



Панамарев Никита Сергеевич

**БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ БЕЛКА СУРВИВИНА
В МОЧЕ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ**

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Институте биофизики Сибирского отделения Российской академии наук – обособленном подразделении Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук».

Научный руководитель: **Франк Людмила Алексеевна,**
доктор биологических наук

**Официальные
оппоненты:**

Тикунова Нина Викторовна,
доктор биологических наук, доцент
Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки Институт химической биологии и фундаментальной
медицины им. Д.Г. Кнорре Сибирского отделения
Российской академии наук, г. Новосибирск, главный
научный сотрудник, заведующий лабораторией
молекулярной микробиологии

Антипова Надежда Викторовна,
кандидат биологических наук
Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки Государственный научный центр Российской
Федерации Институт биоорганической химии им.
академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук, г. Москва, старший научный
сотрудник лаборатории мембранных и биоэнергетических
систем отдела функционирования живых систем

Ведущая организация: Федеральное государственное учреждение «Федеральный
исследовательский центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ
Биотехнологии РАН), г. Москва

Защита состоится **13 октября 2026 г. в 11:00** на заседании диссертационного совета
24.1.228.03 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского
отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН) по адресу: 660036,
г. Красноярск, Академгородок, д. 50, стр. 50

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке ФИЦ КНЦ
СО РАН и на сайте: <https://www.ibp.ru/diser/diser.php>

Автореферат разослан «___» июля 2026 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Дементьев Д.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Рак мочевого пузыря (РМП) является девятым по частоте диагностируемым онкологическим заболеванием в России у мужчин и шестнадцатым у женщин [Каприн и др, 2023]. В зависимости от вовлечённости мышечной стенки мочевого пузыря в онкологический процесс данное заболевание делят на немышечно-инвазивный (НМИРМП) и мышечно-инвазивный рак мочевого пузыря (МИРМП). До прорастания опухоли в мышечную стенку РМП медленно прогрессирует и хорошо поддаётся лечению, с возможностью полностью сохранить поражённый орган и высокое качество жизни. Однако высокая склонность к рецидивированию требует тщательного и регулярного наблюдения за состоянием пациентов.

Золотым стандартом для диагностики и мониторинга пациентов является цистоскопия – визуальный осмотр мочевого пузыря и мочевого канала при помощи эндоскопа на наличие новообразований с последующим определением их характера. Данная процедура является дорогостоящим и инвазивным методом, из-за чего болезнь часто выявляют несвоевременно, когда начинают появляться беспокоящие пациентов симптомы – макрогематурия и дизурические расстройства. Дополнением к данному методу служит цитологическое исследование клеточного осадка мочи, представляющее собой изучение структуры элементов мочи под микроскопом для поиска атипичных клеток, указывающих на развитие онкологического процесса. Цитологическое исследование также имеет ряд значимых недостатков: диагностическая эффективность значительно зависит от квалификации проводящего её цитопатолога, метод имеет низкую чувствительность для ранних стадий рака, так как клетки низкой степени злокачественности часто не отличимы от нормальных. В связи с этим, требуются новые, простые и неинвазивные методы ранней диагностики и прогностики данного заболевания.

Особый интерес вызывает диагностика РМП, основанная на определении онкомаркеров в моче, куда при контакте с опухолью попадают маркерные молекулы. Это неинвазивный материал для исследования доступный практически в неограниченном количестве. Перспективным кандидатом в маркеры РМП является сурвивин (BIRC5) – мультифункциональный белок, ингибирующий апоптоз и участвующий в регуляции клеточного деления. Наблюдается значительная экспрессия данного белка в эмбриональных и злокачественных опухолевых тканях, однако в нормальных, терминально дифференцированных тканях сурвивина практически нет, что делает его привлекательным маркером для диагностики онкологических заболеваний. Стоит отметить, что из-за отсутствия стандартных методов обнаружения сурвивина в моче диагностическая чувствительность в разных исследованиях варьирует от 20 до 70%. По имеющимся на данный момент литературным данным, пороговое значение концентрации сурвивина в моче, позволяющее стратифицировать пациентов с подозрением на РМП и здоровых людей находится на уровне нескольких пМ. Т.е. аналитическая система для выявления такой низкой концентрации мишени в образце должна иметь очень высокую чувствительность.

В Институте биофизики СО РАН на протяжении более чем 50 лет проводятся

исследования биolumинесценции морских организмов и изучаются способы её практических приложений. Основными ферментами, обеспечивающим биolumинесценцию у многих известных на сегодняшний день морских обитателей, являются целентеразин-зависимые люциферазы, представляющие собой одноцепочечные глобулярные белки (16-35 кДа), катализирующие реакцию окисления субстрата целентеразина молекулярным кислородом с выделением CO_2 и излучением кванта голубого цвета ($\lambda_{\text{max}}=470-490$ нм). Благодаря высокому квантовому выходу биolumинесцентной реакции и низкому уровню шумового сигнала, возможно создание высокочувствительных молекулярных аналитических систем с использованием данных белков в качестве репортёрных молекул. Получены рекомбинантные аналоги целентеразин-зависимых люцифераз и их различные генетически-модифицированные варианты с новыми полезными свойствами, химически синтезированы и коммерчески доступны субстрат и его синтетические варианты. Показана перспективность использования этих люцифераз как репортеров для высокочувствительного молекулярного анализа различных диагностически важных соединений. Это создает основу для разработки высокочувствительного анализа онкомаркера сурвивина в моче и исследования его пригодности при диагностике рака мочевого пузыря.

Степень разработанности темы исследования. Как следует из анализа научной литературы, чувствительность и специфичность сурвивина как онкомаркера для выявления РМП существенно варьирует от исследования к исследованию из-за отсутствия стандартных методов обнаружения сурвивина в моче. Опубликованные методы обнаружения сурвивина, основанные на колориметрическом способе детекции аналита, зачастую не обладают достаточной чувствительностью для определения сурвивина в диагностически значимом диапазоне концентраций. Данные о биolumинесцентных диагностикумах, предназначенных для выявления сурвивина в образцах мочи в литературе отсутствуют.

Целью исследования являлось создание высокочувствительного биolumинесцентного способа выявления сурвивина в моче и установление перспективности данного маркера для диагностики и прогнозирования рака мочевого пузыря.

Для достижения поставленной цели требовалось решить следующие **задачи**:

1. Получить и исследовать свойства специфичных биolumинесцентных репортеров на основе рекомбинантных целентеразин-зависимых люцифераз, а также рекомбинантного сурвивина. Разработать дизайн анализа сурвивина на их основе.
2. Провести испытание разработанного аналитического подхода с использованием модельных и клинических образцов мочи.
3. Провести статистический анализ результатов и определить значимость содержания сурвивина в моче как диагностического и прогностического параметра при заболевании РМП.
4. Определить перспективность использования сурвивина в комбинации с другими онкомаркерами при выявлении ранних стадий заболевания РМП.

Научная новизна. Получены новые биоспецифические репортёрные молекулы и изучены их свойства; разработан дизайн биolumинесцентного высокопроизводительного иммуноанализа белка сурвивина в моче; показана

взаимосвязь между концентрацией сурвивина в образцах и диагнозом заболевания, а также клинико-морфологическими характеристиками опухоли, такими как степень инвазии, степень дифференцировки, размер опухоли и рецидивирование. Установлено, что для выявления ранних стадий заболевания РМП необходимо определять в моче пациентов одновременно сурвивин и онкомаркер CYFRA 21-1.

Теоретическая и практическая значимость. Установлено пороговое значение концентрации сурвивина в моче, позволяющее диагностировать заболевание с чувствительностью 62% и специфичностью 97%. Разработан высокопроизводительный способ выявления сурвивина для быстрой неинвазивной диагностики заболевания органов мочеполовой системы. Все составляющие аналитической системы отечественного происхождения, что делает анализ доступным для проведения широких скрининговых исследований пациентов групп риска, осуществления мониторинга проводимого лечения, своевременного обнаружения рецидива заболевания. Наличие установленного повышенного уровня сурвивина в анализируемых образцах является обоснованием для формирования групп пациентов повышенного онкологического риска и назначения более глубокого обследования.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработан дизайн высокопроизводительного биолюминесцентного иммуноанализа сурвивина в образцах мочи на основе люциферазы NanoLuc. Метод способен выявлять концентрации исследуемого белка в диагностически значимом диапазоне концентраций, с пределом обнаружения аналита 10,6 пг/мл (0,6 пМ).

2. Показано, что содержание сурвивина имеет высокую диагностическую значимость и соответствует диагнозу заболевания РМП, установленного клиническими сертифицированными методами (чувствительность 62%, специфичность 97%). Предложенный анализ служит удобным неинвазивным способом преддиагностики дисфункций мочевыводящих путей, в том числе и РМП.

