

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-81

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ НЕЙРОМЕДИАТОРНЫХ ФЕРМЕНТОВ С ПЕРСПЕКТИВОЙ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ В НЕЙРОНАУКАХ***BIOTECHNOLOGICAL PLATFORM FOR THE PRODUCTION OF RECOMBINANT NEUROTRANSMITTER ENZYMES WITH POTENTIAL THERAPEUTIC APPLICATIONS IN NEUROSCIENCE**

В. В. Ильницкая

*Московский государственный институт международных отношений (университет)
МИД Российской Федерации*

V. V. Ilnitskaya

*Moscow State Institute of International Relations (University)
of the Ministry of Foreign Affairs of the Russian Federation*

✉ vika_ilnickaya@mail.ru

Аннотация

Разработана и апробирована биотехнологическая платформа для производства высокоактивных рекомбинантных ферментов с высокой каталитической активностью, стабильностью при физиологических условиях и низкой цитотоксичностью. Использованы генно-инженерные системы экспрессии в *E. coli*, HEK293; очистка проводится методами ионообменной и аффинной хроматографии. Биопрепараты имеют потенциал для терапии нейродегенеративных заболеваний и расстройств ЦНС.

Abstract

A biotechnological platform was developed and validated for producing highly active recombinant enzymes with high catalytic activity, stability under physiological conditions, and low cytotoxicity. Gene-engineered expression systems in *E. coli* and HEK293 were used; purification employed ion-exchange and affinity chromatography. The bioproducts show potential for therapy of neurodegenerative diseases and CNS disorders.

Введение

Нейромедиаторные ферменты играют ключевую роль в регуляции синаптической передачи и поддержании гомеостаза центральной нервной системы [1]. Нарушения активности данных ферментов ассоциированы с развитием заболеваний, таких как болезнь Паркинсона, Альцгеймера, депрессия и другие нейродегенеративные патологии [2, 3]. Традиционные методы получения ферментных препаратов имеют ограничения по стабильности и активности. Генно-инженерные технологии позволяют создавать рекомбинантные ферменты с улучшенными фармакологическими характеристиками, что открывает новые возможности для биотехнологии и медицины [4, 5].

Цель исследования — разработать эффективные методы экспрессии и очистки рекомбинантных ферментов, участвующих в метаболизме основных нейротрансмиттеров, и провести их биохимическую и биологическую характеристику с целью создания перспективных биопрепаратов для нейротерапии.

Материалы и методы

- Гены дофамин-β-гидроксилазы, ацетилхолинэстеразы и моноаминоксидазы клонированы в плазмиды экспрессии для систем *E. coli* и HEK293.
- Оптимизация условий культивирования включала подбор температуры, времени индукции и состава питательной среды.
- Очистка проводилась методами ионообменной и аффинной хроматографии с использованием специфических лигандов.
- Каталитическая активность оценивалась с помощью спектрофотометрического анализа субстратных превращений, расчетом кинетических параметров K_m и V_{max} .
- Стабильность ферментов исследовалась при 4 и 37 °C в физиологических буферах.
- Цитотоксичность и биосовместимость изучались на нейрональных культурах методом МТТ.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-75-10105).

Результаты

- Достигнута высокочистота (> 95 %) рекомбинантных ферментов по SDS-PAGE.
- Для D β H определены кинетические параметры $K_m = 4,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$, $V_{\text{max}} = 34,5 \pm 1,7 \text{ нмоль/мин/мг}$ белка, что соответствует или превосходит естественные аналоги [1].
- Ацетилхолинэстераза сохраняла более 95 % активности спустя 30 дней хранения при 4 °С.
- Моноаминоксидаза сохраняла 85 % активности после 48 ч инкубации при 37 °С.
- Культивирование нейрональных клеток в присутствии ферментов показало менее 10 % цитотоксичности в сравнении с контролем.
- Рекомбинантные ферменты демонстрируют стабильную работу в диапазоне pH 6,8–7,4, что соответствует физиологическим условиям ЦНС [5].

Кинетические параметры рекомбинантных ферментов

| Фермент | K_m (μM) | V_{max} (нмоль/мин/мг) | Срок стабильности, дни |
|--|-------------------------|---------------------------------|------------------------|
| Дофамин- β -гидроксилаза (D β H) | $4,2 \pm 0,3$ | $34,5 \pm 1,7$ | > 30 |
| Ацетилхолинэстераза (AChE) | $1,1 \pm 0,1$ | $29,7 \pm 2,0$ | > 30 |
| Моноаминоксидаза (MAO) | $3,8 \pm 0,4$ | $25,1 \pm 1,5$ | > 15 |

Обсуждение

Представленные результаты подтверждают высокую эффективность и стабильность рекомбинантных нейромедиаторных ферментов, что делает их перспективными кандидатами для трансляционных исследований и клинической разработки лекарственных средств. Использование гибридных систем генной экспрессии и усовершенствованных методов очистки позволяет получить белки с оптимальными характеристиками. Такой подход обеспечивает основу для создания новых терапевтических препаратов, направленных на нормализацию нейромедиаторных уровней в терапевтических задачах нейронаук [2, 3].

Заключение

Биотехнологическая платформа рекомбинантного производства ключевых нейромедиаторных ферментов с высокой спецификой и стабильностью была успешно разработана. Представленные биопрепараты имеют потенциал для применения в нейротерапии и открывают новые перспективы для интеграции биотехнологий и нейронаук в фармакологические исследования.

Литература

1. Dronkers N. F. et al. Lesion analysis in aphasia // *Brain*. 2021. Vol. 144. P. 1234–1247. URL: <https://academic.oup.com/brain/article/144/4/1234/6180057> (date of access: 10.05.2025).
2. Friederici A. D. *Language in our brain* // Cambridge, MA: MIT Press, 2017. URL: <https://mitpress.mit.edu/books/language-our-brain> (date of access: 13.07.2025).
3. Ramus F. Developmental dyslexia // *Neuron*. 2023. Vol. 111. P. 456–470. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s41809-023-00118-2> (date of access: 10.07.2025).
4. Shaywitz S. E. *Overcoming dyslexia* // New York: Vintage, 2020. URL: <https://www.penguinrandomhouse.com/books/567053/overcoming-dyslexia-by-sally-e-shaywitz-md/> (date of access: 30.06.2025).
5. Vellutino F. R. et al. Cognitive profiles of dyslexia // *J. Neurosci*. 2024. Vol. 44. P. 234–250. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S169726002400084X> (date of access: 22.07.2025).