иммунная система не сможет надежно защитить организм от вирусной агрессии. Поэтому при выявлении вспышек вируса АЧС в каком-либо регионе принимаются все необходимые меры для предотвращения его распространения. Проблема мониторинга вируса АЧС до сих пор не решена и требует эффективных методов обнаружения вируса и борьбы с ним с учетом современных тенденций, включая новые сенсоры и мембранные технологии.

**Использование трековых мембран для быстрого мониторинга и анализа вирусов**

 В настоящее время трековые мембраны активно используются для мониторинга микробиологического загрязнения окружающей среды. Создание быстрых, чувствительных и селективных методов обнаружения возбудителей является одной из важнейших задач общественного здравоохранения и гарантией национальной безопасности. Растет потребность в быстрой и экономически эффективной лабораторной диагностике инфекционных заболеваний и выявлении микробиологического загрязнения окружающей среды с использованием так называемого «безметочного» тестирования и биосенсоров на основе флуоресценции, комбинационного рассеяния света и масс-спектрометрии [1]. Разработка быстрых, чувствительных и селективных методов выявления возбудителей, особенно в случаях, требующих неотложной медицинской помощи, остается задачей общественного здравоохранения.

 Поверхностно-усиленное комбинационное рассеяние света (ГКРС) — это высокочувствительный метод, который позволяет обнаруживать молекулы в очень низких концентрациях. Использование рамановских меток или флуорофоров значительно повышает специфичность биосенсора и пределы обнаружения. Значительное количество публикаций о разработке биосенсоров ГКРС посвящено использованию антител и аптамеров, распознающих эпитоп поверхности биомолекулы. Сочетание ГКРС с ультра- и микрофильтрационными мембранами, способными задерживать вирусы и бактерии, позволяет достичь высокой чувствительности и селективности. Дополнительным фактором специфичности обнаружения маркеров должно стать использование биоаффинных взаимодействий ТМ с иммобилизованными антителами или аптамерами, мечеными репортерами ГКРС [2]. Следовательно, необходима разработка методов получения мембранных субстратов, удовлетворяющих методу анализа ГКРС (ГКРС-субстратов) с желаемыми свойствами, необходимыми для успешных биоаффинных взаимодействий и свойствами плазмонного резонанса. Таким образом, необходима разработка новой функциональной ТМ, сочетающей в себе наночастицы серебра, золота или их сплавов и модулированные диэлектрические структуры на основе полиэфирной нано- и микропористой основы, в которой могут быть реализованы как плазмонный, так и диэлектрический резонансы, а также достигнуто существенное усиление электромагнитного поля.

 В ряде работ Центра прикладной физики уже предложен биосенсор на основе ТМ из полиэтилентерефталата, покрытых конъюгированными с аптамером наночастицами серебра, для обнаружения вирусов гриппа А и В. При фильтрации через многофункциональные ТМ с конъюгатами аптамеров и наночастиц серебра на поверхности достигнут высокий предел обнаружения вируса гриппа А в плазме крови [3]. Аналогов такого рода мембран, выпускаемых промышленным способом, в мире нет. В дальнейшем экспериментальное обоснование гипотез и выбор оптимальных технических решений будет осуществляться на модели обнаружения диагностически значимых антигенов аденовирусов или ротавирусов. Важной целью проекта является разработка научных подходов и внедрение проточной сенсорной технологии на основе многофункциональных ТМ, которые позволяют существенно повысить селективность аналитической идентификации, особенно эпидемиологически опасных веществ, таких как вирус африканской чумы свиней (АЧС), снизить стоимость его анализа за счет исключения многочисленных реагентов, сред и специализированного оборудования, что позволит проводить анализ в полевых условиях.

**Применение трековых мембран, покрытых аптамерами, в качестве противовирусных средств против вируса АЧС**

 В некоторых публикациях продемонстрирован потенциал аптамеров в качестве противовирусных агентов против различных вирусов, включая ВИЧ, грипп, вирус Зика и другие. Аптамеры могут быть разработаны для предотвращения проникновения вируса в клетки-хозяева, нарушения процессов репликации вируса или модуляции иммунных ответов хозяина для усиления противовирусной активности [4,5].