3. Повышенное содержание сурвивина в моче пациентов может служить основанием для стратификации больных в отношении неблагоприятных прогностических факторов: высокая гистологическая стадия, большой размер опухоли, наличие мышечной инвазии. Отсутствие сурвивина в моче может служить благоприятным прогностическим фактором, увеличивающим медианный срок безрецидивной выживаемости.

4. Способ позволяет обнаруживать ранние стадии заболевания (случаи немышечно инвазивного рака мочевого пузыря, НМИРМП) с чувствительностью 52%. Выявление сурвивина одновременно с онкомаркером CYFRA 21-1 в моче больных РМП увеличивает чувствительность выявления НМИРМП до 74% при специфичности анализа 89%.

Личный вклад соискателя заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования – от постановки задач, проведения экспериментов и анализа полученных результатов до подготовки публикаций.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов подтверждена использованием современных методов исследования и статистического анализа, а также достаточным объёмом экспериментальных данных.

Результаты работы были представлены в виде докладов и тезисов на следующих научных конференциях: XVII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Перспектив Свободный» (Красноярск, 2021); Всероссийская конференция «Синтетическая биология и биофармацевтика» (Новосибирск, 2022 г.); Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2024» (Москва, 2024); VI Всероссийская конференция «Опухолевые маркеры: молекулярно-генетические и клинические аспекты» (с.Майма, 2024); Конкурс-конференция молодых учёных и специалистов ИБФ СО РАН (Красноярск, 2026); на семинарах лаборатории фотобиологии и лаборатории биолюминесцентных и экологических технологий Института биофизики СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН.

Исследование проведено в рамках проектов: грант Красноярского краевого фонда науки «Разработка и валидация молекулярно-генетических методов диагностики и стратификации риска рецидивирования немышечно инвазивного рака мочевого пузыря (НМИРМП)» (Договор №241 от 28.04.2021 г), грант Российского научного фонда и Красноярского краевого фонда науки «Диагностика и мониторинг течения немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря (НМИРМП) методом жидкостной биопсии» (Проект № 25-15-20021).

Публикации. По теме диссертационного исследования опубликовано 10 работ, в том числе: 5 статей в научных журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных изданий (Scopus, WoS, Белый список) и рекомендованных ВАК; 4 публикации в сборниках докладов научных конференций; 1 патент РФ.

Структура и объём работы. Работа изложена на 120 страницах рукописного текста и включает: введение, обзор литературы, описание методов исследования, изложение результатов исследования и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы (137 источников, из них 127 иностранных). Диссертационная работа содержит 9 таблиц и 43 рисунка.

Соответствие диссертации паспорту специальности 1.5.6 Биотехнология: Диссертационная работа Панамарева Никиты Сергеевича соответствует паспорту специальности 1.5.6. Биотехнология в соответствии с п.7: Прикладная энзимология, включая ферментные системы, технологии очистки белков, прикладные аспекты белковой инженерии; и п. 22: Биокаталитические, биосинтетические и биосенсорные (включая нанобиосенсорные) технологии. Создание биоаналитических систем для медицинской диагностики и медицинского анализа. Диагностические средства (биочипы, биосенсоры), биосовместимых материалов с применением клеточных, геномных и постгеномных технологий; создание банков биологических образцов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Последовательность гена, кодирующего человеческий сурвивин, оптимизированная для бактериальной экспрессии, была синтезирована и клонирована в вектор рMALc5x (NEB, Великобритания) фирмой Евроген, Россия.

Вариант искусственной целентеразин-зависимой люциферазы NanoLuc(C164S)LCTPSR, удлинённой со стороны С-конца гексапептидом,

содержащим уникальный цистеин для направленного химического конъюгирования, получали по [Krasitskaya et al, 2023]. Гибридный белок proZZ-обелин, в состав которого входят две копии полипептида Z, синтетического аналога домена В из белка А бактерии *Staphylococcus aureus*, получали в соответствии с [Krasitskaya et al, 2020]. Вариант обелина А6С, содержащий доступный цистеин для химической конъюгации, получали по [Krasitskaya et al, 2017].

Чистоту препаратов при выделении белков контролировали электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем 0,1% SDS по методу Лэммли. Концентрацию белков определяли спектрофотометрически с помощью набора DC Protein Assay (Bio-Rad) по протоколу производителя.

Синтетический целентеразин получен от Prolume Ltd. (Pinetop, США), фуримазин от TargetMol (США).

Моноклональные антитела к сурвивину получены от фирм Abcam (Великобритания), Novus Biologicals (США). Мышиные поликлональные антитела к полученному нами рекомбинантному сурвивину были изготовлены к.б.н. Матвеевым А.Л. (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск) как описано в [Panamarev et al, 2025].

Колориметрический иммунодиагностический набор для определения сурвивина Human Survivin Quantikine ELISA Kit получен от фирмы R&D Systems (США). Контрольная моча и иммунодиагностический набор «CYFRA 21-1-ИФА-БЕСТ» получены от фирмы Вектор-Бест (Россия).

Забор образцов мочи пациентов с клинически подтверждённым диагнозом РМП проводился на базе КБУЗ «КККОД имени А.И. Крыжановского» медицинским персоналом учреждения. Образцы мочи здоровых добровольцев получены врачами Красноярской городской поликлиники № 14 у сопоставимых по полу и возрасту граждан, проходивших диспансерное наблюдение. Всеми пациентами подписано добровольное информированное согласие участия в исследовании. Исследование одобрено Локальным Этическим комитетом КККОД (протокол заседания № 27 от 02.07.2020 г.).

Данные обрабатывали с использованием программного пакета Microsoft Excel для Windows 10, статистического программного обеспечения MedCalc (MedCalc Software Ltd, Бельгия) и Sigma Plot (Systat Software, США). Для определения уравнения кривой, наилучшим образом описывающей полученные данные иммуноанализа использовали программное обеспечение CurveExpert Basic (Hyams Development, Великобритания). Анализ ПААГ-электрофореграмм проводили при помощи программного обеспечения GelAnalyzer 23.1 (Венгрия). Для сравнения количественных данных использовался U-тест Манна-Уитни. Для работы с категориальными данными использовали критерий χ^2 . Статистически значимым считали уровень $p < 0,05$.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

2.1 Получение и характеристика рекомбинантного сурвивина

Наиболее доступным вариантом получения рекомбинантного белка является его экспрессия в бактериальных клетках *E. coli*. Этот подход оптимален для белков, не требующих сложных посттрансляционных модификаций. Последовательность

сурвивина, длиной 142 а.к., не содержит ни одного дисульфидного моста, что потенциально показывает отсутствие сложностей при экспрессии данного белка в бактериальных клетках. В работе использовали кодон оптимизированную для экспрессии в бактериальных клетках нуклеотидную последовательность, кодирующую сурвивин. Получена генетическая вставка сурвивина фланкированная сайтами рестрикции NcoI и XhoI (электрофореграмма на рис. 1а) и клонирована в вектор рЕТ-19b.

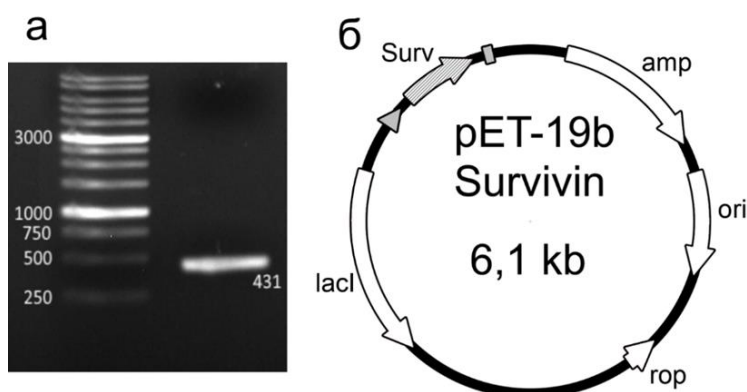


Рис. 1. (а) – электрофореграмма ПЦР-вставки сурвивина после очистки препаративным электрофорезом; (б) – строение плазмиды, обеспечивающей экспрессию сурвивина в бактериальных клетках. Surv – ген, кодирующий сурвивин; lacI – репрессор лактозного оперона; amp – β -лактамазу.

Полученной плазмидой рЕТ-19b-Survivin (рис. 1б) были трансформированы клетки *E. coli* штамма BL21(DE3) Codon Plus (RIPL), предназначенного для синтеза рекомбинантных белков. В результате культивирования, получили биомассу клеток-продуцентов сурвивина. Очистку белка из мочевинового экстракта телец-включений бактериальных клеток проводили хроматографически на колонке HiTrap DEAE FF в денатурирующих условиях (все буферные растворы содержали 6М мочевины). Для рефординга сурвивина из денатурированного состояния был проведён диализ полученной фракции против буферного раствора с содержанием 0,6М мочевины. Электрофоретический анализ очищенного препарата сурвивина после диализа приведён на рис. 2а.