 В контексте противовирусных агентов аптамеры оказались перспективными в качестве потенциальных терапевтических средств по многим причинам, в том числе:

1. Целевая специфичность: аптамеры могут быть созданы для специфического воздействия на вирусные белки или другие молекулы, необходимые для репликации или инфекции вируса, сводя к минимуму нецелевые эффекты.
2. Высокое сродство: аптамеры могут быть выбраны или сконструированы так, чтобы иметь высокое сродство к молекулам-мишеням, что позволяет им эффективно препятствовать репликации вируса или его инфекционности.
3. Простота производства: аптамеры можно производить путем химического синтеза, который относительно прост и экономически эффективен по сравнению с традиционными методами производства антител [4,5].

 Хотя аптамеры имеют большие перспективы в качестве противовирусных средств, необходимы дальнейшие исследования и разработки для оптимизации их эффективности, фармакокинетики и профилей безопасности для клинического использования. Тем не менее, они представляют собой многообещающий класс терапевтических средств в борьбе с вирусными инфекциями.

 Помимо использования аптамеров в качестве прямых противовирусных агентов, их можно использовать для нанесения на поверхность искусственных мембран различного назначения. Используя мембраны, покрытые аптамером, можно избирательно захватывать и удалять целевые вирусы из сложных образцов с высокой специфичностью и эффективностью. Этот подход может применяться в различных условиях, включая очистку воды для удаления передающихся через воду вирусов, очистку вирусных векторов, используемых в генной терапии, или выделение конкретных вирусов из клинических образцов для диагностических целей [6,7].

 В этом проекте мы предлагаем изучить два типа использования мембран, покрытых аптамером: (i) их использование как противовирусные фильтры, избирательно захватывающие и удаляющие целевые вирусы из сложных образцов, позволяя при этом проходить другим компонентам. Этот подход имеет такие преимущества, как высокая специфичность, масштабируемость и экономическая эффективность, что делает его пригодным для различных применений, включая очистку воды, биопереработку и биомедицинские исследования; (ii) фильтрация через мембраны, покрытые аптамером, может стать быстрым, чувствительным и специфичным методом диагностики вирусов, позволяющим эффективно улавливать и концентрировать целевые вирусы из клинических образцов. Этот подход может быть особенно полезен в условиях ограниченных ресурсов или во время вспышек, когда своевременная и точная диагностика имеет решающее значение для выявления болезней и борьбы с ними. Противовирусные и диагностические свойства аптамеров будут изучены в отношении вируса АЧС.

 Известно, что вирусная инфекция может вызывать множество биологических эффектов, включая воспаление, генотоксические и мутагенные эффекты в клетках-хозяевах, что приводит к генетической нестабильности и повреждению тканей. Поэтому снижение повреждающего ДНК действия вирусов имеет практическое значение. Мы ожидаем, что применение трековых мембран с иммобилизованными аптамерами позволит существенно снизить генотоксическое и мутагенное воздействие ДНК- и РНК-вирусов на клетки. В проекте будут применяться методы ДНК-комет и количественный анализ внеклеточной ДНК для оценки генотоксичности, а микроядерный анализ с блокировкой цитокинеза – для оценки мутагенности вирусов.

 Повреждение ДНК также может способствовать патогенезу вирусов посредством запуска апоптоза и появления вредных мутаций, которые также могут увеличить риск онкогенеза. Поэтому генотоксические эффекты ДНК- и РНК-вирусов будут оцениваться в клетках-хозяевах до и после применения ТМ. Таким образом, анализ внеклеточной ДНК будет использоваться в качестве дополнительного биомаркера для оценки способности ТМ снижать генотоксические и мутагенные эффекты ДНК- и РНК-вирусов.

**Отбор и характеризация аптамеров**

 Белки CD2 и P54 были выбраны в качестве основных мишеней для селекции. Белки располагаются на внешней поверхности вируса, способствуя распознаванию всего вируса. Процедура отбора будет проводиться с использованием библиотеки ДНК с рандомизированной областью из 40 нуклеотидов. Рекомбинантные белки будут иммобилизованы на колонке, а аптамеры с самым высоким временем удерживания будут собраны для дальнейшей оценки. Кандидаты на аптамеры будут секвенированы с использованием подходов секвенирования следующего поколения Illumina или секвенирования Nanopore. Сродство химически синтезированных аптамеров будет оцениваться с помощью биослойной интерферометрии (Блиц) с иммобилизацией рекомбинантного белка на аминореактивном сенсоре. Три аптамера с самым высоким сродством будут использоваться для функциональных анализов, включая противовирусную и вирулицидную активность. Кроме того, будут химически синтезированы аптамеры с функциональными группами для функционализации трековых мембран, включая тиоловые группы и аминогруппы.

**Анализ уровней повреждения ДНК в культурах клеток до и после контакта с вирусами и аптамерами с помощью комет-анализа**

 Кровь является целевым образцом для обнаружения вируса методом ПЦР и выделения вируса. Плазму, отделенную при центрифугировании, можно использовать для обнаружения антител с помощью непрямого иммунопероксидазного теста (ИПТ) или непрямого метода флуоресцентных антител (нМФА). Поскольку вакцины не существует, быстрое и раннее выявление заболевания имеет важное значение для принятия строгих санитарных мер и мер биобезопасности для предотвращения распространения заболевания. Диагностика АЧС означает выявление животных, которые инфицированы или ранее были инфицированы АЧС. Для получения актуальной информации для реализации программ контроля и ликвидации необходимо провести диагностику, которая включает в себя выявление и идентификацию специфичных для вируса АЧС антигенов или ДНК и антител. Краткий обзор лабораторных методов диагностики вируса АЧС представлен ниже (таблица 1).

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Анализ на обнаружение вирусов** | **Время** | **Чувствительность** | **Специфика** | **Тип образца** | **Расходы** | **Комментарии** |
| Полимеразная цепная реакция (ПЦР)\* | 5-6часы | ХХХ | ХХ | Ткани, кровь, клещи или клеточные культуры | $$ | Самый распространенный чувствительный к загрязнению метод обнаруживает как живые, так и мертвые вирусы. |
| Реакция гемадсорбции (РГад) | 7-21дни | ХХ | ХХХ | Макрофаги свиней | $$$$ | ЗОЛОТОЙ СТАНДАРТИспользуется только в некоторых справочных лабораториях. |
| Метод прямых флуоресцентных антител (MFA) | 75 мин. | ХХХ(для раннего обнаружения) | ХХХ | КриосрезМазокКультура клеток | $$$ | Рекомендуется, если нет ПЦР или опыта его проведения. Требуется флуоресцентный микроскоп.Недостаточная чувствительность через неделю после заражения |
| ИФА | 3 часа | Х(для раннего обнаружения) | ХХ | Тканевая сыворотка | $ | В основном не используется. Недостаточная чувствительность через неделю после заражения |
| **Анализ на выявление антител** | **Время** | **Чувствительность** | **Специфика** | **Тип образца** | **Расходы** | **Комментарии** |
| ИФА\* | 3 часа | Х | Х | сыворотка | $ | Скрининговый тест.Доступны лабораторные и коммерческие наборы. |
| Иммуноблоттинг | 3 часа | Х | Х | сыворотка | $$$$ | Подтверждающий тест.Коммерческих комплектов нет. |
| Метод непрямых флуоресцентных антител (nMFA) | 4 часа | ХХХ | ХХ | экссудат тканей, сыворотка или плазма крови | $$$ | Подтверждающий тест.Коммерчески доступных реагентов нет.Требуется флуоресцентный микроскоп. |
| (\*) наиболее часто используемый метод |

Таблица 1.Краткий обзор лабораторных методов диагностики вируса АЧС.