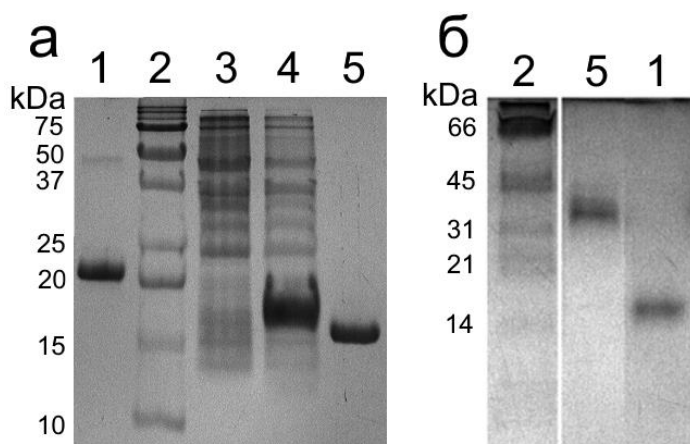


Рис. 2. 15%-ПААГ электрофорез образцов сурвивина в денатурирующих (а) и нативных (б) условиях. 1 – обелин (22,2 кДа); 2 – маркерные белки; 3,4 – клетки до и после индукции; 5 – препарат очищенного сурвивина. Числами показана молекулярная масса маркерных белков.

Как показал электрофоретический анализ полученного препарата белка в нативных условиях (рис. 2б) полоса сурвивина соответствует примерно в 2 раза большей молекулярной массе, что подтверждает склонность полученного нами рекомбинантного сурвивина к образованию димера, как и у природного варианта белка.

Чистота полученного белкового препарата составила 96%, что является очень высоким показателем. Выход белка с 1 литра культуры составил 72,8 мг.

Биоспецифичность полученного рекомбинантного сурвивина оценивали по его способности связываться с соответствующими анти-сурвивиновыми антителами (Abscam, Великобритания) в ходе биолюминесцентного твердофазного микроанализа. Сурвивин иммобилизовали на поверхности лунки планшета прямой сорбцией и выявляли, последовательно добавив анти-сурвивиновые антитела и proZZ-обелин (схема на рис. 3). Сформированные на поверхности лунки планшета комплексы выявляли по биолюминесценции при впрыске раствора кальция.

Как видно из рис. 3, получена зависимость биолюминесцентного сигнала от содержания сурвивина в образце, что подтверждает способность полученного рекомбинантного белка «узнаваться» и связываться с соответствующими антителами.

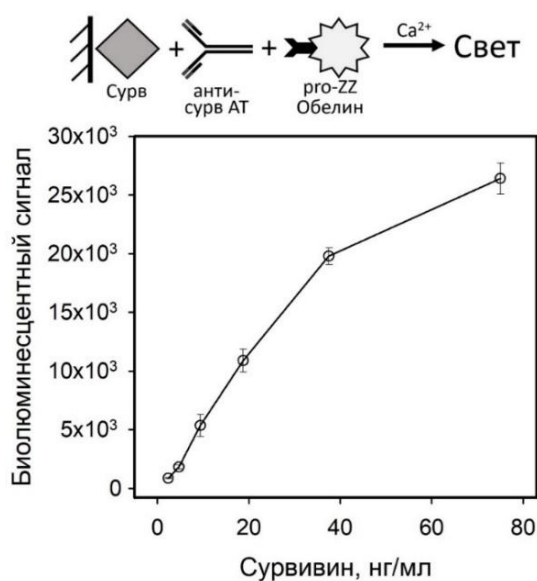


Рис. 3. Анализ связывания рекомбинантного сурвивина анти-сурвивиновыми антителами.

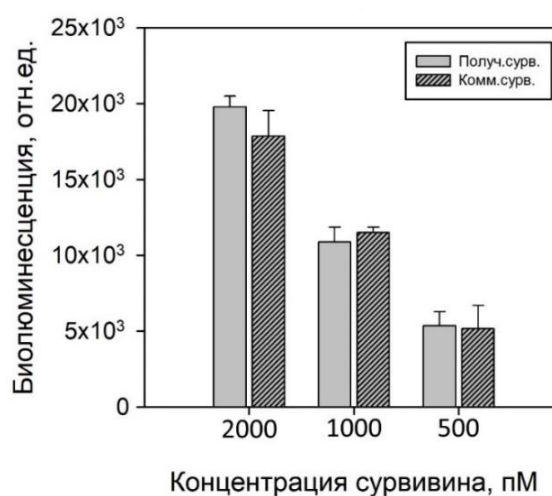


Рис. 4. Сравнение полученного и коммерческого (Abscam, Великобритания) сурвивина в анализе связывания с иммуноглобулинами. $N=3$

Аналогичный анализ провели с использованием коммерческого варианта белка (Abscam, Великобритания), представляющего из себя слитый белок, состоящий из доменов сурвивина и кальмодулина. Как видно из рисунка 4, разница в сигналах составляет не более 10%. Данные эксперимента показали, что полученный рекомбинантный сурвивин не уступает коммерческому по эффективности связывания с антителами. Полученный высокоочищенный препарат рекомбинантного сурвивина использовали в дальнейшем в качестве анализа при разработке иммуноанализа сурвивина.

2.2 Конкурентный вариант иммуноанализа сурвивина на основе фотопротеина обелина

Ca^{2+} -регулируемый фотопроtein обелин представляет собой фермент-субстратный комплекс, который при связывании ионов кальция окисляет субстрат с выделением CO_2 и кванта света ($\lambda_{\text{max}} = 480 \text{ нм}$). Обелин всесторонне изучен относительно биохимических и биофизических свойств, показано, что на его основе

возможно создание уникальной биолуминесцентной детекционной системы, которая является «автономной», легко запускаемой, быстрой и высокочувствительной [Frank, 2010].

В нашем исследовании с помощью генетического фьюзинга был получен гибридный белок, включающий сурвивин и обелин, на его основе разработан иммуноанализ конкурентного типа. Получена плаزمида pET-19b-Surv-OL (рис. 5), которой трансформировали клетки штамма BL21(DE3) Codon Plus (RIPL). Клетки культивировали, полученную биомассу разрушали УЗ-обработкой. Получение белка контролировали гель-электрофорезом в денатурирующих условиях.

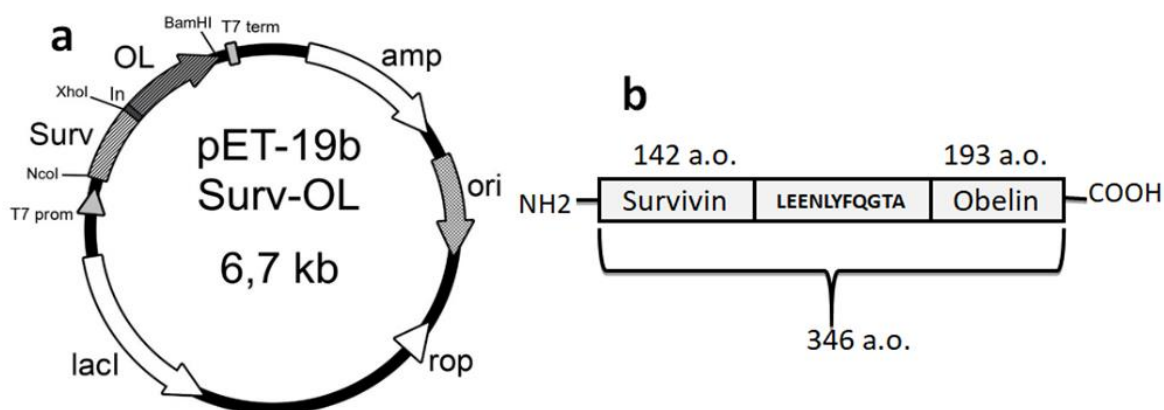


Рис. 5. Строение плазмиды (a) и гибридного белка Surv- OL (b). Surv – ген, кодирующий сурвивин; OL – обелин; lacI – репрессор лактозного оперона; amp – β -лактамазу; In - линкер; NcoI, XhoI, BamHI – сайты рестрикции.

Из рис. 6 видно, что после индукции ИПТГ в белковом составе клеток появилась яркая полоса на уровне 39,6 кДа, что соответствует ожидаемой молекулярной массе гибридного белка. Подавляющая часть целевого белка находилась в нерастворимой фракции клеточного лизата в виде телец-включений, которые затем очищали хроматографически. Обелиновый домен активировали целентеразином, финальный гибрид очищали ионообменной хроматографией на колонке Mono Q HP в градиенте NaCl (0-0,6 M).