 Щелочная версия метода ДНК-комет будет применяться для оценки уровней повреждений ДНК в клеточных культурах, инфицированных вирусом АЧС. Simões и коллеги [8] выявили активацию сигнальных путей ответа на повреждение ДНК в клетках, инфицированных вирусом АЧС, тогда как ингибирование ATR приводило к подавлению синтеза вирусного белка p72 in vitro. Таким образом, ингибирование маркеров генетического повреждения в инфицированных клетках может стать многообещающим подходом против вируса АЧС.

 Ранее нами был применен метод ДНК-комет для анализа уровней повреждений ДНК в клетках, инфицированных вирусом АЧС [9]. Мы также проанализировали значение маркеров генетических повреждений в клетках хозяина для патогенеза других вирусных инфекций, в том числе COVID-19 [10].

 В представленном проекте будут использованы следующие экспериментальные группы клеток: клетки, выращенные в стандартных условиях, клетки, выращенные в среде, фильтрованной через ТМ с аптамерами, клетки, подвергшиеся воздействию вируса АЧС, и клетки, выращенные в среде, которая ранее подвергалась воздействию вируса АЧС и фильтровалась через ТМ с аптамерами. После трипсинизации клетки будут обработаны для анализа уровней повреждений ДНК методом ДНК-комет. Изображения комет будут исследованы с помощью флуоресцентного микроскопа (ZEISS, Германия). Повреждение ДНК будет оцениваться с использованием программного обеспечения Comet Assay IV (Perceptive Instruments, Великобритания). В целом 150 клеток будут проанализированы в трех повторностях для каждого образца. Процент хвоста ДНК кометы будет использоваться для количественной оценки повреждения ДНК.

**Список литературы**

1. Ma, T., Janot, J., & Balme, S. (2020). Track Etched Nanopore/Membrane: From Fundamental to Applications. Small Methods 4, 2000366. doi:10.1002/smtd.202000366
2. Kaya, D., & Keçeci, K. (2020). Review—Track-Etched Nanoporous Polymer Membranes as Sensors: A Review. Journal of Electrochemical Society, 167(3), 037543. doi:10.1149/1945-7111/ab67a7
3. Kukushkin V., Kristavchuk O., Andreev E. at al. (2023). Aptamer-coated track-etched membranes with a nanostructured silver layer for single virus detection in biological fluids Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, doi 10.3389/fbioe.2022.1076749
4. Kim TH, Lee SW. Aptamers for Anti-Viral Therapeutics and Diagnostics. Int J Mol Sci. 2021 Apr 17;22(8):4168. doi: 10.3390/ijms22084168
5. Zou X, Wu J, Gu J, Shen L and Mao L (2019) Application of Aptamers in Virus Detection and Antiviral Therapy. Front. Microbiol. 10:1462. doi: 10.3389/fmicb.2019.01462
6. Zhdanov G, Nyhrikova E, Meshcheryakova N, Kristavchuk O, Akhmetova A, Andreev E, Rudakova E, Gambaryan A, Yaminsky I, Aralov A, Kukushkin V and Zavyalova E (2022) A Combination of Membrane Filtration and Raman-Active DNA Ligand Greatly Enhances Sensitivity of ГКРС-Based Aptasensors for Influenza A Virus. Front. Chem. 10:937180. doi: 10.3389/fchem.2022.937180
7. Romero-Reyes MA, Heemstra JM. Sequestration and Removal of Multiple Small-Molecule Contaminants Using an Optimized Aptamer-Based Ultrafiltration System. Bioconjug Chem. 2021 Sep 15;32(9):2043-2051. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.1c00344
8. Simões M, Martins C, Ferreira F. Host DNA damage response facilitates African swine fever virus infection. Vet Microbiol. 2013;165(1-2):140-147. doi:10.1016/j.vetmic.2013.01.007
9. Arabyan E, Hakobyan A, Kotsinyan A, et al. Genistein inhibits African swine fever virus replication in vitro by disrupting viral DNA synthesis. Antiviral Res. 2018;156:128-137. doi:10.1016/j.antiviral.2018.06.014
10. Hovhannisyan G, Harutyunyan T, Aroutiounian R, Liehr T. The Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Potential of Cell-Free DNA with a Special Focus on COVID-19 and Other Viral Infections. Int J Mol Sci. 2023;24(18):14163. doi: 10.3390/ijms241814163
11. Harutyunyan T, Sargsyan A, Stepanyan N, Hovhannisyan G, Aroutiounian R. Evaluation of genotoxic effects in COVID-19 patients as a potential marker of virus-host adaptation. JINR Proceedings. 2023; 2, 8-10.
12. Jackman JA, Hakobyan A, Grigoryan R, Izmailyan R, Elrod CC, Zakaryan H. Antiviral screening of natural, anti-inflammatory compound library against African swine fever virus. Virol J. 2024 Apr 25;21(1):95.
13. Jackman JA, Arabyan E, Zakaryan H, Elrod CC. Glycerol Monolaurate Inhibits Wild-Type African Swine Fever Virus Infection in Porcine Macrophages. Pathogens. 2023 Sep 25;12(10):1193.
14. Grigoryan R, Arabyan E, Izmailyan R, Karalyan Z, Jordão N, Ferreira F, Zakaryan H. Antiviral activity of brequinar against African swine fever virus infection in vitro. Virus Res. 2022 Aug;317:198826.
15. Arabyan E, Hakobyan A, Hakobyan T, Grigoryan R, Izmailyan R, Avetisyan A, Karalyan Z, Jackman JA, Ferreira F, Elrod CC, Zakaryan H. Flavonoid Library Screening Reveals Kaempferol as a Potential Antiviral Agent Against African Swine Fever Virus. Front Microbiol. 2021 Oct 21;12:736780.
16. Sirakanyan S, Arabyan E, Hakobyan A, Hakobyan T, Chilingaryan G, Sahakyan H, Sargsyan A, Arakelov G, Nazaryan K, Izmailyan R, Abroyan L, Karalyan Z, Arakelova E, Hakobyan E, Hovakimyan A, Serobian A, Neves M, Ferreira J, Ferreira F, Zakaryan H. A new microtubule-stabilizing agent shows potent antiviral effects against African swine fever virus with no cytotoxicity. Emerg Microbes Infect. 2021 Dec;10(1):783-796.