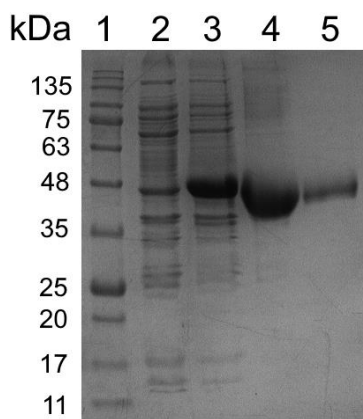


Рис. 6. 12,5% ПААГ-электрофорез образцов при выделении и очистки сурвивина обелина. 1 – маркерные белки; 2,3 – клетки до и после индукции; 4 – экстракт телец-включений в растворе 6M мочевины; 5 – очищенный препарат Surv-OL после активации целентеразином.

Выход целевого гибридного белка составил 17,5 мг с 1 литра бактериальной культуры. Полученный белковый препарат был 94% чистоты.

Предел обнаружения фотопотеина определяли как такое количество белка, при котором сигнал от образца в 2 раза превышает сигнал от контрольной лунки, содержащей равный объем буфера. Серию разведений гибридного белка вносили в лунки иммунологического планшета, биolumинесценцию запускали впрыском раствора CaCl_2 . Зависимость биolumинесцентного сигнала от количества внесённого белка представлена на рис. 7.

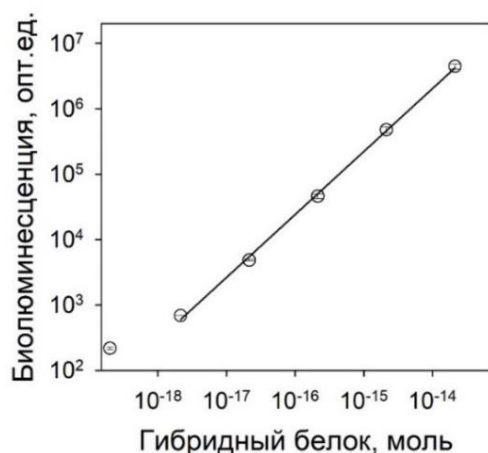


Рис. 7. Зависимость биolumинесценции гибридного белка от его количества. Отдельно стоящая точка – контрольная лунка. $N=3$.

Предел обнаружения полученного нами гибридного белка составил 2,1 амоль, что близко к таковому для рекомбинантного обелина дикого типа — 1,4 амоль [Bashmakova et al, 2017].

Стабильность обелинового домена оценивали по отношению Ca^{2+} -индуцированной биolumинесценции и Ca^{2+} -независимой биolumинесценции. Константу спада биolumинесцентного сигнала рассчитывали по 5 независимым кривым спада сигнала путём экспоненциальной аппроксимации. Полученные значения приведены в табл. 1.

Таблица 1. Характеристики биolumинесцентного сигнала гибридного белка *Surv-OL* и обелина дикого типа (*WT-OL*)

Характеристика	WT-OL	Surv-OL
Ca^{2+} -независимая биolumинесценция, 10^{-6} (0,1 мг/мл)	0,9	0,6
Константа спада биolumинесцентного сигнала, с^{-1}	10,2	$7,27 \pm 0,05$
Предел обнаружения, амоль	1,4	2,1
Активность относительно дикого обелина, %	100	94

Как видно из табл. 1, гибридный белок по своим биolumинесцентным характеристикам сопоставим с обелином дикого типа, что подтверждает его пригодность для использования в качестве высокочувствительного биolumинесцентного репортёра.

Для оценки способности сурвивинового домена белка связываться с соответствующими анти-сурвивиновыми антителами проводили биolumинесцентный твердофазный иммуноанализ. Антитела иммобилизовали на поверхности лунки

планшета в разных концентрациях и затем добавили раствор Surv-OL. Была получена линейная зависимость биолюминесцентного сигнала от концентрации антител (рис. 8).

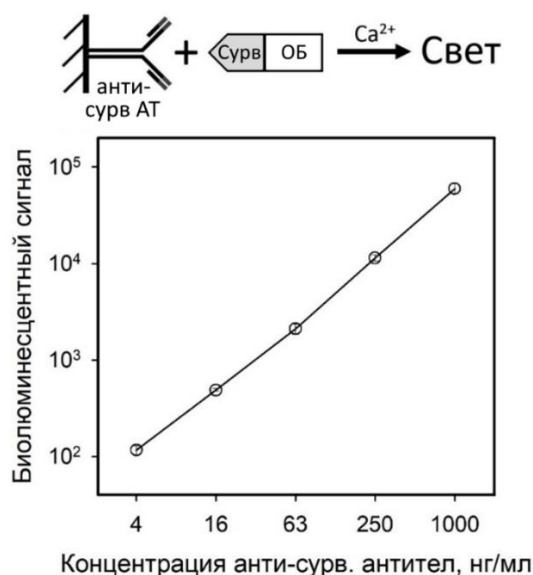


Рис. 8. Зависимость биолюминесценции гибридного белка сурвивина-обелина от концентрации антител к сурвивину, сорбированных на поверхности микропланшета, схема анализа показана вверху. $N=3$.

Таким образом, оба домена полученного нами гибридного белка обладают свойствами исходных полипептидов — это означает, что данный белок может использоваться для создания конкурентного варианта иммуноанализа сурвивина.

В качестве белка-мишени использовали образец полученного нами рекомбинантного сурвивина, а в качестве меченого белка — гибрид Surv-OL. Схема анализа и полученный результат представлены на рисунке 9.

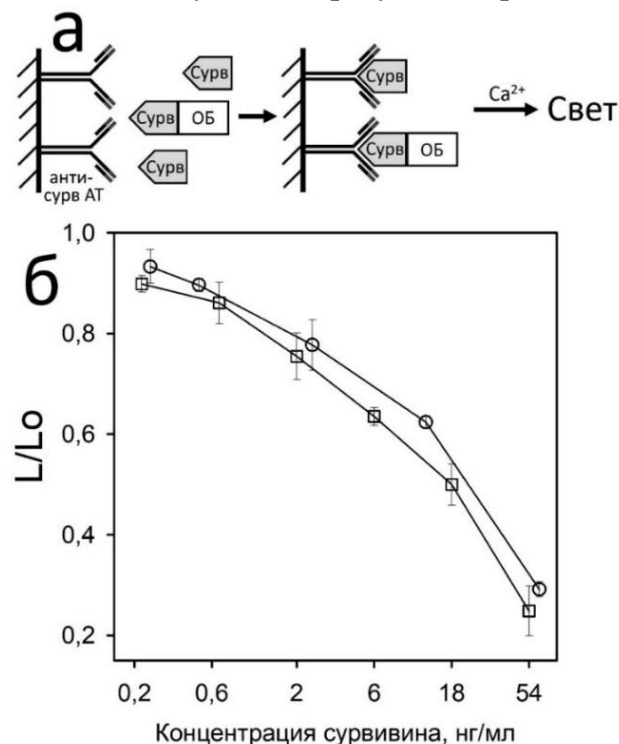


Рис. 9. Схема (а) и результаты (б) биолюминесцентного конкурентного анализа сурвивина в модельной моче (-○-) и буферном растворе (-□-). L — биолюминесценция в лунке с образцом, L_0 — в лунке с буферным раствором. $N=3$.

Из рисунка видно, что биолюминесцентный сигнал метки находится в обратной зависимости от концентрации сурвивина в анализируемых образцах в диапазоне от 0,25 до 54 нг/мл, предел обнаружения составил 163,1 пг/мл при анализе в буферных растворах. Таким образом, чувствительность рассмотренного варианта анализа

сурвивина существенно хуже (почти на порядок), чем необходимо для выявления этого параметра при диагностике РМП.

2.3 «Сэндвич» вариант иммуноанализа сурвивина на основе обелина

На рис. 10 вверху показана схема твердофазного биолюминесцентного иммуноанализа сурвивина сэндвич-типа. В качестве специфичной метки использовали конъюгат рекомбинантного обелина с мышинными поликлональными анти-сурвивиновыми антителами. Его получали двухэтапным способом синтеза с использованием гетеробифункционального «сшивающего» реагента сукцинимидил-(N-малеимидометил) циклогексан-1-карбоксилата (SMCC) по [Франк и др, 2004]. Очистку биолюминесцентной метки осуществляли с помощью гель-фильтрации на колонке Superdex 200 10/300 GL, предел ее обнаружения составил 1,1 амоль (определяли, как описано выше).

Полученный конъюгат использовали в качестве метки в биолюминесцентном твердофазном иммуноанализе сурвивина сэндвич-типа. Поликлональные антитела сорбировали на планшете, далее вносили серию разведений сурвивина в буфере и инкубировали, а затем после отмывок – добавляли полученный конъюгат. Сформированные на поверхности лунки планшета комплексы выявляли по их биолюминесцентному сигналу при добавлении раствора хлорида кальция. Результаты анализа представлены на рисунке 10.

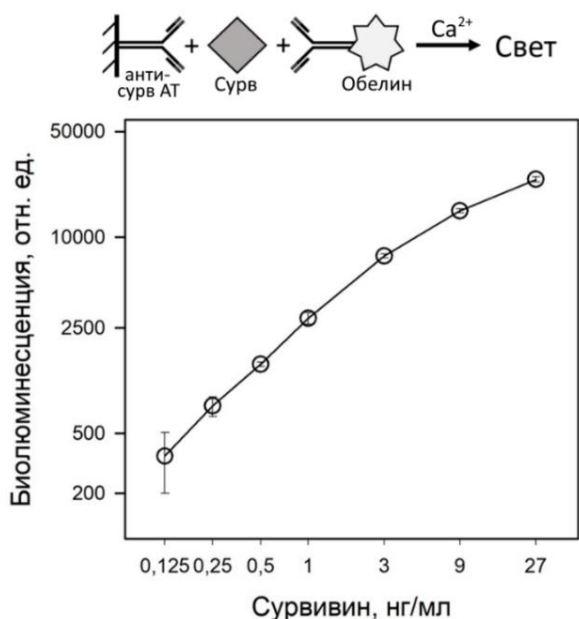


Рис. 10. Биолюминесцентный иммуноанализ сурвивина «сэндвич» типа на основе конъюгата анти-сурвивинового антитела и обелина. AbSurv – антитело к сурвивину, Surv – сурвивин, OL – обелин. N=3

Как видно из рисунка, биолюминесцентный сигнал зависит от концентрации сурвивина в диапазоне от 0,125 до 27 нг/мл. Предел обнаружения аналита составил 111,5 пг/мл. Таким образом, аналитический диапазон существенно сдвинут в стороны высоких концентраций аналита, а чувствительность анализа на порядок хуже, чем необходимо для выявления сурвивина в диагностически значимом диапазоне концентраций (10-250 пг/мл) [Srivastava et al, 2013].

2.4 Биolumинесцентный иммуноанализ сурвивина на основе люциферазы NanoLuc

NanoLuc – искусственная люцифераза, созданная корпорацией Promega на основе люциферазы глубоководной креветки *Oplophorus gracilirostris*. Её активность более чем в 150 раз превышает традиционно используемые люциферазы светляка и коралла *Renilla*, благодаря чему она обладает огромным потенциалом для диагностических приложений. В лаборатории биофизики получен вариант люциферазы NanoLuc(C164S)LCTPSR, несущей гексапептид с уникальным цистеиновым остатком, доступным для химической конъюгации (далее – NLuc).

Конъюгат поликлонального антитела к сурвивину и люциферазы NLuc был получен химическим синтезом, по способу, описанному выше для получения конъюгата антитела с обелином и использован в качестве метки в биolumинесцентном твердофазном иммуноанализе сурвивина. Аликвоты сурвивина в стандартной моче (по 100 мкл, от 15,6 до 1000 пг/мл), вносили в лунки планшета, активированные поликлональными антителами к сурвивину, инкубировали, промывали, после чего добавляли раствор конъюгата. Биolumинесцентную реакцию инициировали добавлением свежеприготовленного раствора фуримазина (1 мкМ в 0,02 М Трис HCl, pH 8,0, 0,15 М NaCl). Результаты анализа представлены на рис. 11а.

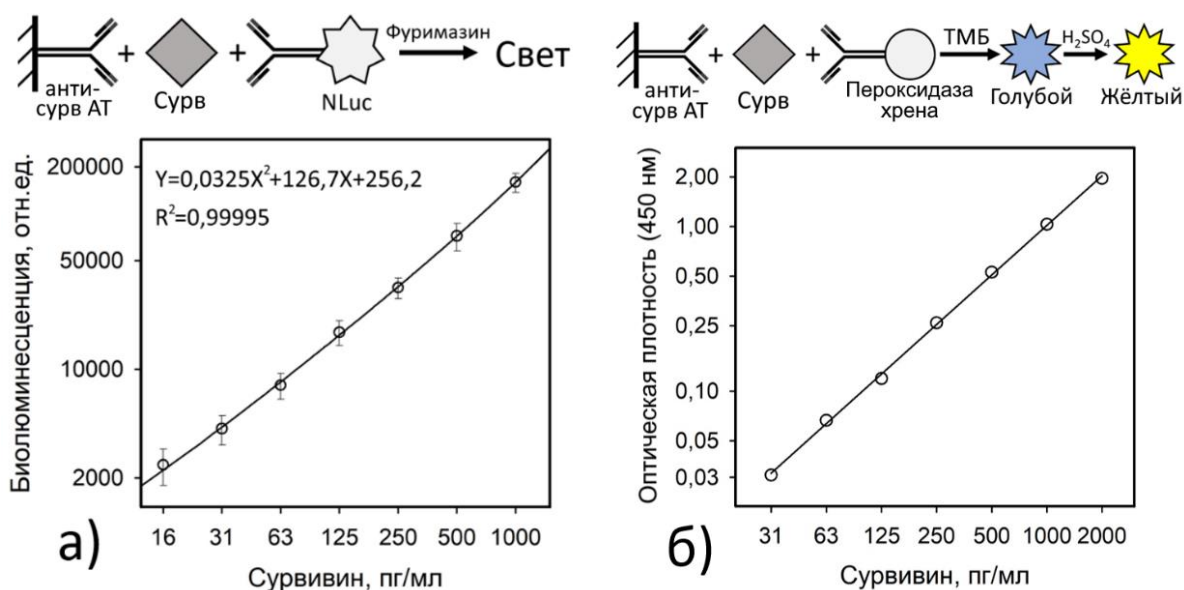


Рис. 11. Биolumинесцентный (а) и колориметрический (б) иммуноанализ сурвивина в стандартных образцах мочи. $N=3$, при биolumинесцентном, $N=2$ при колориметрическом иммуноанализе. Сверху показаны схемы анализа.

Линейную зависимость биolumинесцентного сигнала от концентрации сурвивина наблюдали в диапазоне от 15,6 до 1000 пг/мл, предел обнаружения составил $8,13 \pm 2,43$ пг/мл ($0,49 \pm 0,15$ пМ) ($n=6$). Для сравнения, эти же образцы анализировали с помощью коммерческого иммунодиагностикума Human Survivin Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, США), с линейным диапазоном от 31 до 2000 пг/мл сурвивина и пределом обнаружения 9,96 пг/мл. Анализ проводили в соответствии с рекомендациями производителя. Результаты анализа приведены на рис. 11б.

Пользуясь полученными кривыми как калибровочными, определили содержание сурвивина в образцах 4 здоровых добровольцев, а также 15 больных РМП и другими заболеваниями мочеполовой системы. Корреляция полученных результатов изображена на рисунке 12.

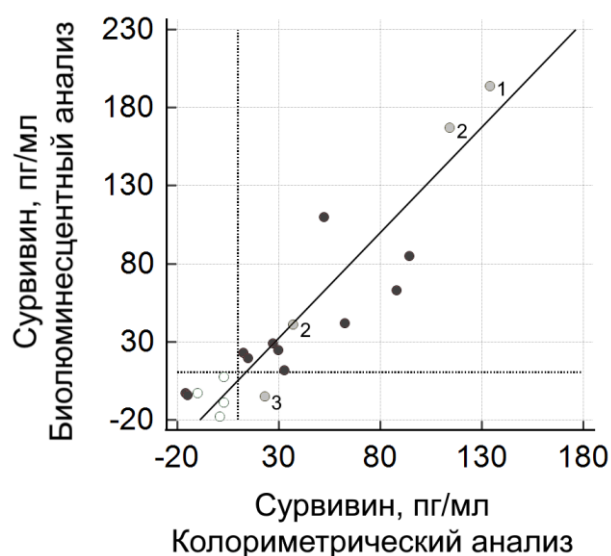


Рис. 12. Корреляция результатов коммерческого колориметрического и биоломинесцентного иммуноанализов. $N=19$. Белым отмечены здоровые доноры, чёрным – пациенты с РМП, серым – с другими заболеваниями (1 – эндометриоз, 2 – рак кишечника, два разных образца, 3 – доброкачественная опухоль мочевого пузыря).