**Существующее оборудование и программы анализа:**

Центр прикладной физики ЛЯР (РОССИЯ):

При разработке сенсоров на основе ТМ будут использованы следующие подходы и методологии:

1. учитывающая современные подходы и методы технология травления треков для получения мембран с различными структурными характеристиками;
2. химические методы модификации поверхности с использованием ковалентной связи и адсорбции полиэлектролита;
3. современные методы нанесения покрытий, такие как термовакуумное испарение и магнетронное распыление металлов и сплавов;
4. методы электропрядения нановолокон из полимеров, включая биополимеры;
5. структурные исследования методами атомно-силовой микроскопии, просвечивающей электронной микроскопии и рентгеновской дифракции;
6. ИК-, УФ-ВИД-спектроскопия, рамановская спектроскопия, оптическая спектроскопия в реальном времени;

Институт молекулярной биологии НАН РА (ИМБ) и кафедра генетики и цитологии ЕГУ (АРМЕНИЯ):

Обработка клеток культуральной средой, фильтрованной через ТМ, будет осуществляться для исследований вирусов, включая:

1. ламинарные столы, qPCR, ELISA, центрифуги, морозильники и другое оборудование;
2. анализ комет будет проводиться на кафедре генетики и цитологии ЕГУ, где имеются флуоресцентные микроскопы, системы MetaSystems и Comet Assay IV для оценки ДНК-комет. Статистический анализ повреждений ДНК будет проводиться с использованием пакетов SPSS19 и Statgraphics Centurion16.

Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова (РОССИЯ):

Доступ к оборудованию для аффинной хроматографии (микрофлюидный прибор Elveflow с компрессором Бэмби), анализа сродства (Блиц-интерферометр с аминореактивным и стрептавидиновым сенсорами, флуориметр с остановленным потоком МОС-200, оснащенный кюветой µSFM), оценка сворачивания аптамера (спектрометр кругового дихроизма MOS-500, УФ-спектрометр Hitachi).

**Ожидаемые результаты:**

 Результатом Проекта является теоретические и экспериментальные исследования для разработки и получения новых функционализированных ТМ. Основные результаты проекта формулируются следующим образом.

 Важным ожидаемым результатом работы должны стать лабораторные методы получения модифицированных с помощью аптамеров ТМ для мониторинга вируса АЧС. Экспериментальные образцы мембран, полученные этим методом, будут применяться для биомиметических мембран и сенсоров. В результате работы будут определены следующие экспериментальные данные:

1. Условия процесса облучения ускоренными ионами, такие как интенсивность и геометрия пучка.
2. Условия физико-химической обработки облученного материала перед химической обработкой.
3. Условия химического травления треков, необходимые для получения желаемой пористой структуры.
4. Методы стандартизации и контроля качества разрабатываемых ТМ.
5. Выявление противовирусных свойств, протестированных аптамеров против вируса АЧС в культурах клеток.
6. Изготовление вирулицидных ТМ с иммобилизованными аптамерами против вируса АЧС.
7. Разработка ТМ с иммобилизованными аптамерами в качестве сенсоров против вируса АЧС.
8. Исследования повреждений ДНК в среде до и после фильтрации вирусов через ТМ, модифицированных протестированными аптамерами с вирулицидными способностями с использованием комет-анализа.

 Разработанная технология получения функционализированных ТМ должна обеспечить производство высокопроизводительных и селективных сорбционных микрофильтрационных ТМ для вирусного мониторинга. Планируется создание мембран с комплексом серебро-аптамеры для определения вируса АЧС. Присутствие на рынке многофункциональных ТМ, чувствительных к вирусу АЧС, окажет положительное влияние на мониторинг вирусов в сельском хозяйстве и паразитологической медицине. Методические подходы к получению аффинных мембран, модифицированных наночастицами серебра и золота, могут быть использованы для получения биосенсоров и диагностических наборов для экспресс-анализа наиболее значимых социальных заболеваний (грипп, коронавирус, гепатит, онкология).

 Решение поставленных задач Проекта позволит сохранить научный приоритет и существующие научные направления в области технологий производства и применения ТМ за счет координации специалистов междисциплинарных областей знаний. Получение новых материалов и устройств биомедицинского назначения с использованием ионно-трековых технологий повысит потенциал использования ускорительной технологии, ее вклад и роль в решении социально-экономических проблем. Результаты научных исследований Проекта по созданию и производству ТМ с контролируемыми структурными и поверхностными свойствами также могут быть эффективно использованы при реализации коммерчески привлекательных проектов, реализуемых в рамках Российско-Армянской национальной программы в сферах нанотехнологий и здравоохранении.

 В ходе реализации проекта планируется 2 публикации в российских рецензируемых журналах и 5 публикаций в зарубежных журналах, индексируемых WoS (Q1, Q2); защита магистерских и докторских работ.

**Риски:**

 Для успешной реализации Проекта и снижения рисков необходимы специализированные и дорогостоящие ресурсы поддержки. В распоряжении ЛЯР передовое научное оборудование и приборы: вновь созданные ускорители многозарядных ионов ДЦ-140 со специализированным каналом, диагностикой и камерой для облучения полимерных пленок ионами различной массы и энергии; комплекс оборудования для получения ТМ, включающий установки сенсибилизации, установки химической обработки и метрологическую лабораторию; стандартное покупное аналитическое оборудование для определения физико-химических свойств ТМ. Для модификации поверхности ТМ методами PVD и CVD в ЛЯР имеются установки термического и магнетронного распыления тонких пленок, а также установка электроформования нановолокон. Важно отметить, что предпосылками успешного завершения работ и снижения инвестиционных рисков является наличие в ЛЯР положительных результатов предшествующих фундаментальных и прикладных исследований, а также научных исследований по следующим направлениям:

1. использование пучков ионов высоких энергий для модификации материалов;
2. изготовление ТМ из различных полимеров;
3. исследование основных конструктивных и эксплуатационных параметров ТМ;
4. изучение физико-химических характеристик ТМ;
5. использование сопутствующих методов модификации полимерных пленок;
6. технический опыт разработки и создания стендов и приспособлений для опытного производства ТМ.