Коэффициент корреляции Пирсона составил 0,91 ($p<0,01$) при сопоставлении результатов биоломинесцентного иммуноанализа и коммерческого колориметрического иммуноанализа от R&D Systems. Полученное значение свидетельствует о сильной положительной связи между результатами. Таким образом, сравнительный анализ показал надёжность разработанного метода для определения сурвивина в образцах мочи.

На следующем этапе исследовали стабильность при хранении основных компонентов аналитической системы: анти-сурвивин антитела, рекомбинантного сурвивина и конъюгата антитела с люциферазой NanoLuc (биоломинесцентная метка). Стабильность оценивали по интенсивности полученного биоломинесцентного сигнала при проведении иммуноанализа образца с концентрацией сурвивина 10 нг/мл с перечисленными компонентами до и после хранения. Антитела и биоломинесцентная метка показали незначительное падение активности около 15% как при хранении при 4°C в течение 3-х месяцев, так и при лиофилизации с последующим хранением при -20°C в течение 3-х месяцев. Сурвивин менее стабилен при хранении в растворе - уже после 2-х дней при 4°C произошло уменьшение результатов биоломинесцентного анализа с использованием образца после хранения на 75%. Показано, что при хранении сурвивина в лиофильно-высушенном виде через 3 месяца снижение сигнала при его биоломинесцентном анализе составило всего 25%.

2.5 Исследование образцов мочи пациентов на содержание сурвивина биоломинесцентным иммуноанализом

Состав групп пациентов и клинико-морфологические параметры заболевания были определены врачами Красноярского краевого онкологического диспансера.

Возраст и половой состав исследуемой и контрольной групп представлен в табл. 2. Группы достоверно не отличались друг от друга по возрасту (критерий U Манна-Уитни) и соотношению полов (хи-квадрат), $P > 0,05$.

Таблица 2. Половой и возрастной состав контрольной и исследуемой групп

Группа	Возраст		P	Пол		P
	Me	Q1-Q3		М	Ж	
РМП (n=128)	69	62,75-74	0,362	99 (77,3%)	29 (23,7%)	0,121
Здоровые (n=60)	67	64-71,25		40 (66,7%)	20 (33,3%)	

У больных РМП специалистами Красноярского краевого онкоцентра были определены основные клинико-морфологические параметры заболевания: стадия, степень дифференцировки, размер и количество новообразований.

Для определения концентрации сурвивина в моче пациентов использовали разработанный твердофазный билюминесцентный иммуноанализ на основе люциферазы NLuc. Используя полученную кривую (рис. 11а) как калибровочную, определили содержание сурвивина в моче пациентов с подтверждённым РМП, а также у здоровых относительно заболеваний мочеполового тракта испытуемых (рис. 13а).

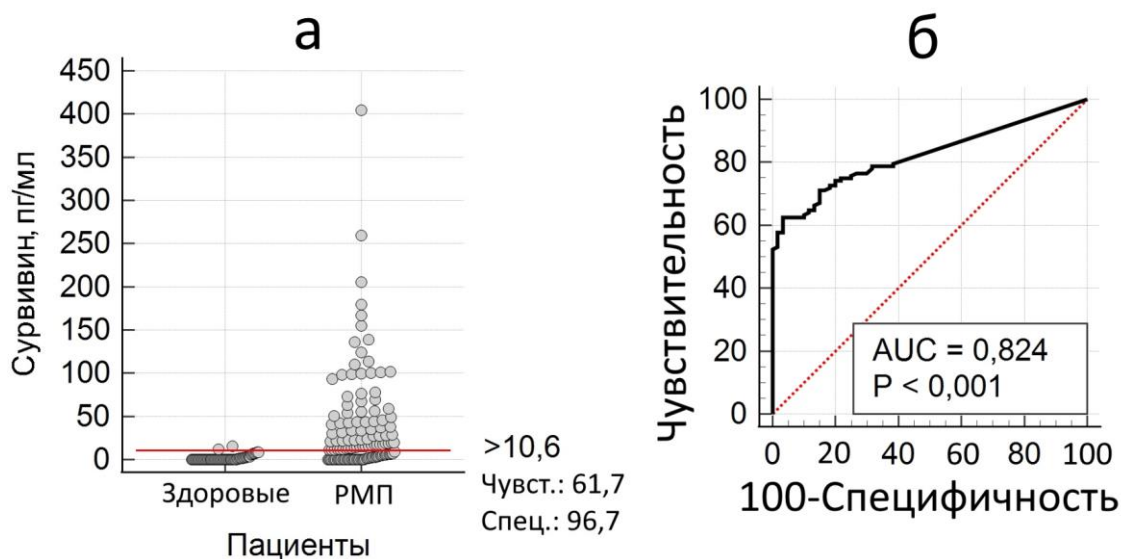


Рис. 13. (а) Концентрация сурвивина в исследованных образцах мочи. Линией показан пороговый уровень сурвивина. (б) ROC-анализ. В группу РМП входят пациенты с НМИРМП и МИРМП.

В качестве порогового использовали значение предела обнаружения сурвивина в разработанном нами анализе (верхнюю границу – 10,6 пг/мл). Как видно из рисунка практически у всех здоровых добровольцев измеренный уровень сурвивина был меньше порогового значения, специфичность анализа составила 96,7%. При этом чувствительность сурвивина как онкомаркера для диагностики РМП составила 61,7%. Рассчитанная площадь под кривой (AUC) для ROC-анализа (рис. 13б) составила 0,824, $p < 0,001$, что свидетельствует о высокой способности разработанного анализа достоверно различать группы больных и здоровых пациентов.

При анализе распределения уровня сурвивина среди больных РМП была обнаружена зависимость доли больных с повышенным сурвивином от глубины инвазии опухоли мочевого пузыря (табл. 3). Процент больных с повышенным сурвивином среди группы НМИРМП (Ta, Tis, T1) составил 51,9%, среди МИРМП (T2-T4) - 76,5%, увеличение относительного риска (ОР) наличия мышечной инвазии среди сурвивин-положительных пациентов составило 1,47 с доверительным интервалом (ДИ) 1,13-1,92. Кроме этого, обнаружена взаимосвязь количества пациентов с сурвивином и степенью злокачественности опухоли. При низкой степени злокачественности (G1-G2) повышенный сурвивин встречается у 50,9%, а при высокой (G3) у 69,3% пациентов, ОР 1,36; ДИ: 1,01-1,85. Также была обнаружена взаимосвязь доли сурвивин-положительных пациентов от размера опухоли ($p < 0,001$; ОР 1,71; ДИ: 1,26-2,32).

Таблица 3. Содержание сурвивина в моче пациентов в зависимости от клинико-морфологических характеристик РМП

Характеристика	Категория	Сурвивин			P
		Повышен	Норма	Me (Q1-Q3), пг/мл	
Размер новообразования	≥ 3 см (n=56)	44 (78,6%)	12 (21,4%)	34,2 (11,8-76,9)	<0,001
	< 3 см (n=61)	28 (45,1%)	33 (54,1%)	5,5 (0-20,7)	
Количество новообразований	Мн. (n=44)	27 (61,4%)	17 (38,6%)	12,7 (0-31,3)	0,888
	Ед. (n=75)	47 (62,7%)	28 (37,3%)	18,2 (3,1-56,7)	
Степень злокачественности и опухоли	Низк. G1-G2 (n=53)	27 (50,9%)	26 (40,1%)	5,9 (0-22,1)	0,036
	Выс. G3 (n=75)	52 (69,3%)	23 (30,7%)	21,8 (5,4-67)	
Распространенность первичной опухоли	НМИРМП (n=77)	40 (51,9%)	37 (48,1%)	7,2 (0-21,8)	0,006
	МИРМП (n=51)	39 (76,5%)	12 (23,5%)	37,8 (11,7-77,3)	

Данные, приведенные в табл. 3, показывают, что повышенная концентрация сурвивина в моче является крайне умеренным по своей диагностической значимости маркером относительно НМИРМП и может диагностировать опухоль лишь в половине случаев (51,9%, AUC=0,771, $p < 0,001$). Это ограничивает использование данного онкомаркера в качестве единственного диагностического фактора для обнаружения НМИРМП. Для случаев МИРМП чувствительность анализа намного выше – 76,5% (AUC=0,903, $p < 0,001$).

2.6 Сурвивин как предиктор рецидивирования НМИРМП

Неинвазивно-мышечный рак мочевого пузыря хорошо поддается лечению, однако требует пожизненного наблюдения из-за большой склонности к рецидивированию (до 60-70% случаев [Kamat et al, 2016]). Наличие сурвивина может указывать на свойства опухоли – агрессивные, склонные к рецидивированию должны содержать много сурвивина, а более доброкачественные – мало, или вообще его не содержать. По результатам наблюдения за 54 пациентами с немусечно-инвазивным

раком мочевого пузыря после проведённого специализированного лечения, был проведён анализ безрецидивной выживаемости по Каплану-Мейеру (рис. 14). Пациенты были поделены на 2 подгруппы – сурвивин-положительные (N=26) и сурвивин-отрицательные (N=28).

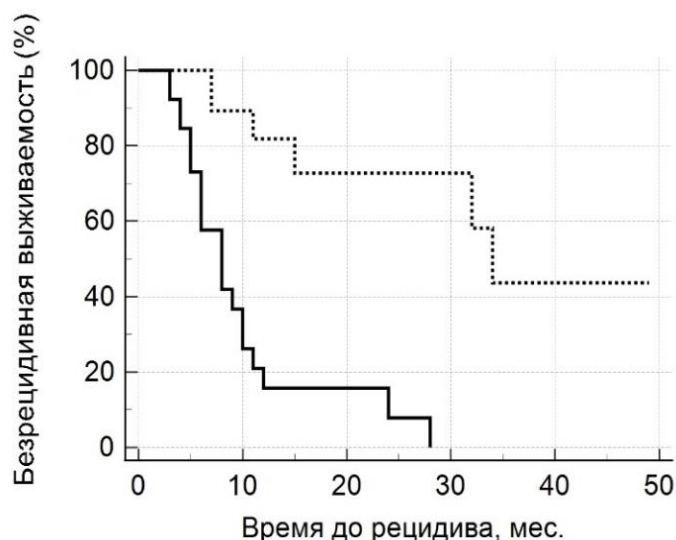


Рис. 14. Кривая безрецидивной выживаемости в зависимости от наличия сурвивина до проведения специализированного лечения. Сплошной линией отображены сурвивин-положительные пациенты, пунктирной – сурвивин-отрицательные.

Среднее время безрецидивной выживаемости среди сурвивин-положительных больных составило $10,1 \pm 1,6$ мес., а среди сурвивин-отрицательных – $33,9 \pm 4,4$ мес. Таким образом, отсутствие сурвивина в моче пациента может являться положительным прогностическим фактором для оценки безрецидивной выживаемости, увеличивающим этот срок на 2 года.

2.7 Исследование образцов мочи пациентов на содержание онкомаркера CYFRA 21-1

Так как индивидуальной чувствительности сурвивина оказалось недостаточно для выявления НМИРМП, было предложено дополнить лабораторный анализ определением другого онкомаркера. Для этого выбран маркер CYFRA 21-1, представляющий собой ряд растворимых фрагментов цитокератина 19, попадающих в мочу после отслоения и лизиса уротелиальных клеток [Setianingsih et al, 2024].

Используя российский ИФА-набор «CYFRA 21-1-ИФА-БЕСТ», определили концентрацию CYFRA 21-1 в моче 124 пациентов с верифицированным РМП и 53 здоровых добровольцев. Распределение концентрации в образцах мочи представлено на рис. 15а) и ROC-анализ на рис. 15б).

При пороговом значении концентрации CYFRA 21-1 в 8,2 нг/мл чувствительность анализа составила 68,5%, а специфичность 92,5%. Диагностическая чувствительность CYFRA 21-1 для ранних стадий (случаев НМИРМП) оказалась, так же как и сурвивина, невелика – 54,8%, а для мышечно-инвазивной формы рака – 88,2%.

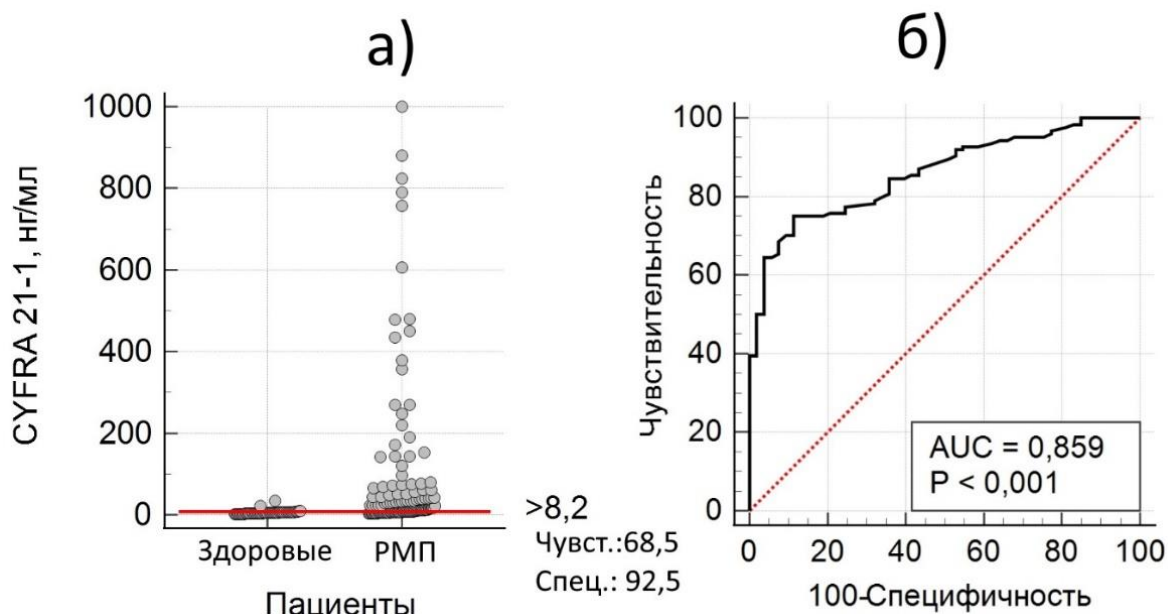


Рис. 15. Концентрация CYFRA 21-1 в исследованных образцах мочи (а) и ROC-анализ полученных результатов (б).

2.8 Комбинированное определение сурвивина и CYFRA 21-1 в моче

Если принять за условие положительного результата лабораторного теста на РМП превышение порогового уровня концентрации хотя бы одного из двух онкомаркеров, то чувствительность такой комбинации составит 82,3%, а специфичность 88,7% (рис. 16).

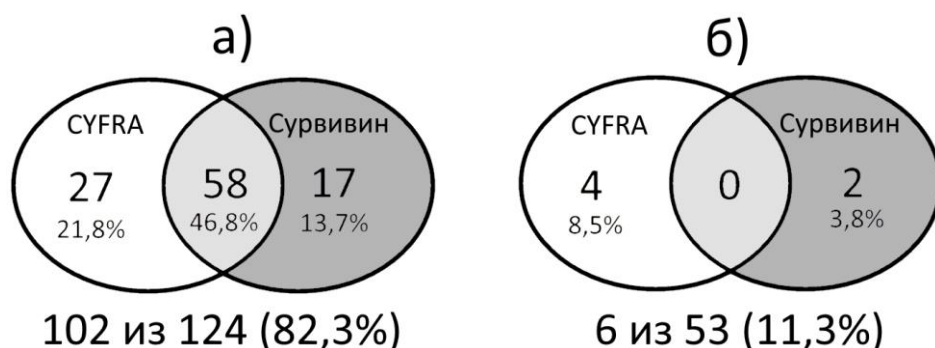


Рис. 16. Диаграмма Венна положительных случаев теста на РМП, (а) – для больных РМП, (б) – для здоровой группы.

Анализ корреляции клинико-морфологических показателей РМП с уровнем сурвивина и CYFRA 21-1 продемонстрировал статистически значимое повышение данных онкомаркеров при наличии неблагоприятных предикторов течения заболевания: увеличения размеров опухоли, степени злокачественности, а также глубины инвазии (табл. 4).