 Коллектив ЛЯР в данной области — специалисты и эксперты с мировым именем, имеющие публикации в высокоцитируемых научных журналах.

 Для успешной и малорисковой реализации целей и задач Проекта целесообразно привлекать специалистов в различных областях знаний, особенно в области технологии особо чистых биологических продуктов и молекулярной биологии. К серьезным рискам Проекта можно отнести следующие факторы:

1. отклонение от графика пуско-наладочных работ на циклотроне ДЦ-140;
2. выход из строя и ремонт критического аналитического оборудования;
3. проблемы с заказом реагентов;
4. трудности с поставкой импортных реагентов для молекулярно-биологических работ.

**2.3. Предполагаемый срок выполнения**

2025 – 2028 гг.

|  |  |
| --- | --- |
| **Этапы работы** | **Содержание работы** |
| 2025 год | 1. Отбор аптамеров с наибольшим сродством к вирусу АЧС.
2. Оценка генотоксических свойств выбранных аптамеров in vitro с использованием комет-анализа.
3. Модификация тонких слоев золота и серебра трековой мембраны методом магнетронного распыления
 |
| 2026 год | 1. Оценка противовирусных свойств негенотоксичных аптамеров против вируса АЧС in vitro до и после заражения с использованием комет-анализа.
2. Отбор аптамеров с вирулицидным действием для дальнейшей разработки ТМ с иммобилизованными аптамерами.
3. Модификация нанослоев золота и серебра специфическими аптамерами АЧС.
4. Оценка противовирусных свойств ТМ с иммобилизованными аптамерами против вируса АЧС.
5. Оценка свойств рамановской спектроскопии ТМ с иммобилизованными аптамерами против вируса АЧС.
 |
| 2027 год | 1. Сравнительная оценка противовирусных свойств протестированных аптамеров против вируса АЧС на основе анализа повреждений ДНК в клетках, инкубированных с аптамерами, с помощью комет-анализа.
2. Разработка протокола анализа вируса АЧС с использованием ГКРС-активных TM.
3. Разработка протокола анализа вируса АЧС с использованием рамановской спектроскопии.
 |
| 2028 год | 1. Применение выбранных ТМ с иммобилизованными аптамерами с оптимальными вирулицидными свойствами, прикрепленными к ТМ. Оценка их эффективности, основанная на анализе повреждений ДНК в среде до и после фильтрации вирусов с помощью комет-анализа.
2. Разработка протокола мониторинга вируса АЧС в реальном времени.
 |

**2.4. Участвующие лаборатории ОИЯИ**

ЛЯП

**2.4.1. Потребности в ресурсах МИВК**

Нет

**2.5. Участвующие страны, научные и научно-образовательные организации**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Страна** **или организация** | **Город** | **Институт**  | **Статус** | **Участники** |
| Россия | Дубна | ОИЯИ | - | ЦПФ ЛЯР |
| Армения | Ереван | ЕГУ | - | Кафедра генетики и цитологии |
| Армения | Ереван | НАН | - | ИМБ |
| Россия | Москва | МГУ им. Ломоносова | - | Химический факультет |

**2.6. Организации-соисполнители**

Нет

**3. Кадровое обеспечение**

**3.1. Кадровые потребности в течение первого года реализации**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **№№п/п** | **Категория работника** | **Основной персонал****Количество сотрудников** | **Ассоциированный персонал****Количество сотрудников** |
| 1. | научные работники | 9 | - |
| 2. | инженеры | 3 | - |
| 3. | специалисты | - | - |
| 4. | служащие | - | - |
| 5. | рабочие | - | - |
| **Итого:** | **12** | - |

**4. Финансовое обеспечение**

**4.1. Полная сметная стоимость проекта**

Общая сметная стоимость проекта 250 тысяч долларов США.

**4.2. Внебюджетные источники финансирования**

Нет

# Руководители проекта А.Н. Нечаев / /

#  Е.Г. Завьялова / /

Дата представления проекта в ДНОД \_\_\_\_\_\_\_\_\_

Дата решения НТС Лаборатории \_\_\_\_\_\_\_\_\_, номер документа \_\_\_\_\_\_\_\_\_

Год начала проекта –– 2025

**Предлагаемый план-график и необходимые ресурсы для осуществления
Проекта**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Наименования затрат, ресурсов,** **источников финансирования** | **Стоимость (тыс. долл.) потребности в ресурсах** | **Стоимость,** **распределение по годам** |
| 1 год | 2 год | 3 год | 4 год | 5 год |
|  | Международное сотрудничество (МНТС) | 25 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Материалы  | 75 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 |
| Оборудование и услуги сторонних организаций (пуско-наладочные работы) | - |  |  |  |  |  |
| Пуско-наладочные работы | - |  |  |  |  |  |
| Услуги научно-исследовательских организаций  | 150 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 |
| Приобретение программного обеспечения | - |  |  |  |  |  |
| Проектирование/строительство | - |  |  |  |  |  |
| Сервисные расходы (*планируются в случае прямой принадлежности к проекту)* | - |  |  |  |  |  |
| **Необходимые ресурсы** | **Нормо-час** | Ресурсы |  |  |  |  |  |  |
| * сумма FTE
 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| * ускорителя ЛЯР
 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 12,5 |
| * реактора
 | - |  |  |  |  |  |
| **Источники финансирования** | **Бюджетные средства** | Бюджет ОИЯИ *(статьи бюджета)* | 250 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| **Внебюджет (доп. смета)** | Вклады соисполнителей Средства по договорам с заказчикамиДругие источники финансирования  | - |  |  |  |  |  |

Руководитель проекта А.Н. Нечаев / /

Экономист Лаборатории Т.В. Мамонова / /

**ЛИСТ СОГЛАСОВАНИЙ ПРОЕКТА**

Наименование проекта: «Высокоселективные сенсоры, работающие на принципах молекулярного узнавания для детектирования вирусов»

Шифр проекта: 07-5-1131-3-2025/2029

Шифр темы: 07-5-1131-2017

ФИО Руководителей проекта: Нечаев Александр Николаевич

Завьялова Елена Геннадиевна

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |
| **CОГЛАСОВАНО** |  |  |  |
| **Вице-директор Института** | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ПОДПИСЬ | \_\_\_\_\_\_\_\_\_ИМЯ | \_\_\_\_\_\_\_\_\_ДАТА |
|  |  |  |  |
| **Главный ученый секретарь Института** | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ПОДПИСЬ | \_\_\_\_\_\_\_\_\_ИМЯ | \_\_\_\_\_\_\_\_\_ДАТА |
|  |  |  |  |
| **Главный инженер Института** | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ПОДПИСЬ | \_\_\_\_\_\_\_\_\_ИМЯ | \_\_\_\_\_\_\_\_\_ДАТА |
| **Руководитель ДБиЭП** | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ПОДПИСЬ | \_\_\_\_\_\_\_\_\_ИМЯ | \_\_\_\_\_\_\_\_\_ДАТА |
| **Руководитель ДкиД** | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ПОДПИСЬ | \_\_\_\_\_\_\_\_\_ИМЯ | \_\_\_\_\_\_\_\_\_ДАТА |
|  |  |  |  |
| **Ученый секретарь Лаборатории** | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ПОДПИСЬ | \_\_\_\_\_\_\_\_\_ИМЯ | \_\_\_\_\_\_\_\_\_ДАТА |
| **Руководители проекта** | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ПОДПИСЬ | \_\_\_\_\_\_\_\_\_ИМЯ | \_\_\_\_\_\_\_\_\_ДАТА |
|  | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ПОДПИСЬ | \_\_\_\_\_\_\_\_\_ИМЯ | \_\_\_\_\_\_\_\_\_ДАТА |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Одобрен ПКК по \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ (направление) | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ПОДПИСЬ | \_\_\_\_\_\_\_\_\_ФИО | \_\_\_\_\_\_\_\_\_ДАТА |