Таблица 4. Доля пациентов с превышенным порогом онкомаркеров в зависимости от клинико-морфологических характеристик РМП

Характеристика	Категория	Сурв. или CYFRA 21-1			Сурв. и CYFRA 21-1		
		повышен	норма	P	повышен	норма или 1 пов.	P
Размер новообразования	<3 см (n=57)	42 (73,7%)	15 (26,3%)	0,016	15 (26,3%)	42 (73,7%)	0,001
	≥3 см (n=56)	51 (91,1%)	5 (8,9%)		38 (67,9%)	18 (32,1%)	
Количество новообразований	Множественные (n=41)	30 (73,2%)	11 (26,8%)	0,055	17 (41,5%)	24 (58,5%)	0,310
	Единичные (n=72)	63 (87,5%)	9 (12,5%)		37 (51,4%)	35 (48,6%)	
Степень злокачественности опухоли	Низкая G1-G2 (n=47)	37 (78,7%)	10 (21,3%)	0,421	14 (29,8%)	33 (70,2%)	0,004
	Высокая G3 (n=77)	65 (84,4%)	12 (15,6%)		44 (57,1%)	33 (42,9%)	
Глубина инвазии опухоли	НМИРМП (n=73)	54 (74%)	19 (26%)	0,004	22 (30,1%)	51 (69,9%)	0,001
	МИРМП (n=51)	48 (94,1%)	3 (5,9%)		36 (70,6%)	15 (29,4%)	
Гистологический тип	Уротелиальный (n=97)	80 (82,5%)	17 (17,5%)	0,369	47 (48,5%)	50 (51,5%)	0,376
	Атипичный (n=13)	12 (92,3%)	1 (7,7%)		8 (61,5%)	5 (38,5%)	

Превышение порога концентрации хотя бы по одному из онкомаркеров наблюдается у пациентов с НМИРМП в 74% случаев, т.е. комбинированная тест система более чувствительна, чем определение этих маркеров по отдельности. У больных с МИРМП комбинированный анализ выявляет почти все случаи – его чувствительность составила 94,1%. Обнаружено, что превышение порогового уровня одновременно по двум онкомаркерам в моче у пациентов может повышать риски: мышечной инвазии (ОР 2,3; ДИ 1,6-3,5), высокой степени злокачественности (ОР 1,9; ДИ 1,2-3,1) и большого размера опухоли ≥3 см (ОР 2,6; ДИ 1,6-4,1). Видно, что применение одновременно двух онкомаркеров позволяет стратифицировать больных с большей степенью достоверности, нежели чем при использовании сурвивина в качестве индивидуального маркера.

Таким образом, использование комбинации онкомаркеров сурвивин/CYFRA 21-1 «открывает окно» возможностей не только для ранней диагностики рака мочевого пузыря, но и для дооперационной стратификации больных в отношении рисков неблагоприятного прогноза, лабораторной оценки вероятного рецидива и/или прогрессирования заболевания.

ВЫВОДЫ

1. Сконструированы и получены все основные компоненты разрабатываемой аналитической системы: рекомбинантный сурвивин, гибридный белок сурвивин-обелин, конъюгаты обелина и NanoLuc с анти-сурвивин антителами. Изучены их основные биохимические свойства.
2. Разработан дизайн биолюминесцентного микроанализа сурвивина в моче с использованием меток на основе фотопротейна обелина в конкурентном и «сэндвич» формате. Предел обнаружения сурвивина для конкурентного варианта анализа составил 163 пг/мл (9,8 пМ), для «сэндвич» варианта – 112 пг/мл (6,8 пМ), что не может обеспечить необходимую чувствительность для выявления этого онкомаркера.
3. Разработан дизайн биолюминесцентного высокопроизводительного иммуноанализа сурвивина в моче на основе люциферазы NLuc. Рабочий диапазон определения сурвивина составляет от 15,6 до 1000 пг/мл, предел обнаружения – $8,13 \pm 2,43$ пг/мл ($0,49 \pm 0,15$ пМ), что позволяет выявлять данный онкомаркер в диагностически значимом диапазоне концентраций. Определены условия для стабильного хранения всех реагентов аналитической системы в течение 3-х месяцев.
4. Исследовано 188 клинических образцов мочи на содержание сурвивина разработанным биолюминесцентным методом. Диагностическая чувствительность сурвивина как онкомаркера для выявления РМП составила 62%, специфичность – 97%. Результаты ROC анализа свидетельствуют о способности разработанного анализа достоверно различать группы больных и здоровых пациентов ($AUC = 0,824$, $p < 0,001$).
5. Показана прогностическая значимость онкомаркера сурвивина при заболевании РМП. Повышенное содержание сурвивина в моче больных РМП является фактором риска мышечной инвазии (ОР 1,47; ДИ: 1,13-1,92), высокой гистологической стадии (ОР 1,36; ДИ: 1,01-1,85) и большого размера опухоли (ОР 1,71; ДИ: 1,26-2,32). Отсутствие сурвивина в моче является благоприятным прогностическим фактором, увеличивающим медианный срок безрецидивной выживаемости пациентов на 2 года. Концентрация сурвивина снижается ниже порогового уровня после проведения специализированного лечения у сурвивин-положительных больных в 87,5% случаев.
6. При использовании сурвивина в качестве индивидуального маркера диагностическая чувствительность относительно ранних стадий заболевания (случаев НМИРМП) составила 52%. Одновременное выявление сурвивина с онкомаркером CYFRA 21-1 в моче больных позволяет увеличить чувствительность до 74% при специфичности анализа 89%. Превышение порогового уровня одновременно по двум онкомаркерам повышает риски мышечной инвазии (ОР 2,3; ДИ 1,6-3,5), высокой степени злокачественности (ОР 1,9; ДИ 1,2-3,1) и увеличения размера опухоли ≥ 3 см (ОР 2,6; ДИ 1,6-4,1).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

Статьи в научных рецензируемых журналах:

1. Слепов Е.В., Башмакова Е.Е., **Панамарев Н.С.**, Франк Л.А., Зуков Р.А. Белок сурвивин как перспективный маркер диагностики и лечения злокачественных новообразований // Эффективная фармакотерапия. – 2021. – Т. 17, №2. – С. 58-63. (Список ВАК; УБС 3).
2. Bashmakova E.E., **Panamarev N.S.**, Kudryavtsev A.N., Frank L.A. N-extended photoprotein obelin to competitively detect small protein tumor markers // Biochemical and biophysical research communications. – 2022. – Vol. 598. – P. 69–73. (Scopus Q1; УБС 1).
3. **Панамарев Н.С.**, Башмакова Е.Е., Кудрявцев А.Н., Черняев Д.В., Мазаев А.В., Слепов Е.В., Зуков Р.А., Франк Л.А. О диагностической и предикторной значимости онкомаркера сурвивина (BIRC5) при раке мочевого пузыря // Вопросы онкологии. – 2023. – Т. 69, №2. – С. 308-315. (Scopus Q4; УБС 1).
4. **Panamarev N.S.**, Matveev A.L., Chernyaev D.V., Zukov R.A., Frank L.A. Urine survivin (BIRC5) bioluminescence-based immunoassay // Analytical Methods. – 2025. – Vol. 17, №23. – P. 4718–4722. (Scopus Q2; УБС 1).
5. **Панамарев Н.С.**, Черняев Д.В., Слепов Е.В., Зуков Р.А., Франк Л.А. Диагностика и мониторинг течения рака мочевого пузыря на основе биolumинесцентного иммуноанализа сурвивина (BIRC5) в моче // Вопросы онкологии. – 2026. – Т. 72, №2. – С.319-327. (Scopus Q4; УБС 1).

Тезисы в сборниках материалов конференций:

1. **Панамарев Н.С.**, Башмакова Е.Е., Франк Л.А. Способ выявления онкомаркера сурвивина биolumинесцентным микроанализом // Проспект Свободный 2021: материалы XVII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (Красноярск, 19-24 апреля 2021 г.). – Красноярск: Сибирский федеральный университет. – 2021. – С. 1483-1485.
2. **Панамарев Н.С.**, Башмакова Е.Е., Франк Л.А. Иммуноанализ онкомаркера сурвивина в образцах мочи при раке мочевого пузыря // Материалы всероссийской конференции «Синтетическая биология и биофармацевтика» (Новосибирск, 24-28 июля 2022 г.). – Новосибирск: ООО «Офсет-ТМ». – 2022. – С. 215.
3. **Панамарев Н.С.** Биolumинесцентный иммуноанализ на основе люциферазы NanoLuc для выявления онкомаркера сурвивина // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2024» / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов, Е.И. Зимакова. [Электронный ресурс] – М.: МОО СИПНН Н.Д. Кондратьева. – 2024. – URL: https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2024/index.htm
4. **Панамарев Н.С.**, Башмакова Е.Е., Матвеев А.Л., Франк Л.А. Сурвивин (BIRC5) как биомаркер для диагностики рака мочевого пузыря (РМП): исследования на основе биolumинесцентных технологий // Опухолевые маркеры: молекулярно-генетические и клинические аспекты: материалы VI Всероссийской конференции (с. Майма, 29 июля – 1 августа 2024 г.). – Москва: Блок-Принт. – 2024. – С. 132-136.

Патент на изобретение:

Патент № 2770490 Российская Федерация, МПК C12N 15/25, C12N 15/70 (2006.01). Рекомбинантная плазмидная ДНК pET19b-Surv-OL, обеспечивающая синтез гибридного белка сурвивин-обелин (Surv-OL) и гибридный белок, связываемый анти-сурвивин антителами и обладающий биolumинесцентной активностью: № 2021120739: заявл. 14.07.2021: опубл. 18.04.2022 / Е.Е. Башмакова, **Н.С. Панамарев**, Л.А. Франк. – 4 с.